

Aus dem Zentrum für Neuropathologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. Hans Kretzschmar)



Eingereicht über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Prof. Dr. Wolfgang Schmahl)

Immunmodulatorische Wirkungen von repetitiver CpG-ODN-Gabe auf das murine Gehirn und die Leber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Isabella Barbara Wagner
aus Garmisch-Partenkirchen

München 2008

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Für meine Mama und Tom

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
2	Literaturübersicht	10
2.1	Das Immunsystem	10
2.2	Toll-like-Rezeptoren	11
2.3	Der immunmodulatorische Effekt von CpG-ODN.....	12
2.4	Das Gehirn als immun-privilegiertes Organ.....	13
2.4.1	Mikroglia	13
2.4.2	Astrozyten	14
2.5	Die Leber als Immunorgan.....	15
2.6	Das Komplementsystem mit dem Vertreter C1q.....	15
2.6.1	Wirkungsweise	15
2.6.2	Bestandteile des Komplementsystems	16
2.6.3	Die Komplementaktivierung	16
2.6.4	C1q	18
2.7	Die TNF Superfamilie mit dem Vertreter TNF α	19
2.7.1	TNF α	19
2.7.2	Lymphotoxin	20
2.7.3	Weitere Vertreter	20
2.8	Das Interferonsystem mit dem Vertreter IFN γ	21
2.9	Interleukine mit dem Vertreter IL-12	22
2.10	Die STAT Familie mit dem Vertreter STAT3	24
2.11	Problemstellung.....	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Tierversuch und Tierhaltung	27
3.2	Material	28
3.2.1	Puffer und Lösungen	28
3.2.2	Chemikalien.....	29
3.2.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
3.2.4	Antikörper	30
3.2.5	Kits	31
3.2.6	Primer	31
3.3	Methoden.....	32
3.3.1	Das Prinzip der Real-time PCR.....	32

3.3.2	Histologische Färbungen	42
4	Ergebnisse	47
4.1	Veränderungen im Gehirn	47
4.1.1	Histologische Untersuchung des Gehirns.....	47
4.1.2	Veränderungen der mRNA Expression bei der Real-time PCR.....	50
4.2	Veränderungen in der Leber	55
4.2.1	Histologische Untersuchung der Leber	55
4.2.2	Veränderungen der mRNA Expression bei der Real-time PCR.....	59
5	Diskussion.....	68
5.1	Gehirn	68
5.1.1	Histologie	68
5.1.2	Real-time PCR.....	69
5.2	Leber.....	72
5.2.1	Histologie	72
5.2.2	Real-time PCR.....	73
6	Zusammenfassung	75
7	Summary	77
8	Literaturverzeichnis	78
9	Abbildungsverzeichnis	86
10	Abkürzungsverzeichnis.....	88
11	Danksagung.....	91

1 Einleitung

Bestandteile prokaryontischer Zellen wie zum Beispiel Lipopolysaccharid, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Flagellin, bakterielle Lipoproteine, Zymosan oder unmethylierte bakterielle DNA, die reich an CpG Sequenzen ist, üben eine stimulatorische Wirkung auf das Immunsystem aus (Janeway, C. A., Jr. et al. 2002); (Bsibsi, M. et al. 2002).

Diese sogenannten PAMPs (pathogen associated molecular patterns) entfalten ihre Wirkung über Toll-like Rezeptoren (TLRs). In diesem Zusammenhang interessieren in dieser Arbeit besonders die unmethylierten CpG-Motive aus bakterieller DNA, die mit dem Toll-like Rezeptor 9 interagieren (Takeshita, F. et al. 2004).

Mit synthetisch hergestellten CpG-Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN) konnte der immunstimulatorische Effekt bakterieller DNA erfolgreich nachgeahmt werden (Krieg, A. M. 2000)

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass CpG-ODNs bei einigen Infektionskrankheiten (Sethi, S. et al. 2002); (Dittmer, U. et al. 2003); (Pedras-Vasconcelos, J. A. et al. 2006) und Tumoren (Carpentier, A. F. et al. 2000); (Baines, J. et al. 2003); (El Andaloussi, A. et al. 2006) den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen können. Von besonderem Interesse ist es, dass die Applikation von CpG-ODN den Krankheitsverlauf bei der Prioninfektion günstig beeinflusst (Sethi, S. et al. 2002), dieses ist auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt worden (Spinner, D. S. et al. 2007)

Ein großer Nachteil ist das rasche Nachlassen der Wirkung im Organismus. Dies limitiert bisher den Einsatz als effektives Therapeutikum.

CpG-ODNs führen im Organismus innerhalb von Minuten zu einem mRNA Anstieg und innerhalb von Stunden zu einer kurzfristigen Zytokinsekretion und IgM Produktion (Krieg, A. M. et al. 1995); (Klinman, D. M. et al. 1996), werden dann aber rasch abgebaut, so dass der immunstimulatorische Effekt in der Regel nur kurz anhält.

Um CpG-ODN jedoch effektiv als Therapeutikum nutzen zu können, wäre ein länger anhaltender Effekt wünschenswert. In mehreren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass durch wiederholte, periphere CpG-ODN-Applikation die Wirkungsdauer im Organismus verlängert werden kann und somit ein Schutz gegen bakterielle Infektionen (Klinman, D. M. et al. 1999), Prionkrankheiten (Sethi, S. et al. 2002), (Spinner, D. S. et al. 2007), Zervikalkarzinome (Baines, J. et al. 2003) und Mamma-Adenokarzinome (Sfondrini, L. et al. 2002) erzielt werden kann.

Die mehrmalige CpG-ODN-Applikation könnte deshalb möglicherweise ein effektiver Weg sein, um Infektionen und Tumore zu bekämpfen. Andererseits dürfen auch mögliche Nebenwirkungen durch eine Überstimulierung des Immunsystems nicht außer Acht gelassen werden.

Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass eine einmalige, periphere CpG-ODN-Applikation zu einem Zytokinanstieg im Gehirn führt (Takeshita, S. et al. 2001); (Dalpke, A. H. et al. 2002), der allerdings bereits nach einigen Stunden wieder Normalmaß erreicht.

In diesem Sinne ist diese Arbeit ausgerichtet, zum ersten Mal die immunmodulatorischen Effekte und den zeitlichen Verlauf von mehrmaliger intraperitonealer CpG-ODN-Applikation im Gehirn und der Leber mittels Real-time PCR und Immunhistologie zu untersuchen.

Begutachtet wird die Expression der mRNA von IL-12p40, TNF α , IFN γ , C1q und STAT3 in Zusammenhang mit der Häufigkeit der Applikation und dem Zeitraum nach der letzten CpG-ODN-Applikation. Zusätzlich werden die Organe histologisch auf toxische Effekte von CpG-ODN untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den immunstimulatorischen Effekt von repetitiver CpG-ODN-Gabe besser zu verstehen und durch die Repetition die Wirkung zu verlängern, um CpG-ODNs somit als Therapeutikum bei bakteriellen Infektionen, Tumoren und gerade bei Prionkrankheiten wirkungsvoll einsetzen zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem gliedert sich in einen angeborenen (unspezifischen) und einen erworbenen (spezifischen) Teil.

Die Bestandteile des angeborenen Teils des Immunsystems sind von Geburt an vorhanden. Man unterscheidet innerhalb dieses Systems zwischen den Zellen (= zelluläres, angeborenes Immunsystem) und den löslichen Botenstoffen (= humorales, angeborenes Immunsystem). Die Hauptzellen des angeborenen Immunsystems sind Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Das Hauptsystem von Botenstoffen des angeborenen Immunsystems, dem „humoralen“ Anteil also, ist das Komplementsystem. Als weitere lösliche Komponenten zählen die Akute-Phase Proteine und das Interferonsystem dazu. Sehr wichtige Mediatoren des angeboren humoralen Immunsystems sind z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-12 und $\text{IFN}\gamma$. Da viele Komponenten dieses Systems ständig im Körper vorliegen bzw. binnen weniger Stunden gebildet oder aktiviert werden können, kann das unspezifische Abwehrsystem sehr schnell reagieren.

Die spezifische oder erworbene Immunantwort reagiert erst mit einer Verzögerung von Tagen bis Wochen auf solche Infektionserreger, die die unspezifische Abwehr durchbrochen haben. In diesem Fall kommt es zur Aktivierung von Lymphozyten, die entweder spezifische Antikörper zur Abwehr bilden oder infizierte Zellen des Körpers töten und so den Infektionserregern das Überleben und die Vermehrung erschweren oder unmöglich machen. Das erworbene Immunsystem kann ein immunologisches Gedächtnis ausbilden und ist somit fähig bei wiederholtem Kontakt mit Krankheitserregern noch schneller und effizienter zu reagieren.

Die einzelnen Komponenten der spezifischen und unspezifischen Abwehr interagieren sehr eng miteinander und können erst dadurch ihre volle Aktivität entfalten. Eine funktionelle Trennung beider Systeme existiert in vivo somit nicht.

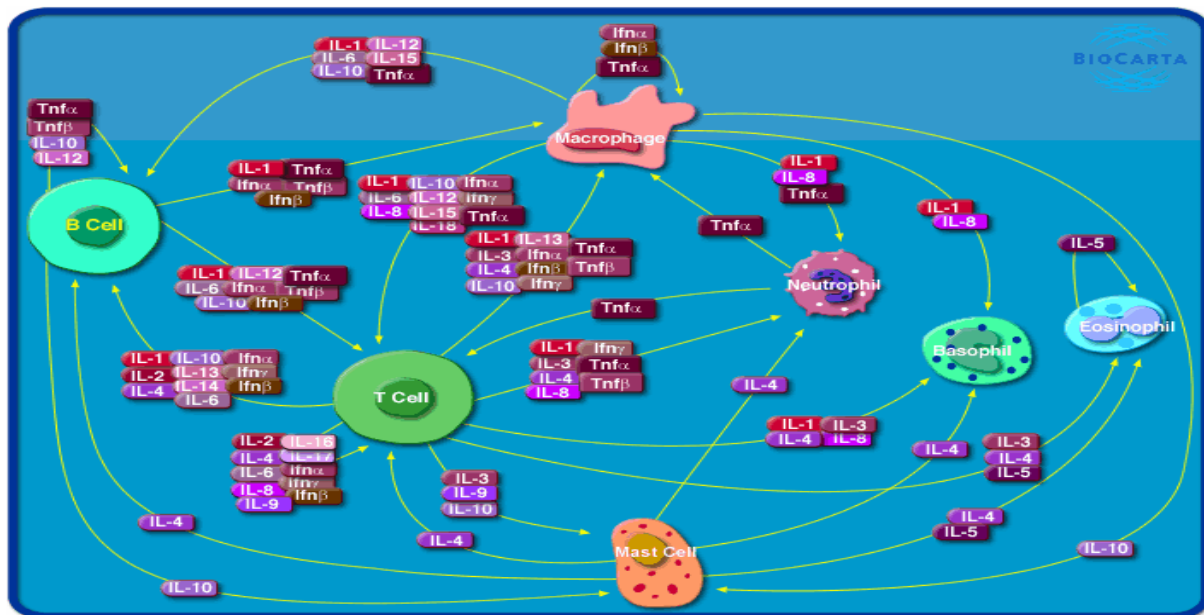


Abbildung 1: Das Zytokinnetzwerk

(Quelle: www.biocarta.com)

Viele verschiedene Zelltypen teilen sich die Aufgabe der Immunabwehr. Dazu gehören B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten. Jede dieser Zellen hat eine spezifische Aufgabe und kommuniziert mit den anderen Zellarten durch die Sekretion von so genannten Zytokinen wie z.B. Interleukine, TNFs und Interferone. Makrophagen phagozytieren Fremdkörper und spielen als Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Rolle. Dabei sezernieren sie Zytokine um eine spezifische Antigen-abhängige Immunantwort durch B- und T-Zellen auszulösen oder auch um eine nicht spezifische Immunantwort bei anderen Zellarten zu bewirken.

T-Zellen sezernieren verschiedenste Faktoren um die Immunantwort auf spezifische Antigene zu stimulieren und zu koordinieren. So unterstützen T-Helfer-Zellen bei der B-Zell Aktivierung und veranlassen die Aktivierung und Proliferation von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Die Kommunikation mit Hilfe von Zytokinen ist meist lokal begrenzt und findet innerhalb des Gewebes oder zwischen Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft statt. Jedes Zytokin wird von einer Reihe von Zellen produziert und wirkt wiederum auf eine Reihe von Zielzellen, die Zellen, welche die Zytokine produzieren, meist eingeschlossen.

Einige Zytokine, wie IL-1, Interferone und TNF veranlassen eine breit gefächerte Immunantwort bei einer Infektion oder Verletzung. Andere Zytokine wirken spezifischer. IL-2 beispielsweise stimuliert die Proliferation und Aktivierung von B- und T-Zellen. IL-4 spielt eine Rolle bei der Th2 Differenzierung, bei Allergien und beim Antikörperklassenwechsel. IL-8 ist ein Chemokin, das Neutrophile, Basophile und T-Zellen zum Entzündungsherd lockt. IL-12 und IL-18 sind in die T-Zell Differenzierung eingebunden. IL-10 scheint die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen zu unterdrücken.

Das komplexe Zusammenspiel all dieser verschiedenen Zytokinfunktionen ist essentiell für die korrekte Funktion des Immunsystems.

2.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind sehr alte, bestimmte Muster erkennende Rezeptoren in Vertebraten und Nichtvertebraten. Sie sind darauf spezialisiert, eine Vielzahl hochkonservierter Struktur motive, sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), die von vielen Krankheitserregern exprimiert werden, zu erkennen (Kopp, E. et al. 2003), (Akira, S. 2001) und (Akira, S. et al. 2001). Der Name „Toll-like Rezeptor“ ist abgeleitet von einem Protein bei *Drosophila melanogaster* namens Toll, das durch die Nobelpreisträgerin

Christiane Nüsslein-Volhard bekannt wurde. TLRs bestehen aus Proteinen, die Toll ähneln, also „Toll-like“ sind.

TLRs sind die wichtigsten Strukturen wenn es um die Erkennung von einwandernden Pathogenen geht.

Bisher sind bei der Maus 13 TLRs identifiziert. Beim Menschen sind es derzeit 10. Durch molekulare Analysen sind bisher 6 phylogenetische TLR Familien enthüllt worden (Roach, J. C. et al. 2005), mit jeweils unterschiedlichen Aufgaben im Erkennen der verschiedenen PAMPs (Lien, E. et al. 2002). Zur Familie der TLR 1 gehören TLR 1, TLR 2, TLR 6 und TLR 10. Sie sind für die Erkennung von bakteriellem Lipoprotein zuständig. Die TLR 3, TLR 4 und TLR 5 Rezeptorfamilien bestehen jeweils aus sich selbst als einzigem Familienmitglied, wobei TLR 3 doppelsträngige RNA (dsRNA), TLR 4 Lipopolysaccharide (LPS, auch Endotoxin genannt) und TLR 5 Flagellin, erkennt. Die TLR 7 Familie besteht aus TLR 7-9 und erkennt fremde Nukleinsäuren. Wobei TLR 9 für die Erkennung eben solcher, an den Basen CG reicher unmethylierte DNA aus Bakterien, zuständig ist. Zur TLR Familie 11 gehören TLR 11-13. Jedoch nur für TLR 11, der ein Profilin-ähnliches Molekül, wie es z.B. von *Toxoplasma gondii* oder *E.coli* exprimiert wird, erkennt, ist etwas über die genauere Funktion bekannt (Yarovinsky, F. et al. 2005).

2.3 Der immunmodulatorische Effekt von CpG-ODN

Neben ihrer Funktion für die Codierung von genetischer Information, kann DNA auch einen direkten immunstimulatorischen Effekt ausüben. Da die chemische Struktur von DNA aus einem polyanionischen Polymer besteht, ist es nicht verwunderlich, dass sie mit anderen biologischen Molekülen in verschiedenster Weise interagieren kann. Zum Beispiel können Oligonukleotide nicht nur komplementäre mRNAs binden und so in sequenzspezifischer Weise die Gen-Expression unterdrücken, sondern es sind zahlreiche andere, nicht durch den komplementären Effekt hervorgerufene Aktivitäten, beschrieben. Der spezifische immunstimulatorische Effekt von bakterieller genomischer DNA wurde als erstes von Tokunaga et al. entdeckt. Er fand heraus, dass bakterielle DNA Natürliche Killerzellen (NK) aktiviert, die Interferon (IFN) Produktion anregt und in einigen Mausmodellen zu einer Tumorregression führt, während diese Effekte bei DNA von Vertebraten nicht beobachtet werden können (Tokunaga, T. et al. 1984); (Yamamoto, S. et al. 1988); (Yamamoto, S. et al. 1992b). Andere Forscher konnten unabhängig voneinander zeigen, dass bakterielle DNA, nicht aber Säuger-DNA, in der Lage ist B-Zellen zu aktivieren und zur Immunglobulinsekretion anzuregen (Messina, J. P. et al. 1991). Dieser Effekt konnte auch beim Gebrauch von synthetisch hergestellten Oligodeoxynukleotiden beobachtet werden. Zuerst glaubte man, dass für den immunstimulatorischen Effekt von bakterieller DNA so genannte Palindrome, also sich selbst wiederholende Sequenzen, verantwortlich sind (Yamamoto, S. et al. 1992a). In unabhängigen Studien konnte dann aber belegt werden, dass weder die Komplementäreffekte noch die Palindromsequenzen der ODNs für den stimulatorischen Effekt auf B-Zellen verantwortlich sein können. In ausführlichen Studien konnte ermittelt werden, dass dafür unmethylierte CpG Dinukleotide in einem besonderen Basenkontext benötigt werden (GACGTT für die Maus und GTCGTT für den Menschen) (Krieg, A. M. et al. 1995). Im Säuger genom sind CpG Dinukleotide „unterdrückt“. Sie kommen nur ein Viertel so häufig vor, wie man bei zufällig angeordneter Basenabfolge erwarten würde (Bird, A. P. 1986). In bakterieller DNA hingegen sind die CpG Motive nicht unterdrückt. Weiterhin sind bei dieser die CpG Sequenzen nicht methyliert, bei Säugersequenzen hingegen schon. Das lässt vermuten, dass sich das Immunsystem deshalb Mechanismen angeeignet hat, eben solche unmethylierten CpG Sequenzen als fremd zu erkennen und entsprechende Abwehrmaßnahmen zu ergreifen.

Durch diese Entdeckung wurde nun in weiteren Studien untersucht, inwieweit sich das Potential von unmethylierten CpG Motiven für therapeutische Zwecke einsetzen lässt.

CpG-ODN wurde nun als eine Möglichkeit entdeckt um Infektionskrankheiten (Dittmer, U. et al. 2003), Tumore (Baines, J. et al. 2003) oder allergisch bedingte Krankheiten (Kline, J. N. et al. 1998) zu behandeln. Auch sein Einsatz als Adjuvans bei Vakzinen erwies sich als nützlich (Krieg, A. M. 2000).

Aufgrund zahlreicher Studien wissen wir heute, dass CpG-ODN innerhalb von Minuten zu einem mRNA Anstieg führt und innerhalb von Stunden die Zytokin- und IgM Produktion anregt (Krieg, A. M. et al. 1995); (Klinman, D. M. et al. 1996). Dieser CpG-ODN vermittelte Effekt kann bis zu 2 Wochen anhalten (Elkins, K. L. et al. 1999).

Für eine therapeutische Anwendung von CpG-ODNs wäre jedoch eine länger andauernde Wirkung erwünscht. Deshalb wäre es für das Bekämpfen von Krankheiten essentiell, einen Weg zu finden, um den Effekt von CpG-ODN zu verlängern. Eine mögliche Strategie wäre nun, durch kontinuierliche CpG-ODN-Applikation, das Immunsystem in ständige Alarmbereitschaft zu versetzen und so eine länger andauernde Protektion gegen Infektionen und Tumore zu erzielen. Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass wiederholte Applikationen von CpG-ODN einen länger andauernden Schutz gegen bakterielle Infektionen mit sich bringen (Klinman, D. M. et al. 1999). Ähnliche Strategien konnten auch bei Prioninfektionen (Sethi, S. et al. 2002), Zervikalkarzinomen (Baines, J. et al. 2003) und Mamma-Adenokarzinomen (Sfondrini, L. et al. 2002) erfolgreich angewendet werden.

Nicht zu unterschätzen bleibt aber auch das toxische Risiko, das von einer therapeutischen Nutzung von CpG-ODN ausgehen könnte.

Es konnte zwar gezeigt werden, dass durch CpG-ODN-Applikation, Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematosus nicht auszulösen sind, wie man früher geglaubt hat (Krieg, A. M. 1995), es reduziert sogar die Ernsthaftigkeit der Symptome in genetisch prädisponierten Tieren (Gilkeson, G. S. et al. 1996); (Mor, G. et al. 1997), dennoch kann natürlich eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems zu einem tödlichen systemischen Entzündungssyndrom führen. CpG-ODN kann Mäuse für eine LPS-induzierte Toxizität rüsten (Cowdery, J. S. et al. 1996) oder direkt, durch die Behandlung von D-Galaktosamine auf TNF α sensibilisierte Mäuse tödlich wirken (Sparwasser, T. et al. 1997).

2.4 Das Gehirn als immun-privilegiertes Organ

Das Gehirn genießt aufgrund der Blut-Hirn-Schranke im Vergleich zu den anderen Organen einen immunologischen Sonderstatus. Die Immunzellen der Peripherie haben im physiologischen Zustand keinen Zugang zum Gehirn. Erst bei pathologischen Ereignissen wie z.B. bei Entzündung wird die Blut-Hirn Schranke durchlässig und ermöglicht den Übertritt von Immunzellen aus der Peripherie.

Die immunologischen Abwehrmaßnahmen, die dem Gehirn zur Verfügung stehen, sind relativ eingeschränkt und immer auch eine Gratwanderung zwischen Schaden und Nutzen.

Die wichtigste immunologische Funktion im Gehirn übernehmen die Mikrogliazellen, wobei auch Astrozyten beteiligt sein können.

2.4.1 Mikroglia

Im Jahre 1932 wurden Mikrogliazellen, auch Mesoglia oder Hortega-Zellen genannt, zum ersten Mal von anderen Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) durch Del Rio-

Hortega abgegrenzt. Eine Abstammung aus der monozytischen Zellreihe scheint mittlerweile bestätigt (Ling, E. A. et al. 1980); (Streit, W. J. et al. 1988); (Boya, J. et al. 1991).

Morphologisch kann man zwei verschiedene Gruppen von Mikrogliazellen unterscheiden. Zum einen ortsständige, ruhende Mikroglia mit kleinem Zellkörper und langen, verzweigten Zellfortsätzen, die etwa 20% der Gesamtpopulation an Gliazellen eines physiologischen Gehirnes ausmachen und zum anderen die makrophagenähnliche, aktivierte Form (Murabe, Y. et al. 1981).

Bei pathologischen Ereignissen des ZNS (wie z.B. Traumatas, Ischämien, Autoimmunerkrankungen, Intoxikationen) können die ortsständigen Mikrogliazellen in ihre aktivierte, amöboide Form überführt werden (Giulian, D. et al. 1986); (Sawada, M. et al. 1990). Auch ist im adulten Organismus bis zu einem gewissen Grad, zusätzlich eine Einwanderung von sich entwickelnden Mikrogliazellen aus dem Blut möglich (Lawson, L. J. et al. 1992); (Kennedy, D. W. et al. 1997).

Aktivierte Mikroglia sind zur Antigenpräsentation und zur Phagozytose befähigt und sekretieren unter anderem Proteasen, Wachstumsfaktoren und zytotoxisch wirkende Substanzen (Nakajima, K. et al. 1993); (Boje, K. M. et al. 1992); (Mallat, M. et al. 1989).

Neben ihrer herausragenden Rolle in der Immunabwehr des Zentralnervensystems, wird ebenfalls eine Beteiligung bei der Regulation des neuronalen Wachstums, der Synapto-, Angio- und Gliogenese diskutiert (Giulian, D. 1987).

Mikroglia sekretieren eine Vielzahl von Zytokinen und neuronalen Wachstumsfaktoren. Als wichtigste sind hier unter anderem die Interleukine IL-1, IL-3, IL-6, der „nerve growth factor“ (NGF) und Tumornekrosefaktor (TNF) zu nennen. TNF auf den in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk gelegt wurde, wirkt unter anderem zytotoxisch auf Oligodendrozyten, zerstört Myelin und hat einen stimulierenden Effekt auf die Angiogenese. Mikrogliazellen zählen als der Hauptproduzent von TNF α im Gehirn (Sawada, M. et al. 1989).

2.4.2 Astrozyten

Astrozyten oder auch Astroglia bilden die Mehrheit der Gliazellen im Zentralnervensystem von Vertebraten. Morphologisch handelt es sich um sternförmig verzweigte Zellen, deren Fortsätze Grenzmembranen zur Pia mater und zu den Blutgefäßen (Blut-Hirnschranke) bilden. Es sind zwei Arten von Astrozyten bekannt.

Zum einen kennt man die Faserglia (Astrocytus fibrosus), auch Langstrahler genannt. Dieser Typ ist fibrillenreich und findet sich vor allem in der weißen Substanz des Gehirns. Im Elektronenmikroskop ist er durch zahlreiche Mikrotubuli und intrazelluläre Faserstrukturen charakterisiert.

Den zweiten Typ, Astrocytus protoplasmaticus, auch Kurzstrahler genannt, findet man vor allem in der grauen Substanz. Eine spezielle Form ist die Radialglia, deren Hauptausläufer z.B. die Molekularschicht in etwa parallel durchziehen und in Endfüßen an der Pia mater enden. Diese besitzen bei Vertebraten in der frühen Gehirnentwicklung eine wichtige Rolle als Leitstruktur. Im ausgereiften Säugergehirn ist sie nur noch im Kleinhirn (Bergmannglia) und in der Retina (Müllerglia) vorhanden.

Astrozyten sind maßgeblich an der Flüssigkeitsregulation im Gehirn beteiligt und sorgen für die Aufrechterhaltung des Kalium-Haushaltes. Die während der Erregungsleitung in Nervenzellen frei werdenden Kalium-Ionen werden vor allem durch eine hohe Kalium-

Leitfähigkeit und zum Teil auch durch K^+ und Cl^- Kotransporter aufgenommen. Somit tragen Astrozyten einen wesentlichen Teil zum extrazellulären pH-Haushalt im Gehirn bei. Astrozyten bilden nach Durchtrennung der Axone von Nervenzellen sogenannte „Gliarben“, die maßgeblich daran beteiligt sind, ein potentiell neues Auswachsen der Axone zu verhindern.

Als spezifischer Astrozytenmarker ist seit Jahren das GFAP etabliert (DeArmond, S. J. et al. 1987); (Halliday, G. M. et al. 1996). Im Rahmen von manchen pathologischen Ereignissen im Gehirn wird GFAP verstärkt exprimiert.

2.5 Die Leber als Immunorgan

Als immunologisch aktives Organ verfügt die Leber über eine Reihe von Abwehrmechanismen gegen Viren und Bakterien, die sie entweder vom Darm oder über den großen Kreislauf erreichen. Aber auch die Erkennung und Elimination von Tumorzellen gehört zu ihren Aufgaben. Als auf die Immunantwort spezialisierte Zellen, finden sich in der Leber die Kupffer-Sternzellen. Sie werden auch als Kupffersche Sternzellen oder Browicz-Kupffer-Zellen bezeichnet, nach den Entdeckern Karl Wilhelm von Kupffer und Tadeus Browicz. Dabei handelt es sich um sternförmige Makrophagen mit ovalem Zellkern. Sie befinden sich im Lebergewebe an der Innenwand der Leberkapillaren und differenzieren sich aus Monozyten. Die Sternzellen entnehmen dem Pfortader-Blut körpereigene und körperfremde Substanzen, meist Schadstoffe, Bakterien und Stoffwechselprodukte, aber auch geschädigte und alte Erythrozyten und bauen selbige ab.

2.6 Das Komplementsystem mit dem Vertreter C1q

Das Komplementsystem besteht aus über 30 Proteinen, die entweder zellgebunden oder im Blutplasma gelöst, der Abwehr von Mikroorganismen wie z.B. Bakterien, Pilzen oder Parasiten dienen und im Rahmen der Immunantwort aktiviert werden.

Ursprünglich entdeckt wurde es als ergänzender (komplementierender) Teil der Antikörperantwort. Heute weiß man aber, dass es auch am angeborenen Immunsystem beteiligt ist. Wenn die Proteine des Komplementsystems jedoch unreguliert wirken, können sie starke zellzerstörerische Eigenschaften entwickeln und somit für Gewebeschäden im Verlauf von Krankheiten wie z.B. Glomerulonephritis, hämolytisch-urämisches Syndrom, systemischer Lupus erythematosus oder rheumatoide Arthritis verantwortlich sein.

2.6.1 Wirkungsweise

Die Hauptaufgabe des Komplementsystems ist die Opsonierung, d.h. die Andockung auf Krankheitserregern, um so das Erkennen und Zerstören derselben durch Phagozyten zu ermöglichen. Daneben ist es Auslöser für einige Entzündungsreaktionen, die den Kampf gegen die Infektion unterstützen. Die Fragmente einiger Komplementproteine wirken als Chemoattraktoren, die weitere Phagozyten zum Infektionsherd locken. Ebenfalls ist das Komplementsystem in der Lage die Zellmembran von Bakterien permeabel zu machen, um diese so direkt zu zerstören.

Ein überwiegender Teil der Komplementproteine sind Zymogene. Das sind Proteasen, die ihrerseits durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Zymogene liegen überall im Körper vor, ohne dass es zu einer Reaktion kommt. Erst im Falle einer Infektion werden sie lokal aktiviert und aktivieren weitere Zymogene durch deren Spaltung. Dadurch wird eine ganze Kaskade an Zymogenaktivitäten ausgelöst, was zu einer schneeballsystemartigen Verstärkung der Immunantwort führt.

2.6.2 Bestandteile des Komplementsystems

Direkt an den Signalwegen des Komplementsystems beteiligt sind die Faktoren C1 bis C9, das Mannose-bindende Lektin (MBL) und die an C1 bzw. MBL gebundenen Serin-Proteasen C1r und C1s bzw. MASP-1 bis 3. Durch Protease-vermittelte Spaltung der Komplementfaktoren C1 bis C5 und Zusammenlagerung mit den Faktoren C6 bis C9 entsteht eine Vielzahl an Proteinen und Proteinkomplexen. Dazu gehören beispielsweise die Anaphylatoxine C3a, C5a und C2b mit gefäßerweiternder und chemotaktischer Wirkung (Entzündungsreaktion) und der Membranangriffskomplex (MAC). Negativregulatoren des Systems sind der C1-Inhibitor, Faktor H, Faktor I, C4bp, CD35, CD46, CD55, CD59 und Vikronektin. Als einziger Positivregulator wirkt Properdin.

2.6.3 Die Komplementaktivierung

Es gibt drei verschiedene Wege für eine Aktivierung des Komplementsystems (vgl. Abbildung 2). Das Produkt aller drei Wege ist eine als C3-Konvertase bezeichnete Serin-Protease auf der Oberfläche der Zielzelle. Die von ihr ausgelöste Spaltungskaskade führt zu einer chemotaktischen Anlockung von Leukozyten, verstärkter Phagozytose und schließlich zur Lyse der Zielzelle. Spaltprodukte der Komplementfaktoren C1 bis C5, die in den jeweiligen Kaskaden entstehen, wirken zusätzlich als Anaphylatoxine und vermitteln somit eine Entzündungsreaktion.

2.6.3.1 Der klassische Weg

Der klassische Weg wird in der Regel über Antikörper vermittelt. Der Komplementfaktor C1 ist das erste Komplementprotein des klassischen Weges und besteht aus dem sechsköpfigen Kollektin C1q und jeweils zwei C1s und C1r Molekülen. C1q besitzt mehrere Bindungsdomänen für Antigen-gebundene Antikörper (IgG und IgM). Für die Aktivierung, der an C1q gebundenen Serin-Proteasen (C1r und C1s) sind zwei 40 nm voneinander entfernte Ig-Fc-Regionen nötig. Eine Aktivierung durch freie Antikörper findet daher nicht statt. C1q ist aber auch in der Lage direkt an die Oberfläche von Pathogenen zu binden und so den klassischen Weg auch ohne Hilfe von Antikörpern zu aktivieren.

Nach der Aktivierung katalysiert die Protease C1q nun die beiden Startreaktionen des klassischen Aktivierungsweges. Es folgt eine Spaltung von C2 in C2a und C2b und von C4 in C4a und C4b. C2b und C4a diffundieren und entfalten dabei ihre Wirkung als Anaphylatoxine. C2a und C4b lagern sich zum C4b2a-Komplex zusammen und bilden so die C3-Konvertase des klassischen Weges. Weiterhin entsteht als Spaltprodukt in weiterer Folge C4d, welches kovalent an das Endothel, an dem die Komplementreaktion stattgefunden hat, binden kann. Die Funktion des C4d ist derzeit noch nicht verstanden. Es dient aber in der Biopsie als Marker für eine Antikörper-induzierte Transplantatabstoßung.

Der C1-Esteraseinhibitor (C1-INH) verhindert eine mögliche Selbstaktivierung der C1-Proteasen und sorgt für einen kontrollierten Ablauf der Reaktion. Ein angeborener oder erworbener C1-INH-Mangel kann zu einer übermäßigen Komplementreaktion führen, was beim Auftreten von Angioödem (hereditäres oder erworbenes Angioödem) eine Rolle spielt.

2.6.3.2 Der Lektin Weg

Im Lektin-Weg bindet das Mannose-bindende Lektin (MBL) an Mannose oder N-Acetylglukosamin auf der Oberfläche des Pathogens und aktiviert dann die MBL-aktivierten Proteasen MASP-1, MASP-2 und MASP-3. Diese sind Katalysatoren für dieselbe Reaktion wie im klassischen Weg. Hier bilden C4b und C2a ebenfalls wieder ein C4b2a-

Heterodimer und damit, analog dem klassischen Aktivierungsweg, die C3-Konvertase des klassischen Weges.

2.6.3.3 Der alternative Weg

Der alternative Weg wird spontan und Antikörper unabhängig aktiviert. Ausgelöst wird er durch den spontanen Zerfall des instabilen Komplementfaktors C3 in C3a und C3b. C3a diffundiert und besitzt eine chemotaktische und entzündungsauslösende Wirkung als Anaphylatoxin. C3b bindet kovalent an eine Zelloberfläche. Erfolgt die Bindung an eine körpereigene Zelle wird es relativ rasch durch Regulatorproteine inaktiviert oder abgebaut. Auf pathogenen Oberflächen bleibt es aktiv und kann Faktor B binden. Am entstandenen C3bB-Komplex wird durch den Serum-Faktor D ein Stück des Faktors B, Ba genannt, abgeschnitten. Bb bleibt an C3b gebunden. Der Komplex C3bBb wird als C3 Konvertase des alternativen Weges bezeichnet. Da er sehr instabil ist, muss er um nicht zu zerfallen, von Properdin stabilisiert werden.

2.6.3.4 C3-Konvertase ausgelöste Reaktionen

Die im alternativen, klassischen oder Lektin Weg gebildeten C3-Konvertasen, C3bBb und C4b2a, spalten nun mit hoher Aktivität C3 in C3a und C3b.

Die entstehenden C3b-Moleküle werden entweder, wenn sie keine geeignete Bindungsfläche finden, inaktiviert oder sie lagern sich an der Zelloberfläche einer Zielzelle an und aktivieren erneut den alternativen Weg des Komplementsystems. Eine positive Rückkopplung entsteht. Ebenso wirken sie als Opsonine und markieren die Zielzelle als lohnendes Ziel zur Phagozytose. Eine dritte Möglichkeit ist die Bindung an eine C3 Konvertase (C4b2a bzw. C3bBb). Die dabei entstehenden trimolekularen Komplexe C4b2a3b und C3bBbC3b spalten nun nicht mehr C3 sondern C5. Man nennt diese jetzt auch C5 Konvertasen des klassischen bzw. alternativen Weges.

Die beiden Produkte der C5-Spaltung haben einerseits die Funktion als Anaphylatoxin und chemotaktischer Lockstoff (C5a) und andererseits leiten sie die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) ein (C5b). Dabei rekrutiert der „Anker“ C5b nacheinander die Faktoren C6, C7 und C8. Der entstandene C5b678-Komplex startet dann die Polymerisation von C9. Nach der Zusammenlagerung von bis zu 18 C9 Monomeren stellt der C5b678poly9-Komplex den fertigen Membranangriffskomplex dar. Dieser attackiert die Zielzelle unter anderem durch Porenbildung in der Zellmembran und führt somit zu ihrer Lyse (Janeway, C. A., Jr. et al. 2002).

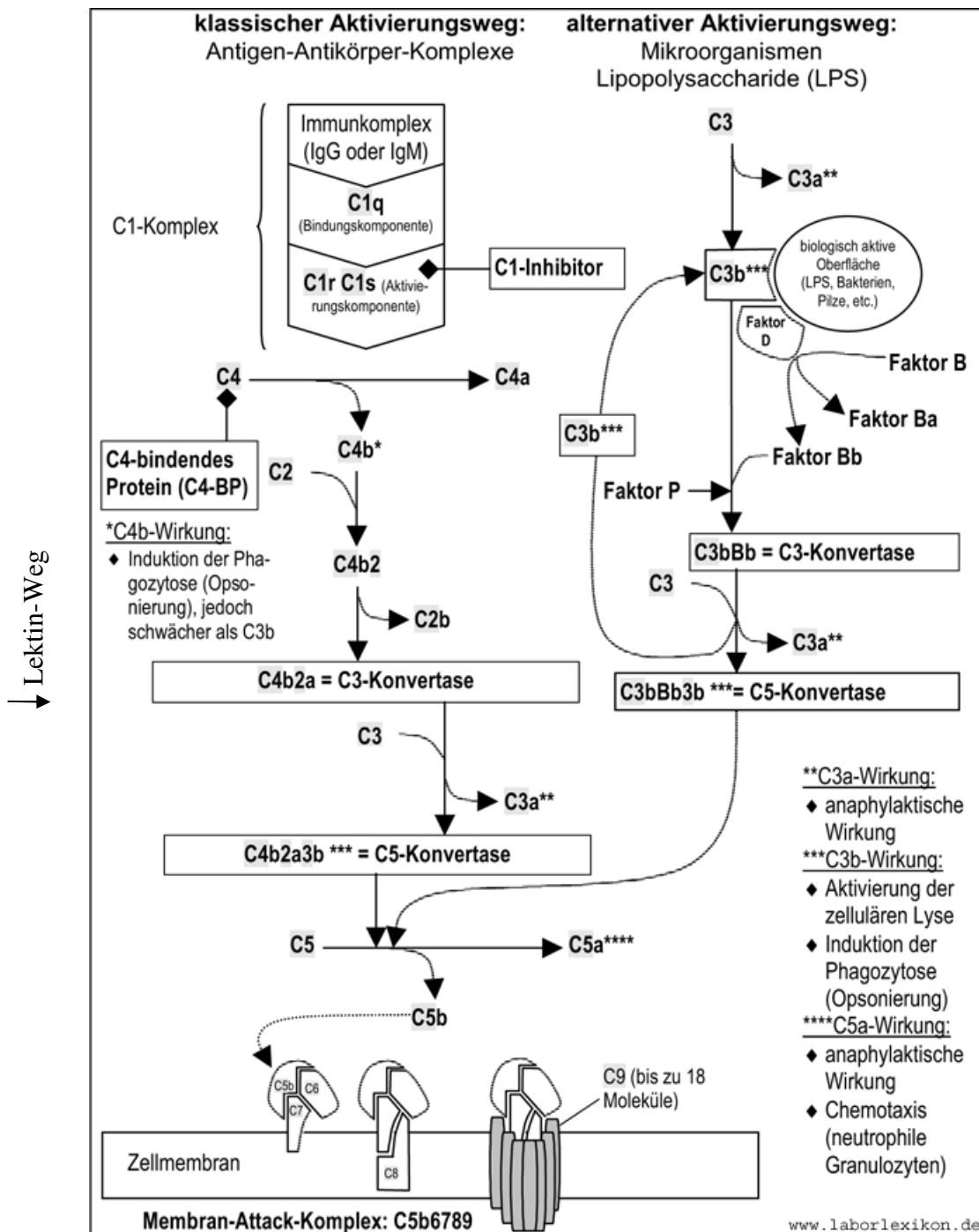


Abbildung 2: Die Komplementaktivierungskaskade

(Quelle: www.laborlexikon.de)

2.6.4 C1q

C1q im speziellen ist nun das Schlüsselprotein zur Aktivierung des klassischen Komplementweges. Es ist das wichtigste Verbindungsglied zwischen angeborenem und IgG- oder IgM vermittelten erworbenen Immunsystem (Kishore, U. et al. 2000). Als ein Hauptgriffserkennungsmuster der angeborenen Immunantwort, kann C1q ein breites Spektrum von Liganden durch seine kugelige (gC1q) Domäne binden und Immunzellen, wahrscheinlich durch seine Kollagenregion modulieren. Die charakteristische gC1q Domäne findet sich auch in vielen nicht Komplement-Proteinen. Sie besteht aus einer kompakten

β -Faltblattstruktur ähnlich der, der multifunktionalen Liganden der Tumornekrosefaktor-Familie. Die Mitglieder dieser neu zusammengefassten „C1q und TNF Superfamilie“ sind unter anderem beteiligt an der Wirtsverteidigung, am Entzündungsgeschehen, bei der Apoptose, bei Autoimmunität, bei Zelldifferenzierung, bei der Organogenese, am Winterschlaf und an Insulin-resistenter Fettleibigkeit. Des Weiteren ist C1q auch noch in viele andere immunologische Prozesse miteingebunden. Darunter beispielsweise das Aufrechterhalten von immunologischer Toleranz durch die Beseitigung von apoptotischen Zellen, die Phagozytose von Bakterien, die Neutralisation von Retroviren, die Zelladhäsion und die Modulation von Dendritischen Zellen (DCs), Fibroblasten und B-Zellen (Kishore, U. et al. 2000). Ein solch breites Aufgabenspektrum erfüllen zu können, wird durch die Fähigkeit vermittelt, ein großes Angebot an Liganden binden zu können wie z.B. die Hüllproteine von einigen Retroviren, β -Amyloid-Fibrillen, Lipopolysaccharid (LPS), Transmembranproteine Gram-negativer Bakterien, Phospholipide, apoptotische Zellen und einige Akute-Phase-Proteine wie Pentraxin.

Dieses Zytokin würde ausgewählt, da man davon ausgeht, dass Mikrogliazellen im Zentralnervensystem die einzigen ortsansässigen Zellen sind, die im lebenden Organismus C1q produzieren. Man kann C1q deshalb als Marker für ihren Aktivierungsgrad heranziehen. Während die C1q Biosynthese in ruhenden, verzweigten Mikrogliazellen meist niedrig ist, steigt sie in aktivierter Mikroglia drastisch an (Lynch, N. J. et al. 2004).

2.7 Die TNF Superfamilie mit dem Vertreter TNF α

Tumornekrosefaktoren (TNF x) sind zu den Zytokinen zählende, körpereigene Botenstoffe der Zellen des Immunsystems. Sie übertragen Befehle einer Zelle an andere Zellen. Zur Familie der Tumornekrosefaktoren gehört eine Vielzahl von Stoffen. Der erste therapeutische Nutzen des Tumornekrosefaktor (TNF α) wurde 1893 indirekt von William B. Coley entdeckt. Er entdeckte, dass in manchen Fällen bei Patienten mit Tumorleiden, dieses nach einer bakteriellen Infektion stark zurückging. Der durch die bakterielle Stimulation frei gesetzte Stoff ließ den Tumor nekrotisieren, daher der Name. Daraufhin entwickelte er eine Art Bakteriensuspense aus erysipelbildenden Streptokokken (Erreger der Wundrose) und einer Bacillus-Art. Trotz Heilungserfolge geriet die Methode neben neu aufkommenden Möglichkeiten zur Tumorbekämpfung auch wegen z. T. erheblicher Nebenwirkungen später in Vergessenheit.

Von ihrer Struktur her sind alle Zytokine Polypeptide. Das TNF Molekül besteht aus 157 Aminosäuren.

Folgende Zytokine können aufgrund ihrer Sequenz, ihrer Funktion und Strukturähnlichkeiten zu der TNF-Familie gerechnet werden:

2.7.1 TNF α

Tumornekrosefaktor- α (Kachektin) wird von Makrophagen/Monozyten sowie Lymphozyten und Mastzellen gebildet und ist ein Signalstoff, der auf Entzündungen, die Blutbildung, die Immunabwehr, die Bildung von Blutgefäßen und Tumoren wirkt. Dabei ist er dem Stoff Interleukin-1 in seiner Wirkungsweise sehr ähnlich. Im Hypothalamus stimuliert er die Freisetzung des Kortikotropin-Releasing-Hormons (CRH), löst Fieber aus und unterdrückt den Appetit (daher, die von „Kachexie“ abgeleitete Namensgebung). In der Leber setzt er das C-reaktive Protein (CRP) frei.

2.7.2 Lymphotoxin

Lymphotoxin-alpha (LT- α) und Lymphotoxin-beta (LT- β) sind einander sehr ähnliche Zytokine und werden gelegentlich auch als TNF β zusammengefasst. TNF β wird im Gegensatz zu TNF α von bestimmten T-Zellen abgesondert. TNF β aktiviert dann Makrophagen, die infolgedessen Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF α ausschütten. TNF β hat eine toxische Wirkung auf einige Tumorzell-Linien in vitro und in vivo.

2.7.3 Weitere Vertreter

- T-Zell Antigen gp39 (CD40L), ein Zytokin, das für die B-Zell Entwicklung und Aktivierung wichtig scheint
- CD27L, ein Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der T-Zell Aktivierung spielt. Es induziert die Proliferation von Ko-stimulierten T-Zellen und verstärkt die Bildung von zytolytisch wirksamen T-Zellen
- CD30L, induziert die T-Zell Proliferation
- 4-1BBL ein induzierbares T-Zelloberflächenmolekül, das zur T-Zell Stimulierung beiträgt
- OX40L, Ko-stimuliert die T-Zell Proliferation und die Zytokin Produktion
- TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) induziert Apoptose

TNF α wird als Typ II Membranprotein synthetisiert und wird dann einer post-translationalen Spaltung unterzogen und von der extrazellulären Domäne befreit. CD27L, CD30L, CD40L, LT-beta, 41BBL und TRAIL scheinen ebenfalls Typ II Membranproteine zu sein. LT-alpha ist ein sekretorisches Protein. Alle diese Proteine scheinen homodimere-Komplexe zu formen, im Fall von LT-alpha und beta sind es Heterodimere, die jeweils ihren spezifischen Rezeptor erkennen. Das typische Erkennungsmuster für diese Familie liegt auf dem Beta-Strang an der zentralen Schnittstelle des Proteins, die bei allen Mitgliedern erhalten ist.

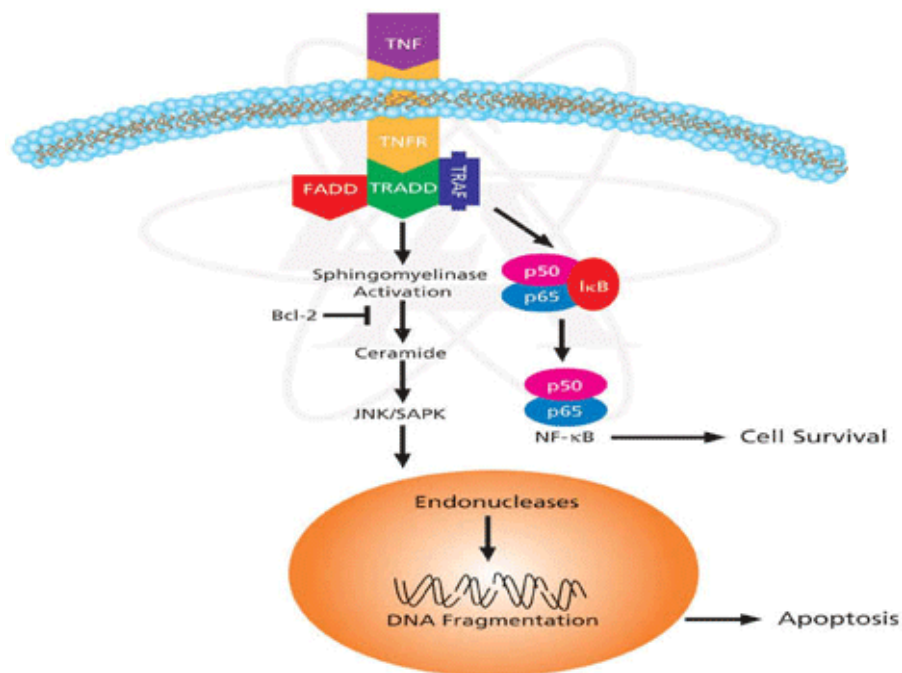


Abbildung 3: Die TNF Signalkaskade

(Quelle: www.sigma.com)

Sobald der Tumornekrosefaktor (TNF) an den TNF Rezeptor gebunden hat (TNFR) (55kDa) werden Wachstums-regulierende Signale ins Innere der Zelle übertragen. TNF wirkt auf normale Zellen mitogen. In transformierten Zellen hingegen bewirkt TNF Apoptose durch DNA Fragmentierung und Zytolyse. Funktionelle Studien konnten eine konservierte Region im Rezeptor ausmachen, der die „Death Domain“ (DD) genannt wird. Hierbei handelt es sich um ein Protein-Protein Interaktionsmotiv, das nötig ist um das apoptotische Signal weiterzuleiten. Die TNF-induzierte Überlebenskaskade wird durch den Transkriptionsfaktor NF-κB vermittelt. Die Aktivierung von NF-κB erfolgt durch die Phosphorylierung von I-κB am Ser³² und am Ser³⁶. Dadurch wird die Dissoziation und anschließende Lokation im Kern von NF-κB ausgelöst. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Zellen mit ausgeschalteter NF-κB Signalkaskade sehr viel leichter, eine durch TNF ausgelöste Apoptose durchleben. Daher könnte die Verfügbarkeit von NF-κB eine zentrale Rolle spielen, ob TNF eine Apoptose induziert und als anti-Tumor Faktor wirken kann.

TNF α wurde für diese Studie herangezogen, da es ein wichtiger Marker für eine Aktivierung des Immunsystems ist und in der Literatur bereits eine, wenn auch nur kurzfristige stimulatorische Wirkung nach einer einmaligen Applikation von CpG-ODN für das Gehirn beschrieben ist (Dalpke, A. H. et al. 2002); (Takeshita, S. et al. 2001).

2.8 Das Interferonsystem mit dem Vertreter IFN γ

Interferone stellen eine Gruppe von Glykoproteinen dar, die von fast allen Zellen des Körpers innerhalb weniger Stunden nach viraler Infektion gebildet werden. Sie schützen andere Zellen vor der Infektion und begrenzen so die Infektion und die Virusvermehrung bis eine effektive Immunabwehr in Gang kommt. Diese antivirale Aktivität wird vor allem auf Typ-I Interferone zurückgeführt, zu denen die Interferone α , β , ω und τ gezählt werden. Sie beruht auf der Induktion antiviraler Mechanismen, durch die in den meisten Fällen die Synthese viraler Proteine gehemmt wird.

Dagegen besitzt Interferon- γ als einziger Vertreter der Typ-II Interferone vorwiegend immunmodulatorische Fähigkeiten. Von besonderer Bedeutung bei unspezifischen Abwehrreaktionen ist dabei seine aktivierende Wirkung auf Makrophagen, was es für diese

Arbeit interessant machte. Des Weiteren ist eine kurzfristige Hochregulierung nach einmaliger CpG-ODN-Gabe bekannt (El Malky, M. et al. 2005)

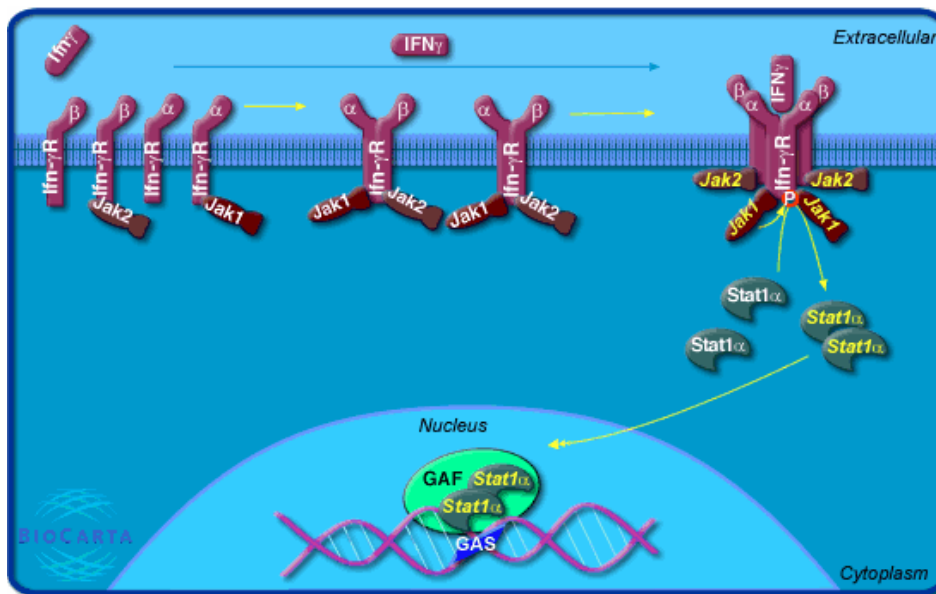


Abbildung 4: Das Interferonsystem

(Quelle:www.biocarta.com)

Interferon gamma wird von CD4+, Th1 Zellen, CD 8 Zellen und von gamma/delta T-Zellen sezerniert und ist in der Lage NK Zellen zu aktivieren. Es spielt eine Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten um den anti-mikrobiellen und anti-Tumoreffekt zu verstärken. Des Weiteren ist es wichtig für die Proliferation, die Differenzierung und die Immunantwort einer Lymphozytensubpopulation. Die Signalvermittlung erfolgt über einen IFN-Rezeptorkomplex, der aus 2 alpha Ketten (Typ I Rezeptor) und 2 beta Ketten (Typ II Rezeptor) besteht. Durch die Phosphorylierung von JAK1 und STAT1 (alpha) wird das Signal für die Transkription umgewandelt.

2.9 Interleukine mit dem Vertreter IL-12

Interleukine (IL) sind Peptidhormone, die zu den Zytokinen zählen, d.h. körpereigene Botenstoffe der Zellen des Immunsystems. Sie sind beteiligt an der Kommunikation zwischen Leukozyten, aber auch zwischen anderen an der Immunreaktion beteiligten Zellen. Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden sie in verschiedene durch Zahlen klassifizierte Untergruppen eingeteilt (IL-1 bis zurzeit IL-32).

Die Wirkung der einzelnen Interleukine ist höchst verschieden. Während z.B. IL-2 von T-Zellen ausgeschüttet wird und das Wachstum dieser Zellen fördert, hemmt z.B. IL-10 die Aktivität von Makrophagen und dämpft somit die Abwehrreaktion ein. Interleukine regen also spezifisch bestimmte Zellen des Immunsystems zu Wachstum, Reifung und Teilung an oder verhindern genau diese Prozesse.

Die Interleukin-12 (IL-12) Familie sind mit die wichtigsten Zytokine für die angeborene Immunantwort (Trinchieri, G. 1995). Sie werden für die Differenzierung von Th1-Zellen benötigt. IL-12 veranlasst die Sekretion von IFN γ , interagiert mit ruhenden Natürlichen Killerzellen (NK), aktiviert CD 8⁺ T-Zellen zu zytotoxischer Aktivität und führt zur Aktivierung von Makrophagen, die wiederum dadurch ihrerseits veranlasst werden, intrazellulär infizierte oder entartete Zellen zu beseitigen (Trinchieri, G. 1995).

Weiterhin differenziert IL-12 native T-Zellen zu Th1-Effektor Zellen und unterdrückt gleichzeitig die Th2-Differenzierung, die wiederum die humorale Immunität bei der Pro-

duktion von Immunglobulinen wie IgG1, IgE und IgA kontrolliert (Murphy, K. M. et al. 2000)

Im Gegensatz zu den positiven Eigenschaften von IL-12 in der Wirtsverteidigung, kann übermäßige IL-12 Sekretion zu Autoimmunerkrankungen oder Transplantatabstoßung führen (Gately, M. K. et al. 1998); (Gazzinelli, R. T. et al. 1996). Zur IL-12-Familie gehören IL-12, IL-23 und IL-27. Funktionell ist IL-12 ein Heterodimer aus p35 und p40. IL-23 ist ein über Disulfidbrücken verknüpftes Heterodimer aus p19 und IL-12p40. Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und Dendritische Zellen produzieren Zytokine der IL-12-Familie.

In dieser Arbeit wurde nun die mRNA Expression von IL-12p40 im Gehirn und in der Leber nach repetitiver CpG-ODN-Gabe untersucht, da bekannt ist, dass CpG ein spezifischer Aktivator von IL-12p40 im Vergleich zu LPS ist (Dalpke, A. H. et al. 2002) und selbstverständlich auch ein Marker für eine Aktivierung des Immunsystems im Allgemeinen ist.

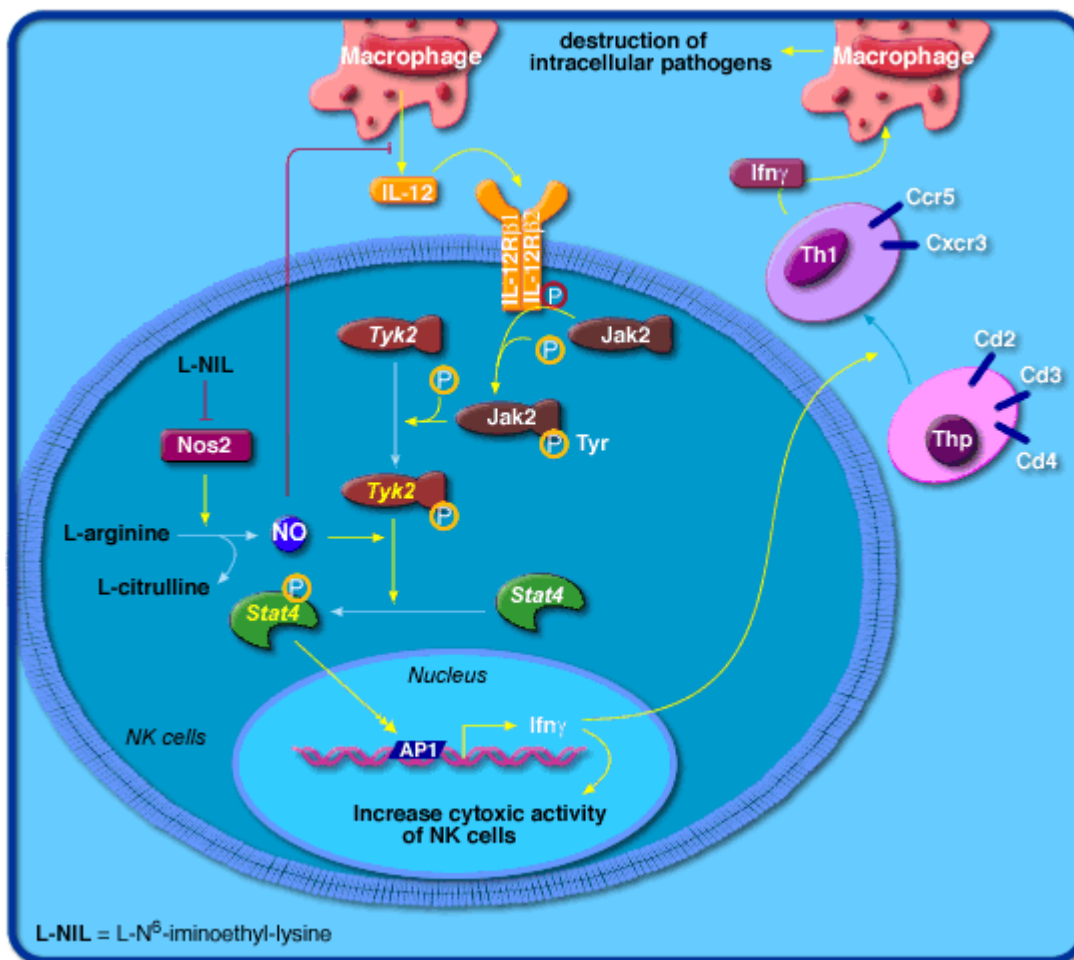


Abbildung 5: NO-2 abhängige IL-12 Signalkaskade in Natürlichen Killerzellen

(Quelle: www.biocarta.com)

Makrophagen und NK Zellen unterstützen das angeborene Immunsystem bei Infektionen mit intrazellulären Krankheitserregern und kommunizieren untereinander, um diesen Prozess zu regulieren. Werden Makrophagen stimuliert, sezernieren sie IL-12, das essentiell für die Aktivierung der zytotoxisch wirkenden NK Zellen ist. IL-12 stimuliert die Antwort der NK Zellen durch die Aktivie-

rung der JAK/STAT Signalkaskade. Sobald IL-12 an seinen Rezeptor auf NK Zellen bindet, kommt es zur Phosphorylierung des Tyrosins und somit zur Aktivierung von JAK2 und einer anderen JAK Kinase, TYK2. TYK2 wiederum phosphoryliert den Transkriptionsfaktor STAT4, der dann in den Kern wandern kann und dort Gene aktiviert, einschließlich der Expression von IFN γ . IFN γ und IL-12 induzieren die Differenzierung von TH1 T-Helfer Zellen, die ihrerseits durch IFN γ Makrophagen aktivieren.

2.10 Die STAT Familie mit dem Vertreter STAT3

Bis heute sind sieben STATs (Signal transducers and activators of transcription) bei Säugetieren identifiziert (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6). Die Aktivität von STATs wird mit Hilfe von Phosphorylierung gesteuert.

Nach Phosphorylierung der Tyrosinreste bilden die STATs Homo- oder Heterodimere und wandern in den Zellkern, wo sie Zielgene aktivieren (Kimmelman, A. et al. 2001). Die wichtigste Phosphorylierung für STAT3 geschieht am Serin 727. Die Signalkaskade von STAT3 wird aktiviert über Rezeptoren für verschiedene Zytokine wie EGFR (epidermal growth factor receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) und den Rezeptor für CSF-1 (colony-stimulating factor-1) (Kimmelman, A. et al. 2001). Besonders beeinflusst wird, durch eine Hochregulierung von STAT3 das Zell-Überleben und der Übergang von der G1 in die S Phase durch die Induktion verschiedener Zytokine und Onkogene. STAT3 wirkt auf mehrere Zielgene, die am Zellzyklus beteiligt sind. Zu nennen sind hier c-myc, Zyklin A, Zyklin D2 und Zyklin D3 (Hirano, T. et al. 2000). Eine erhöhte Expression von STAT3 konnte sowohl in menschlichen Primärtumoren als auch in neoplastischen Zelllinien einschließlich Brustkrebs nachgewiesen werden (Garcia, R. et al. 1998); (Sartor, C. I. et al. 1997); (Watson, C. J. et al. 1995).

Die phosphorylierte Form des Proteins spielt als Aktivator für die Gentranskription im Verlauf des Zellzyklus und als Inhibitor für Gene, die an der Apoptose beteiligt sind eine große Rolle. Die Stelle der Phosphorylierung dürfte für die biologische Aktivität von STAT3 eine wichtige Rolle spielen. STAT3 kann entweder am Tyrosin-705 oder am Serine-727 phosphoryliert sein. Die Tyrosin-Phosphorylierung wird vermittelt durch Janus-Kinasen (JAKs) und ist hauptsächlich für die Translokation von Kernproteinen und DNA Bindung zuständig. Die Serine-Phosphorylierung findet durch mitogen-aktivierte Proteinkinase statt. Die Phosphorylierung von STAT3 wird kontrovers diskutiert, aber die meisten Daten sprechen für eine positive Bedeutung der Phosphorylierung am Serine-727 (pSTA3-ser727) (Levy, D. E. et al. 2002)

STATs sind Transkriptionsfaktoren, die von JAK Kinasen phosphoryliert werden, als Antwort auf die Aktivierung eines Zelloberflächenrezeptors durch Zytokine. Nach der Aktivierung bilden die STATs Dimere und wandern in den Nukleus, wo sie die Transkription von Zytokin-abhängigen Genen aktivieren. Insgesamt sind an diesem komplexen Signaltransduktionsweg drei JAK Kinasen und sechs STAT Proteine beteiligt. Sowohl STAT3 als auch STAT5 sind für den Verlauf des Zellzyklus zuständig, sie beugen Apoptose vor und regulieren Onkogene, wie c-myc und bcl-X hoch und spielen dadurch vermutlich eine Rolle bei der Onkogenese. STAT3 soll außerdem eine wichtige Rolle in der Hämatopoese spielen. Die Wichtigkeit von STAT3 wird dadurch untermauert, dass Mäuse, denen STAT3 fehlt, die Embryogenese nicht überleben. Auch andere Signalkaskaden wie die von mTOR (Ziel von Rapamycin oder der p70 S6 Kinase) oder der MAP Kinase führen zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von STAT3.

In der Literatur sind bereits Studien bekannt, in denen durch einmalige CpG-ODN-Applikation eine kurzfristige STAT3 Expression im Gehirn beschrieben ist (Sako, K. et al. 2005).

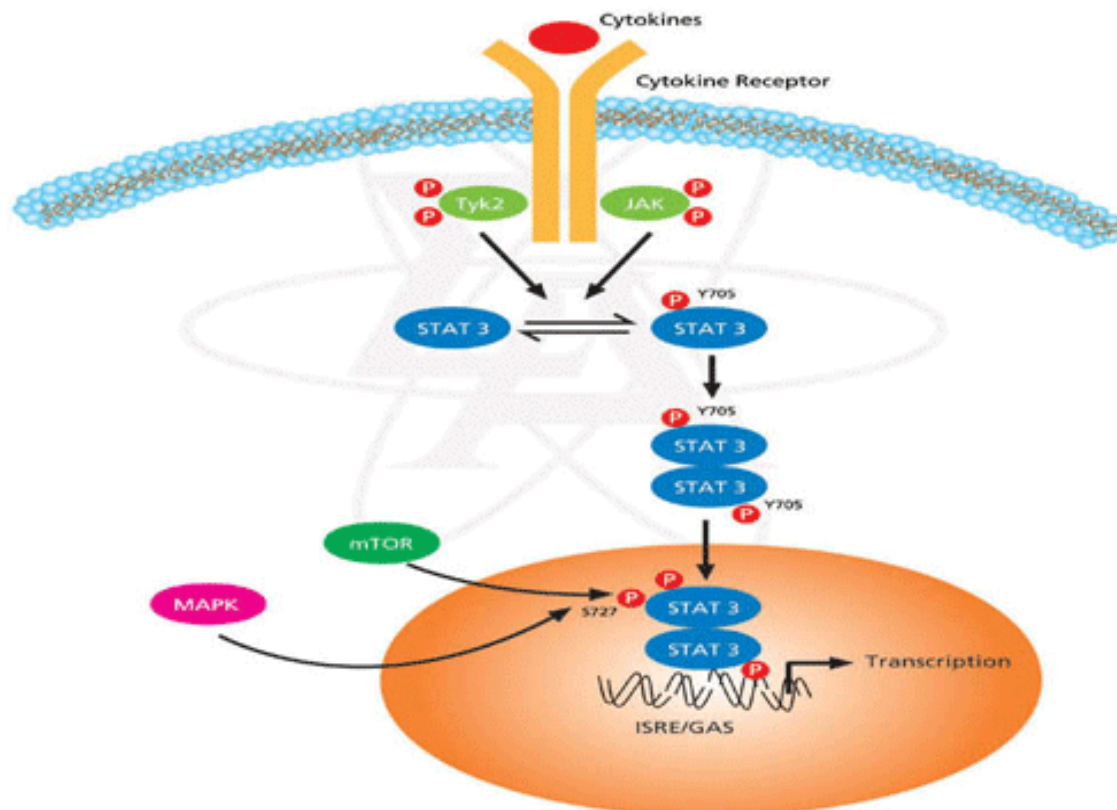


Abbildung 6: Die STAT3 Signalkaskade

(www.sigma.com)

STATs (Signal Transducers and Activators of Transkription) sind Transkriptionsfaktoren, die durch JAK Kinasen phosphoryliert werden. STAT3 spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Die Wichtigkeit von STAT3 wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass knock out Tiere die Embryogenese nicht überleben. Auch Signaleffekte anderer Signalkaskaden außer den JAK Kinasen führen zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3. Dazu gehören die mTOR (das Angriffsziel von Rapamycin im menschlichen Organismus oder p70 S6 Kinase) und die MAP Kinasen Signalkaskade, die ebenfalls in der Lage sind, STAT3 zu aktivieren und den Signalweg in Gang zu bringen.

2.11 Problemstellung

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine intraperitoneale, repetitive Gabe von CpG-ODN zu einer Verlängerung der Inkubationszeit bei Prioninfektionen führt (Sethi, S. et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe bestätigen dies (Spinner, D. S. et al. 2007). Bezüglich der Mechanismen, die einer Protektion bei der mehrmaligen Gabe von CpG-ODN zugrunde liegen, besteht weitgehend Unklarheit. Studien haben gezeigt, dass die Induktion Th1-assoziiertes Antikörper (Sethi S. et al. 2005), sowie eine Vermehrung der Makrophagenpopulation (Sethi, S. et al. 2005) dabei eine Rolle spielen.

Da eine Prioninfektion sich vornehmlich im Gehirn abspielt, ist es von großem Interesse herauszufinden, ob eine mehrmalige Gabe von CpG-ODN dazu genutzt werden kann, im Gehirn eine längerwährende Immunität zu induzieren. Bisher ist in der Literatur nur eine kurzfristige Immunstimulation im Gehirn nach einmaliger i.p. Gabe von CpG-ODN beschrieben (Takeshita, S. et al. 2001); (Dalpke, A. H et al. 2002). Daher ist ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit, die Untersuchung der immunstimulierenden Wirkung von repetitiver CpG-ODN-Gabe auf das Gehirn.

Eine andere Frage ist, ob es zu pathologischen Veränderungen nach mehrmaliger CpG-ODN-Gabe kommt. Die meisten Studien haben gezeigt, dass bei einer nicht zu hohen Dosierung von CpG-ODN, nach mehrmaliger Applikation keine pathologischen Veränderungen auftreten (Klinman, D. M. et al. 1999); (Sethi, S. et al. 2005). Wenn allerdings extrem hohe Dosierungen eingesetzt werden, die doppelt so hoch sind wie in den von Sethi et al. 2002 beschriebenen Versuchen, kann es zu pathologischen Veränderungen kommen (Heikenwalder, M. et al. 2004). Daher ist es von Interesse herauszufinden, ob es bei der ursprünglich verwendeten niedrigeren Dosis von Sethi et al. 2002 bereits zu pathologischen Veränderungen im Gehirn oder in der Leber kommt.

In diesem Sinne ist diese Arbeit ausgerichtet, die zum ersten Mal die immunmodulatorischen Effekte und den zeitlichen Verlauf von mehrmaliger intraperitonealer CpG-ODN-Applikation im Gehirn und der Leber mittels Real-time PCR und Immunhistologie untersucht.

Begutachtet wird die Expression der mRNA von IL-12p40, TNF α , IFN γ , C1q und STAT3 in Zusammenhang mit der Häufigkeit der Applikation und dem Zeitraum nach der letzten CpG-ODN-Applikation. Zusätzlich werden die Organe histologisch auf toxische Effekte von CpG-ODN untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist, den immunstimulatorischen Effekt von repetitiver CpG-ODN-Gabe besser zu verstehen und mit der Repetition die Wirkung zu verlängern, um CpG-ODNs somit als Therapeutikum, bei bakteriellen Infektionen, Tumoren und gerade bei Pri- onkrankheiten wirkungsvoll einsetzen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Tierversuch und Tierhaltung

Insgesamt 112 je 8 Wochen alte weibliche C57/BL6 Mäuse von Charles River (Sulzfeld Deutschland) wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser, der Gesundheitszustand wurde regelmäßig von den Tierärzten und Tierpflegern des Instituts kontrolliert.

Die Tiere wurden in 12 Gruppen zu je 10 Tieren unterteilt. 5 Mäuse pro Gruppe waren für Kryohistoblöcke bestimmt, die anderen 5 für natives Schockgefrieren. Den Mäusen wurden täglich synthetische Oligodeoxynucleotide intraperitoneal verabreicht. Für die dafür verwendeten CpG-ODN 1826 ist eine stimulierende Wirkung auf das angeborene Immunsystem aufgrund der zwei enthaltenen CG Sequenzen (TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT) beschrieben (Elvin, S. J. et al. 2006).

Als Negativkontrolle (Neg-ODN) wurde ODN 1982 verwendet. Es enthält keine CG Sequenzen (TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT).

Beide Sequenzen wurden durch einen phosphorylierten Hintergrund Nuklease-stabiler gemacht. Die synthetischen Oligodeoxynucleotide wurden bei MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Je 10 Mäuse einer Gruppe erhielten nun an 5 aufeinander folgenden Tagen täglich eine intraperitoneale Injektion von 32µg (5nmol) CpG-ODN 1826 (5x-CpG-ODN behandelte Mäuse), oder sie erhielten an 7 aufeinander folgenden Tagen eine tägliche Injektion von 32µg (5nmol) CpG-ODN 1826 (7x-CpG-ODN behandelte Mäuse) bzw. an 21 aufeinander folgenden Tagen (21x-CpG-ODN behandelte Mäuse).

Die Kontrollgruppen erhielten jeweils 5/7/21 mal 0,9% NaCl-Lösung (Braun Melsungen AG, Deutschland) (5x-NaCl behandelte Mäuse; 7x-NaCl behandelte Mäuse, 21x-NaCl behandelte Mäuse) oder 32µg (5nmol) ODN 1982 (5x-Neg-ODN behandelte Mäuse, 7x-Neg-ODN behandelte Mäuse, 21x-Neg-ODN behandelte Mäuse). Die Tiere wurden nun nach 5, 7 oder 28 Tagen während bzw. nach der Behandlung durch eine Äthernarkose getötet.

Die Organe der Mäuse wurden entnommen, von den 10 Mäusen jeder Gruppe wurden jeweils 5 in Tissue Tek (Sakura, Japan) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, während die jeweils anderen 5 Organe nativ in einem Eppendorf-Röhrchen ebenfalls in flüssigen Stickstoff schockgefroren wurden.

Die Lagerung aller Organe erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

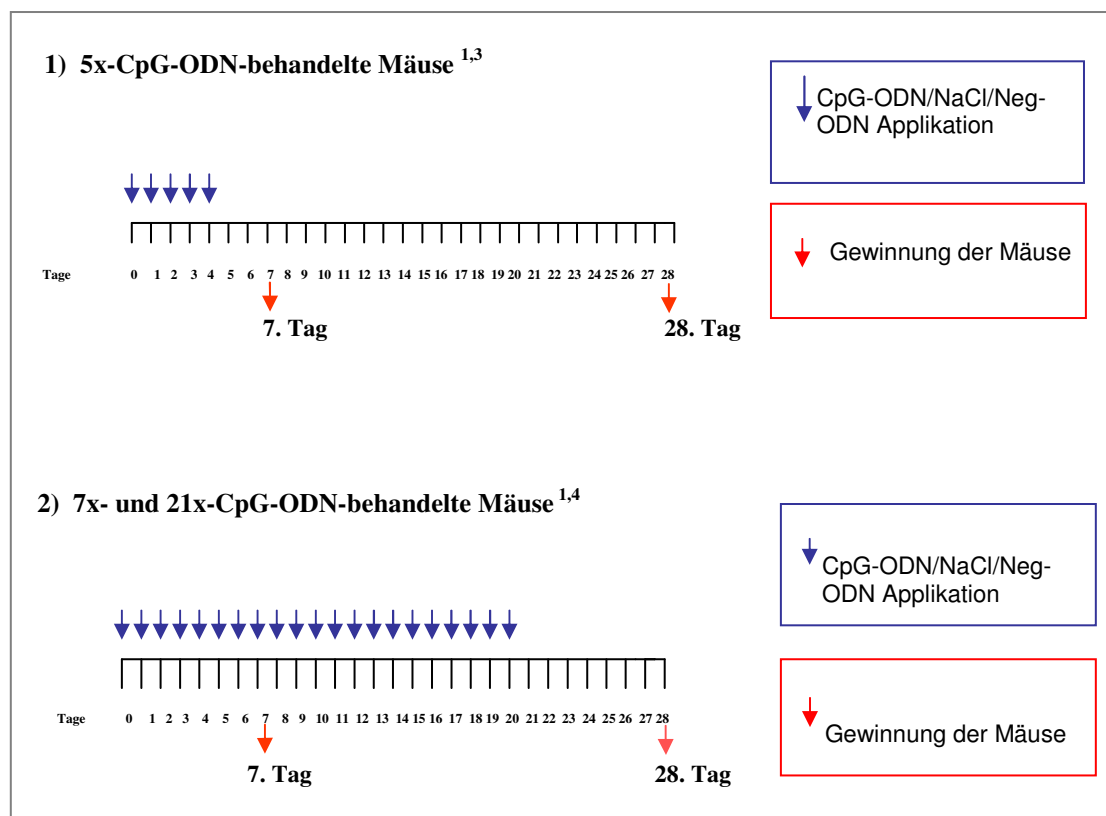


Abbildung 7: Multiple Applikation von CpG Oligodeoxynukleotiden

¹ Kontrollen wurden mit NaCl bzw. Neg-ODN an identischen Zeitpunkten behandelt
 blaue Pfeile: Zeitpunkte der Applikation von CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN
 rote Pfeile: Zeitpunkte der Gewinnung von Mäusen nach der ersten CpG-ODN-Applikation; das Zeitintervall zwischen letzter Applikation und der Gewinnung der Mäuse betrug bei der 7x-CpG-ODN an Tag 7 getöteten Gruppe 18h.

³ Gewinnung der Mäuse: 5x-CpG-ODN behandelte Mäuse

7 Tag: 5 aufeinander folgende Applikationen, Gewinnung der Mäuse an Tag 7

28 Tag: 5 aufeinander folgende Applikationen, Gewinnung der Mäuse an Tag 28

⁴ Gewinnung der Mäuse: 7x-CpG-ODN-behandelte Mäuse und 21x-CpG-behandelte Mäuse

7 Tag: 7 aufeinander folgende Applikationen, Gewinnung der Mäuse 18h nach der letzten Applikation

28 Tag: 21 aufeinander folgende Applikationen, Gewinnung der Mäuse an Tag 28

3.2 Material

3.2.1 Puffer und Lösungen

Tris Puffer

60,55 g Tris Base, 87,66 g NaCl

in 300ml a. dest. lösen, mit konz. HCL auf pH 7,6 einstellen und auf 1000ml mit a. dest auffüllen= Stammlösung

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 verdünnt mit VE Wasser

PBS Puffer

12,7 g Na₂ HPO₄

3,9 g Na H₂PO₄

85 g NaCl

	In dieser Reihenfolge in 1000ml a. dest. lösen= Stammlösung
	Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 verdünnen und auf pH 7,3 einstellen
TAE Puffer	242,2 g/l 2M Tris und 37,2g/l 100mM EDTA einwiegen und auf 500ml mit VE Wasser auffüllen. Mit konz. Essigsäure auf pH 8 einstellen; anschließend auffüllen auf 1000ml = Stammlösung x50 Gebrauchslösung: 1 Teil Stammlösung auf 49 Teile VE Wasser
DAB Lösung	1 Tablette in 10ml Tris Puffer, Lagerung bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung
Pararosanilin-Lösung für Chloracetatfärbung	1.) 50 mg Pararosanilin in 3 ml HCl heiß lösen, abkühlen 2.) 2 ml eisgekühltes 1 M Na Nitrit (0,69 g Na Nitrit + 10 ml a. dest.) unter Schütteln bis zum Farbumschlag von braun nach gelb zu 1. geben (wurde aliquotiert und eingefroren bei -20°C) 3.) 18 mg Naphtol-AS-D-Chloracetat wurden in 1 ml Dimethylformamid gelöst, und zur unter 2.) entstandenen Lösung gegeben und mit PBS pH 7,3 auf 100 ml aufgefüllt. Der flockige Niederschlag wurde filtriert.

3.2.2 Chemikalien

Aquamount	Immumount
Brij 35	Sigma
BSA, Serum-Albumin vom Rind	AmpliChem
Eosin	Merck
Ethanol, absolut	Merck
DAB (Diaminobenzidin) Tabletten	Dako
Hämalaun	Merck
Isopropanol	Fluka
NaCl	Merck
Na₂ HPO₄	Merck
Na H₂PO₄	Merck
NaOH	Merck
Tissue Tek	Sakura
Trisbase	Sigma

Trizol	Invitrogen
Xylol	Merck
Wasser	Millipore
DEPC Wasser	Amplichem
RNase off	Amplichem
Chloroform	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck
Agarose	Merck
SYBR Gold	Roche
H₂O₂	Merck
Pararosanilin	Merck
Na Nitrit	Merck
Naphtol-AS-D-Chloracetat	Sigma
Dimethylformamid	Merck
Mausnormalserum	Dako
Coverquick	Labonord

3.2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Mastercycler	Eppendorf
Lightcycler	Roche
Einmalpasteurpipetten	VWR
Objektträger Superfrost	VWR
Kryostat 3540	Leica
Photometer	Nano Drop
Lightcycler Kapillaren 20µl	Roche

3.2.4 Antikörper

3.2.4.1 Primärantikörper

Rat anti mouse CD 11 b (1:20 Gehirn; 1:100 Leber)	Serotec
Rabbit anti mouse GFAP (1:500 nur Gehirn)	Dako
Rat anti mouse B220 (1:20 nur Leber)	BD Pharmingen
Rat anti mouse CD 8 alpha (1:100 nur Leber)	Serotec

3.2.4.2 Sekundärantikörper

Rabbit anti rat biotinyliert (1:100)	Dako
Goat anti rabbit biotinyliert (1:100)	Dako

3.2.4.3 Tertiärantikörper

Streptavidin (1:100)	Dako
-----------------------------	------

3.2.5 Kits

Mini Kit	Qiagen
cDNA Synthese Kit (Superscript II)	Invitrogen
Lightcycler-Fast Start DNA Master Plus SYBR Green	Roche

3.2.6 Primer

Der Literatur entnommen und auf ihre Richtigkeit überprüft wurden die Primer für IL-12p40 (Sonobe, Y. et al. 2005) und IFN γ (Byun, H. J. et al. 2007). Die Primer für TNF α , C1q, GAPDH, GFAP und STAT3 wurden mit Hilfe des Primerdesignprogramms LC Probe Design entworfen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer jeweils Intron-Exon Grenzen überspannen, um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen.

Alle Primer wurden von MWG (Ebersberg, Germany) bezogen. Die Primer wurden nach Herstellerangaben in RNase freiem Wasser gelöst und für den Gebrauch nochmals im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Zielgen	Sequenz (5'-3')	Acc. Nr.	Länge (bp)
GAPDH		NM_008084	175bp
Sense Primer	GAG AAA CCT GCC AAG TAT GA		
Antisense Primer	GGA TGG AAA TTG TGA GGG		
GFAP		NM_010277	225bp
Sense Primer	AGT CCC TCC GCG GCA CGA ACG A		
Antisense Primer	ACC ATC CCG CAT CTC CAC AGT CTT TAC CAC		
TNF α		NM_013693	275 bp
Sense Primer	ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC		

Antisense Primer TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT

Clq NM_009777 193 bp

Sense Primer CCA ACG CGA ACG AGA ACT AT

Antisense Primer GTG GTC ACC TGG AAG GTG TT

STAT3 NM_213659-variant1 286 bp

Sense Primer GCT ATA AGA TCA TGG ATG CG

Antisense Primer CGT GAG CGA CTC AAA C

IFN γ NM_08337 129 bp

Sense Primer GCG TCA TTG AAT CAC ACC TG

Antisense Primer TGA GCT CAT TGA ATG CTT GG

IL-12p40 BC103608 80 bp

Sense Primer GAG CAC TCC CCA TTC CTA CT

Antisense Primer CCC TCC TCT GTC TCC TTC AT

3.3 Methoden

3.3.1 Das Prinzip der Real-time PCR

Die Real-time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geruht. Sie bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen kann während (daher der Name „Real Time“) bzw. am Ende eines PCR-Zyklus eine Quantifizierung durchgeführt werden. Dadurch unterscheidet sie sich von herkömmlichen quantitativen PCR Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden (z.B. kompetitive PCR). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig, die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering.

Mithilfe der Real-time PCR kann man auch homozygote von heterozygoten Zellen unterscheiden.

Für die Real-time-PCR wird oft die Abkürzung RT-PCR verwendet, was aber zu Verwechslungen führen kann, da auch die Reverse-Transkriptase-Polymeraseketten-Reaktion so abgekürzt wird. Korrekt wird in diesem Fall also von quantitativer Real-time RT-PCR gesprochen.

3.3.1.1 Detektionsmethoden

3.3.1.1.1 Interkalierende Farbstoffe

Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA Farbstoffen (z.B. Ethidiumbromid oder SYBR Green I). Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein (interkalieren) bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der untersuchten DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Außerdem können keine Multiplex-Messungen durchgeführt werden.

Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anhand dieser wird die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität bestimmt. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (50°C → 95°C). Bei einer Fragment-spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff (z.B. SYBR Green I) freigesetzt und es wird eine Fluoreszenzzunahme registriert, da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere. So ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. In dieser Arbeit wurde mit SYBR Green I gearbeitet.

3.3.1.1.2 FRET-Sonden

Eine andere Möglichkeit ist, den Förster resonance energy transfer (FRET) auszunutzen. Ein Donor-Fluorochrom (Reporter), das durch eine Lichtquelle angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie an ein sich in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (bzw. einen "dunklen" Quencher) ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Diese Methode ist sehr aufwendig und teuer, bietet aber die Vorteile der hohen Spezifität des Essays.

3.3.1.1.3 LightCycler-Sonden (auch Hybridisierungs-Sonden)

Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des FRET zur Quantifizierung von Nukleinsäuren besteht in der Verwendung von LightCycler-Sonden. Zwei verschiedene, jeweils mit einem FRET-Donor bzw. FRET-Akzeptor markierte Oligonukleotide, die nebeneinander an die Ziel-Sequenz binden und damit die Fluorochrome in eine für den FRET ausreichende Nähe bringen, können als Sonden für die Quantifizierung der PCR-Produkte eingesetzt werden.

3.3.1.1.4 TaqMan®-Sonden (auch Hydrolyse-Sonden)

Eine weitere häufig genutzte Möglichkeit des FRET besteht in der Anwendung einer Sonde, die an ihrem einen Ende mit dem Quencher, an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. TAMRA und FAM) markiert wird (Double-Dye-Oligos, TaqMan®-Sonde). Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich eine Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.

3.3.1.1.5 *Molecular Beacons*

Eine weitere Möglichkeit der Echtzeit-Quantifizierung von PCR-Produkten unter Ausnutzung des FRET bietet die Nutzung von Molecular Beacons als Sonden. Molecular Beacons sind Oligonukleotide, die sowohl mit einem Reporter-Fluorophor als auch mit einem Quencher gekoppelt sind. Die Nukleotide am 5'-Ende der Sonde sind denen am 3'-Ende komplementär, so dass sich eine für Molecular Beacons charakteristische Sekundärstruktur ausbilden kann. In diesem als stem-loop (=Stamm-Schleife) bezeichneten Zustand zeigt der Reporter durch seinen geringen Abstand zum Quencher keine Fluoreszenz. Durch Anlagerung der Schleifen-Region an eine komplementäre DNA-Sequenz während eines PCR-Zyklus wird der Abstand zwischen Quencher und Reporter vergrößert. Eine Reporter-Fluoreszenz kann somit beobachtet werden.

3.3.1.1.6 *Scorpion-Primer*

Scorpion-Primer sind komplexe Oligonukleotide, welche die Eigenschaften von Real-Time-PCR-Sonden und PCR-Primern in einem (Uni-Scorpion) oder zwei Molekülen (Bi-Scorpion) vereinigen. Ähnlich den Molecular Beacons besitzen sie eine charakteristische Sekundärstruktur mit einer selbstkomplementären Schaft-Region, deren Enden mit einem Reporter-Fluorophor und einem Quencher modifiziert wurden. Zusätzlich tragen diese Sonden am 3'-Ende einen PCR-Primer. Während eines PCR-Zyklus kann mit steigender DNA-Konzentration eine Reporter-Fluoreszenz durch Anlagerung der Loop-Region an eine komplementäre DNA-Sequenz und ein damit verbundener vergrößerter Abstand zwischen Quencher und Reporter beobachtet werden.

3.3.1.1.7 *Lux®-Primer*

Lux[®]-Primer sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotide, deren Fluoreszenzintensität von ihrer jeweils chemischen Umgebung abhängt. Werden diese Primer während einer PCR in eine DNA eingebaut, kann eine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden (www.wikipedia.de).

3.3.1.2 **Das Lightcycler Instrument**

Der Lightcycler besteht im Wesentlichen aus einem Thermocycler (Wittwer, C. T. et al. 1990) und einer optischen Einheit. Im Thermocycler wird die Temperatur während der einzelnen Schritte der PCR reguliert. Im Gegensatz zum Heizblock der konventionellen PCR wird hier Raumluft durch einen kleinen Ventilator in das Instrument und dort über eine Heizspirale geleitet und erwärmt. Aufgrund der geringen Wärmekapazität der Luft ermöglicht dies eine sehr schnelle Temperaturänderung des Probenmaterials von bis zu 20°C/Sekunde sowie eine Genauigkeit von $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$. In dieser Einheit befindet sich weiterhin das Probenkarussell, in dem 32 Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Probenvolumen von je 20 bzw. 100 μl Platz finden. Das große Oberflächen- zu Volumen-Verhältnis der Glaskapillaren begünstigt dabei ebenfalls die kurze Zyklendauer durch rasches Aufheizen und Abkühlen der Proben in den Kapillaren. Ein Motor im Probenkarussell bringt die einzelnen Kapillaren in die korrekte Position zur optischen Einheit. Dort findet die Detektion der PCR Produkte statt. Die optische Einheit misst über Photodioden die Fluoreszenz, die von der Spitze der Kapillare ausgeht. Damit kann die Amplifikation in Echtzeit am Monitor simultan dargestellt und verfolgt werden. Die Messzeit pro Kapillare liegt bei ca. 20 Millisekunden. Die Analyse der Daten erfolgt durch die Lightcyclersoftware (Version 3.5). Mit dem Lightcycler lässt sich somit eine komplette PCR in weniger als einer Stunde durchführen.

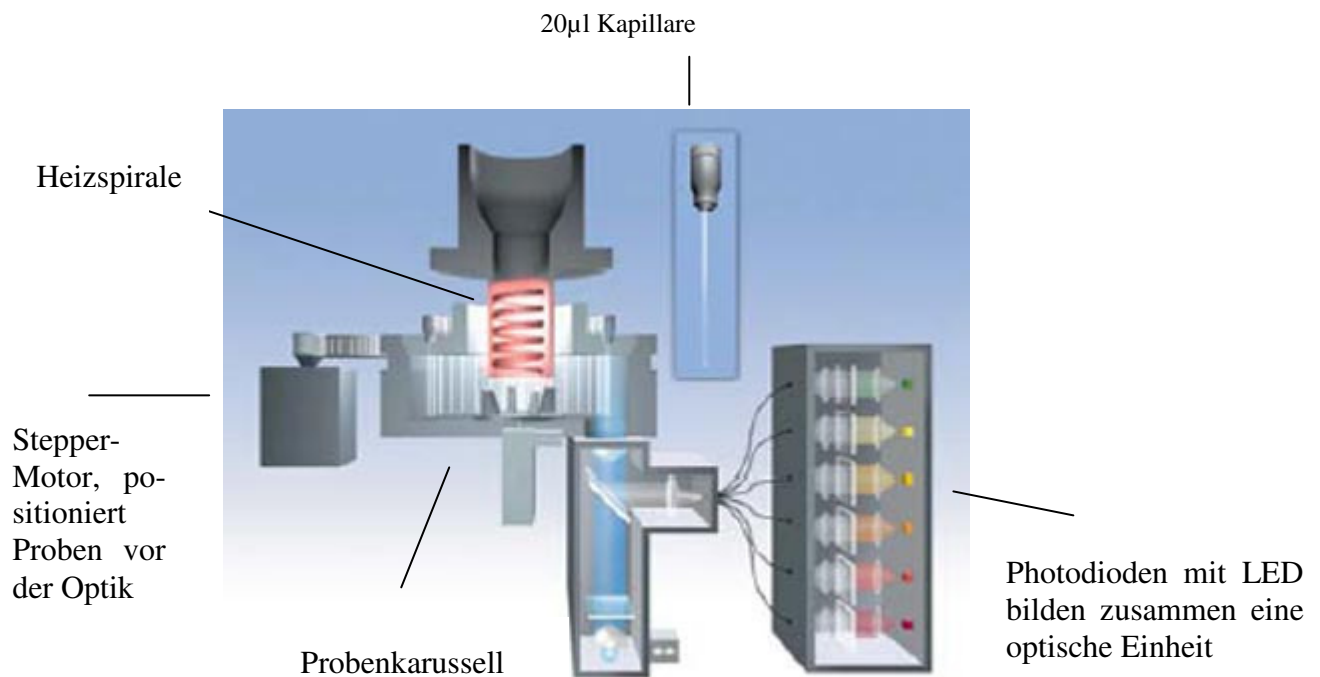


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Lightcyclers

(Quelle: Roche)

3.3.1.3 Quantifizierung

Für die Quantifizierung können verschiedene Rechenmodelle herangezogen werden. In den meisten Fällen wird ein Referenzgen (z.B. GAPDH oder β -Aktin) mit gemessen, um einen relativen Mengenvergleich zu bekommen (relative Quantifizierung). Andere, weit-aus kompliziertere Methoden ermöglichen eine absolute Quantifizierung, wobei die genaue Anzahl der in der Probe vorhandenen Templates bestimmt werden kann.

3.3.1.3.1 CT-oder auch Cp-Wert

Der Verlauf einer PCR lässt sich in drei Phasen unterteilen. Zuerst eine frühe Phase, bei der die Templatmenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen suboptimal ist. In der frühen Phase übertreffen Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produktes. Die zweite Phase ist eine exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase). Die dritte Phase wird als Plateau-Phase bezeichnet. Hier ist die Menge des DNA Produktes derart angestiegen, dass es zur Hemmung durch dieses kommt. Produktfragmente hybridisieren jetzt häufiger miteinander. Die Substrate werden langsam verbraucht und letztlich werden die Polymerasen und Nukleotide durch die Hitze langsam zerstört. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet daher nur in der Log-Phase statt. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können wird häufig der CT-Wert (Threshold Cycle= „Schwellenwert-Zyklus“) bzw. Cp-Wert (Crossing Point) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

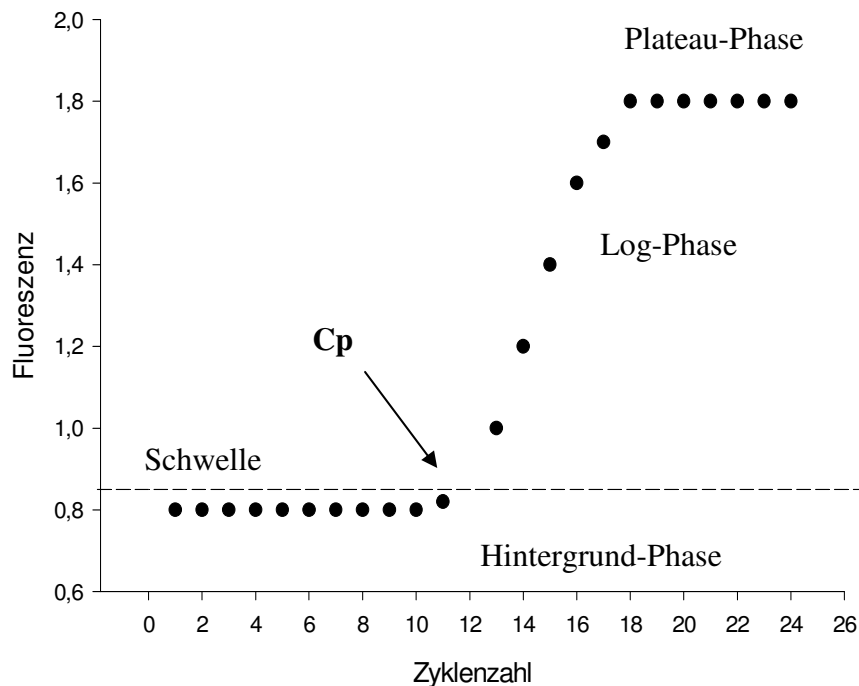


Abbildung 9: Phasen der PCR-Produktakkumulation

Darstellung der gemessenen Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl. Cp= Crossing Point

3.3.1.3.2 Effizienz

Die Effizienz kann auf verschiedene Arten berechnet werden, die sich in ihrem Ergebnis leicht unterscheiden. Die einfachste Art ist die Effizienz E mit Hilfe der Steigung m einer Standardkurve zu berechnen.

$$E=10^{-1/m}-1$$

Eine andere Möglichkeit ist die Darstellung der ermittelten Crossing Points (**Cp**) gegen die Kopienzahl (**T₀**) der Verdünnungen.

$$Cp=-(1/\log E)*\log T_0+(\log K/\log E)$$

(K) beschreibt die Kopienzahl am Crossing Point, die für alle Verdünnungen an diesem Punkt gleich ist. Die Amplifikationseffizienz (E) kann Werte zwischen größergleich 1 und kleinergleich 2 annehmen. Ein Wert von 2 entspricht der Verdoppelung der DNA pro PCR-Zyklus und damit der theoretisch besten Effizienz. Ein Wert von 1 ist hingegen gleichbedeutend mit keiner Amplifikation. Die Effizienz ist unter anderem von der Ziel-DNA abhängig. Da das Ausgangsmaterial dasselbe ist, liegen in den Verdünnungsstufen auch gleiche Amplifikationseffizienzen vor.

3.3.1.3.3 Absolute Quantifizierung

Eine absolute Quantifizierung ist aufwändig und fehleranfällig. So muss für diese Art der Quantifizierung beispielsweise die Effizienz der reversen Transkription bestimmt werden, die zwischen 5 und 95% liegen kann. Das wird z.B. durch die Verwendung synthetisierter RNA bekannter Mengen bewerkstelligt.

3.3.1.3.4 Relative Quantifizierung

Hierfür wird eine interne Kontrolle benötigt. Eine interne Kontrolle kann ein Gen-Transkript sein, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dieses wird als Normalisierung bezeichnet. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal basiert, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments. Die ideale interne Kontrolle ist leicht zu detektieren und seine Expression sollte während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung nicht variieren. Für diesen Zweck werden gerne die Housekeeping-Gene β -Aktin oder GAPDH verwendet.

Dabei entsteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem CT- Wert. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den CT-Wert konstruiert werden. Durch die Geradengleichung $x=(CT-b)/m$ kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden. Alle Proben werden normalisiert, indem die errechnete Kopienzahl des Target-Gens durch die Kopienzahl der internen Referenz geteilt wird: $\text{Gen (normalisiert)} = \text{Kopienzahl Target} / \text{Kopienzahl Referenz}$.

Die unterschiedliche Expression zweier Proben relativ zueinander lässt sich als Quotient darstellen und ergibt eine n-fache Expression: $\text{Gen (normalisiert) (Gruppe A)} / \text{Gen (normalisiert) (Gruppe B)} = n\text{-fache Expression Gruppe A zu Gruppe B}$.

3.3.1.3.5 Berechnung nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode

Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta$ -CT-Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reagenten. Die CT-Werte werden hierbei einfach voneinander abgezogen (Δ -CT), die beiden Δ -CT-Werte der einzelnen Gruppen (z.B. krank/gesund, mit/ohne Behandlung) werden weiterhin voneinander abgezogen ($\Delta\Delta$ -CT-Wert) und in die Gleichung $n\text{-fache Expression / Gruppe A zu Gruppe B} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt. Um die Genauigkeit der Methode noch zu erhöhen, wurde die Formel um die Effizienz des jeweiligen PCR-Ansatzes, die zuvor in einem Probelauf über eine Standardkurve bestimmt wurde, erweitert (www.wikipedia.de).

3.3.1.4 RNA Isolierung

Die Isolierung der RNA der Gehirne und Lebern erfolgte mittels TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben.

Von den zu untersuchenden Organen wurden immer 5 Stück gleichzeitig bearbeitet um eine ausreichend hohe Arbeitsgeschwindigkeit zu ermöglichen und um eine RNA Degenerierung möglichst auszuschließen. Die Organe, die bei -80°C gelagert waren, wurden auf Eis gestellt und es wurden so schnell wie möglich zu jedem Gehirn, die im Schnitt ca. 280g wogen und zu jeder Leber, die im Schnitt 380g wogen 3ml TRIzol zugegeben. Die Gehirne wurden daraufhin in einen Erlenmeyerkolben aus Glas überführt, der vorher mit

RNase off und DEPC Wasser gespült worden war. Nun wurden die Organe in dem Erlenmeyerkolben homogenisiert.

Nach vollständiger Homogenisation wurden die Proben zu jeweils einem Milliliter in neue 1,5ml Eppis aliquotiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10min und 12000g bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Eppli gekippt, die Zellreste verworfen. Das Gemisch wurde 5min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 200µl Chloroform dazugegeben. Die Proben wurden nun ca. 15sek von Hand geschüttelt und dann 3min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nun wurden die Proben 15min bei 4°C und 12000g zentrifugiert.

Durch diesen Ablauf erhält man nun 3 Phasen. Die unterste rosafarbene Phase besteht aus Phenol-Chloroform und enthält die DNA und die Proteine. Die mittlere Phase ist sehr schmal und weißlich und enthält ebenfalls einiges an Protein. Die oberste Phase ist wässrig und enthält die RNA.

Nun wurde ganz vorsichtig die wässrige, oberste Phase abpipettiert und in ein neues Eppli überführt. Es wurde penibel darauf geachtet nichts aus der Interphase zu verschleppen.

Jetzt wurden der wässrigen Phase 500µl Isopropanol zugesetzt, kurz geschüttelt und die Probe 10min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10min bei 4°C und 12000g zentrifugiert.

Dadurch entsteht ein Gel-artiges RNA Präzipitat, das sich am Boden absetzt. Das Isopropanol wurde vorsichtig und möglichst vollständig entfernt und das Pellet luftgetrocknet.

Nach der Trocknung wurden 1ml 75% Ethanol zugegeben und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

3.3.1.5 RNA clean up

Um eine hochwertige, reine RNA zu erhalten wurde an die TRIzol Isolierung eine Aufreinigung inklusive DNA Verdau, mit dem Mini Kit (Qiagen, Hilden), dem Protokoll des Herstellers folgend, angeschlossen.

Die durch TRIzol isolierten Proben wurden bei 7000g und 4°C für 5min zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Nun wurden 100µl H₂O dazugegeben und für 5min bei 55°C inkubiert um das Pellet vollständig zu lösen.

Den Proben wurden nun 350µl RLT Puffer und 250µl 100% Ethanol zugegeben und alles durch pipettieren gut vermischt.

Nun wurde das gesamte Volumen von 700µl auf eine RNeasy Mini Säule geladen und durch Zentrifugation für 15sek und 8000 g in ein 2 ml Röhrchen überführt.

Die durchgeflossene Flüssigkeit wurde verworfen und die RNeasy Mini Säule in ein neues 2ml Röhrchen überführt.

Es folgte die Zugabe von 350µl RW 1 Puffer mit anschließender Zentrifugation für 15sek bei 8000g. Der Durchfluss wurde verworfen.

Auf die Membran der Säule wurden nun 10µl DNase I Lösung und 70µl RDD Puffer zugegeben und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert, um einen möglichst vollständigen DNA Verdau zu gewährleisten.

Nun wurde die Säule nochmals mit 350µl RW 1 Puffer gespült. Der dazugehörige Zentrifugationsschritt wurde ebenfalls für 15sek bei 8000g durchgeführt.

Nun wurden 500µl RPE Puffer dazugegeben und das Ganze für 15sek und 8000g zentrifugiert, um die Säule zu waschen.

Der Durchfluss wurde abermals verworfen und es wurden nochmals 500µl RPE Puffer dazugegeben und diesmal für 2min bei 8000g zentrifugiert. Jetzt wurde die Säule sehr vorsichtig aus dem Röhrchen gehoben, um es zu keiner Ethanolverschleppung kommen zu lassen.

Die Säule wurde nun in ein 1,5ml Röhrchen gesteckt und 30µl RNase freies Wasser auf die Membran gegeben und für 1min bei 8000g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

3.3.1.6 Bestimmung des RNA Gehalts

Die Bestimmung des RNA Gehaltes erfolgte gleich im Anschluss an die RNA Aufreinigung. Der RNA Gehalt wurde mit einem Spektrophotometer (Nano, Drop, USA) gemessen. Dazu wurde das Gerät zuerst mit 1,5ml RNase freiem Wasser geeicht und dann der Leerwert anhand desselben Wassertropfens eingestellt.

Nun wurde erneut 1,5µl RNase freies Wasser aufgetragen und gemessen. Diese Prozedur wurde wiederholt bis bei 3 hintereinander gemessenen Wasserproben der gemessene Wert nicht mehr als $\pm 0,4$ von 0 abwich.

Nun wurde mit dem Messen der RNA Proben begonnen.

Es wurden ebenfalls 1,5µl Probe aufgetragen und gemessen. Jede Probe wurde mit einem jeweils neuen Tropfen zweimal gemessen und der Mittelwert gebildet. Außerdem wurde auf eine schöne Extinktionskurve bei der Wellenlänge 280/260 Wert gelegt, um eventuelle RNA Degenerationen auszuschließen. Der ungefähre durchschnittliche RNA Gehalt lag bei 2000ng/µl.

Nach der Messung wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.1.7 cDNA Synthese

Da man für die Real time PCR DNA benötigt, muss die RNA zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dies wird mit Hilfe der copy DNA bewerkstelligt.

Für die cDNA Synthese wurde immer eine RNA Menge von 3µg eingesetzt. Das war bei jeder Probe eine unterschiedlich große Menge in µl. Entsprechend dem RNA Gehalt wurde mit einer unterschiedlichen Menge an RNase freiem Wasser auf 11µl aufgefüllt. Nun wurden jeweils 1µl Oligo dT15 Primer (Konz: 500µg/ml) und 1µl 10mM dNTP Mix dazugegeben.

Die Mischung wurde kurz zentrifugiert, für 5min auf 65°C erhitzt, anschließend kurz auf Eis abgekühlt und noch mal kurz zentrifugiert.

Nun wurden 4µl 5x First-strand Puffer und 2µl 0,1 M DTT dazugegeben.

Das Ganze wurde durch pipettieren gut vermengt und bei 42°C 2min inkubiert.

Danach folgte die Zugabe von 1µl reverser Transkriptase in Form der Superscript II. Nach einer darauf folgenden Inkubation von 50min bei 42°C wurde die Temperatur für weitere 15min auf 70°C gesteigert.

Als Kontrolle wurde in jedem Lauf eine zusätzliche Probe wie oben beschreiben mitgeführt, bei der aber anstelle des Enzyms Superscript II RNase freies Wasser zugegeben wurde (RT^-), die dann bei der jeweiligen Real time PCR mitgetestet wurde um sicherzugehen, dass keine genomische DNA amplifiziert wird.

Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.1.8 Real-time PCR

Die mittlerweile gut etablierte Technik der Real-time PCR erlaubt eine sehr sensitive und spezifische Quantifizierung von Nukleinsäuren (Arya, M. et al. 2005); (Overbergh, L. et al. 2003); (Giulietti, A. et al. 2001).

Als Housekeeping-Gen wurde in dieser Studie das dafür geeignete GAPDH verwendet (Winer, J. et al. 1999).

Die Real-time PCR wurde mit dem Lightcycler (Roche, Deutschland) nach der SYBR Green Methode durchgeführt.

Die Bereitung des Master Mix erfolgte, indem pro Reaktion 12µl H₂O, je ein 1µl Primer (Konz. im Endvolumen 10µM) und 4µl SYBR Green vorgelegt wurden. Es wurde immer 1 Reaktion mehr angesetzt als benötigt wurde.

Die cDNA wurde, soweit nicht anders erwähnt 1:10 verdünnt. Es wurden Duplikate angesetzt und in die vorgekühlten Kapillaren pipettiert, so dass sich am Ende in jeder Kapillare 18µl Master Mix und 2µl cDNA befanden. Die Kapillaren wurden 15sek bei 700 g zentrifugiert. In jedem Lauf wurde eine Probe mitgeführt, in die statt cDNA H₂O gegeben wurde und eine Probe aus der cDNA Synthese, die keine reverse Transkriptase enthielt, um sicher zu gehen, dass keine genomische DNA mit amplifiziert wurde.

Außerdem wurde in jedem Lauf immer ein Duplikat eines sogenannten Kalibrators mitgeführt, das heißt, es wurde immer ein und dieselbe Probe mit amplifiziert, um Abweichungen zwischen den Läufen standardisieren zu können.

Für jedes Gen wurde außerdem eine Standardkurve erstellt mit den Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160. Für IL-12p40, IFN γ und TNF α wurden niedrigere Verdünnungstufen gewählt. Hier wurde eine Verdünnungsreihe mit unverdünnter cDNA, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 verwendet. Da es sich um „low copy Gene“ handelt, konnten bei den höheren Verdünnungen keine sicheren Ergebnisse erzielt werden.

Mit den Standardkurven konnte die Amplifizierungseffizienz bestimmt werden, die bei allen untersuchten Genen ~ 2 betrug.

Die Zyklusbedingen für die Amplifikation lauteten wie folgt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten, 45 Zyklen (50 für IL-12p40 und TNF α) bei 95°C für 10 Sekunden (Denaturierung), gefolgt von einer Annealingtemperatur (Hybridisierung) von 59°C (57°C für GAPDH, 62°C für IL-12p40) für 5 Sekunden und einer Elongation bei 72°C für 10 Sekunden. Es folgte eine finale Extension bei 40 °C für 30 Sekunden. Die entstandenen Schmelzkurven wiesen jeweils nur einen Peak auf, was auf eine spezifische Amplifikation der entsprechenden Gene zurückzuführen ist. In der negativ- und RT⁻ Kontrolle fanden sich keine Peaks. In seltenen Fällen kam es zu einem Peak an anderer Stelle als der Gen-spezifische Peak selbst, was auf die Bildung von Primerdimeren zurückzuführen ist. Da diese Peaks jedoch nicht auf den, für das Gen spezifischen Peaks und des Weiteren in einem niedrigerem Temperaturbereich liegen, können sie vernachlässigt werden.

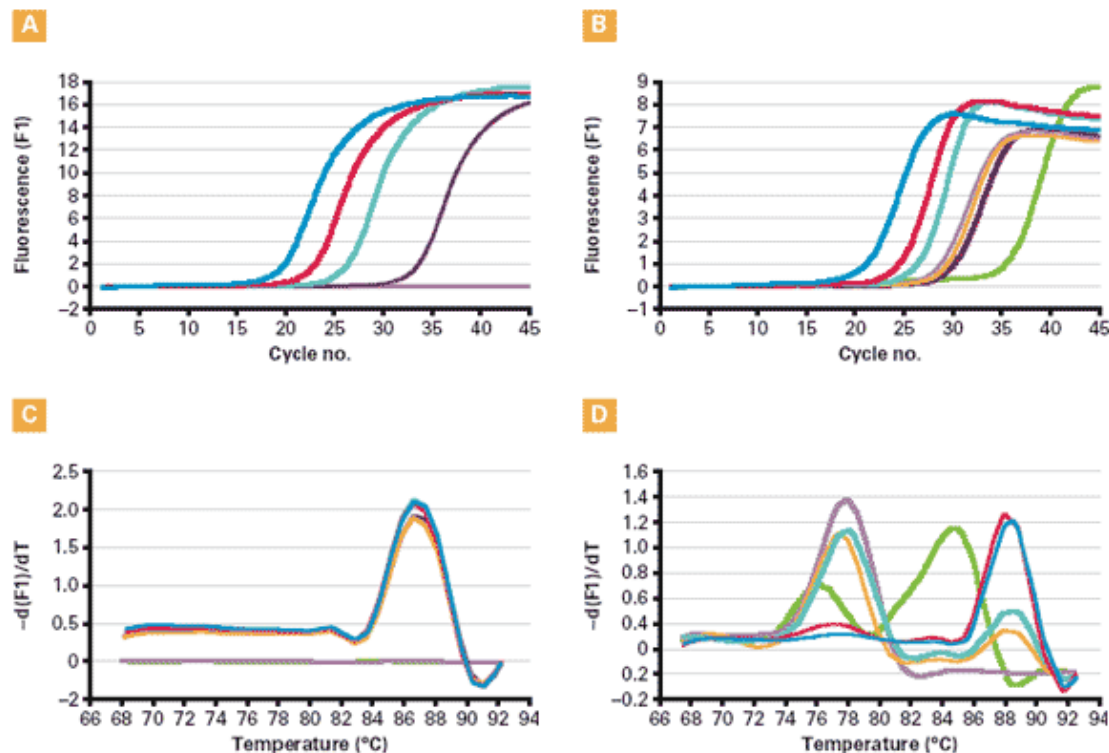


Abbildung 10: Real Time PCR

- A: schöne Amplifikationskurven mit sauberer Neg-Kontrolle auf der Null-Linie
 B: Neg-Kontrolle offenbar kontaminiert (grün)
 C: Genspezifischer Schmelzpunkt mit sauberer Neg-Kontrolle auf der Null-Linie
 D: unspezifische Reaktion

3.3.1.9 Agarose Gelelektrophorese

Obwohl bei der Real-time PCR in einer Melting Peak Analyse jeweils nur eine spezifische Spitze erkennbar war, ist die Richtigkeit der amplifizierten Gene zusätzlich mit Hilfe einer Gelelektrophorese bestätigt worden.

Für ein kleines Gel wurden 0,8 g Agarose abgewogen und in 50 ml TAE Buffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Lösen der Agarose wurde 1µl SYBR Gold dazugegeben und das Gel gegossen.

0,5µl der Probe wurde mit 0,5µl Loading Solution und 0,5µl TAE gemischt und aufgetragen. Als Marker diente ein 100 Basenpaarmarker.

Die amplifizierten Stücke hatten jedes Mal die richtige Größe und waren auch das einzige sichtbare Bruchstück.

3.3.1.10 Statistische Auswertung

Die Rohdaten der quantitativen Real-time PCR wurden anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak, K. J. et al. 2001) ausgewertet. Die Primereffizienzen aller untersuchten Gene waren sehr ähnlich (~2). Die absoluten Expressionswerte wurden gegen das Housekeeping Gen GAPDH normalisiert und eine Ratio zu NaCl behandelten Mäusen gebildet. Die mRNA Induktion wurde als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dargestellt.

Für die Auswertung der daraufhin entstandenen Daten wurde das Statistikprogramm Sigma Plot (Version 2; Seriennummer: 7408643) verwendet. Um die statistische Signifikanz

zu überprüfen wurde mit dem Students t-test gearbeitet. In den Fällen in denen eine zu große Varianz vorlag, wurde der Mann-Whitney Test verwendet.

Eine statistische Relevanz wurde ab einem P-Wert von $\leq 0,05$ als gegeben erachtet.

3.3.2 Histologische Färbungen

3.3.2.1 Schnittherstellung

Mit einem Kryostat (Leica) wurden von den in Tissue Tek eingebetteten Kroyhistoblöcken jeweils $5\mu\text{m}$ (Leber) bzw. $10\mu\text{m}$ (Gehirn) dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden ca. 30min an der Luft getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2.2 Hämotoxylin-Eosin-Färbung

3.3.2.2.1 Prinzip der Methode

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) ist ein Färbeverfahren der histologischen Technik, mit dem die verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können. Es ist die weltweit übliche Routinefärbung für die morphologische Diagnostik zur Erstellung von feingeweblichen Befunden. Der Pathologe kann mithilfe dieser Übersichtsfärbung krankhafte Veränderungen in Biopsien und Operationspräparaten erkennen. Sie dauert je nach verwendeten Protokollen und Färbelösungen zwischen 5 und 45 Minuten und ist Teil einer umfangreichen Gewebeerarbeitung, die ein bis mehrere Tage umfasst.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Um seine färbenden Eigenschaften zu entwickeln muss es zu Hämalaun (basischer Hämateinlack) aufbereitet werden. Hämalaun färbt alle sauren/basophilen Strukturen blau (DNA; Zellkern; raues Endoplasmatisches Retikulum usw.). Eosin (synthetischer Farbstoff) färbt alle acidophilen/eosinophilen/basischen Strukturen rot, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst. Nach der H-Färbung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Durch Erhöhung des pH-Wertes (Bläuen) schlägt der Farbton in das typisch blau-violett um. Gebläut wird durch Spülen in Leitungswasser. Anschließend folgt die Zytoplasma-Färbung in einer alkoholischen oder wässrigen Lösung von Eosin. Durch weitere Spülschritte über Alkoholösungen in aufsteigender Konzentration bis hin zu absolutem Alkohol, wird das Wasser aus dem Gewebeschnitt verdrängt. Schließlich wird der entwässerte Schnitt in einem organischen Lösungsmittel (z.B. Xylol) geklärt und kann nun mit einem acrylathaltigen Eindeckmedium und einem Deckgläschen bedeckt werden. So bleiben Schnitt und Färbung für Jahrzehnte erhalten und mikroskopierbar.

3.3.2.2.2 Durchführung

Die Schnitte wurden unmittelbar aus dem Gefrierschrank in 100% Alkohol getaucht um Gefrierartefakten vorzubeugen. Die Schnitte durchliefen nun eine absteigende Alkoholreihe und wurden jeweils ca. 1min in 96% und 70% Alkohol und anschließend in Aqua dest. getaucht. Es folgten 10min in Hämalaun und anschließend ein 5 minütiges Bläuen in Leitungswasser. Daraufhin wurden die Schnitte für 30sek in Eosin getaucht und dann in Aqua dest. gespült. Die Schnitte durchliefen nun eine aufsteigende (70%, 96%, 100%) Alkoholreihe an deren Ende ein Bad in Xylol lag. Die Schnitte wurden aus dem Xylol heraus mit Coverquick eingedeckelt.

3.3.2.3 Chloracetat-Esterase-Färbung

3.3.2.3.1 Prinzip der Methode

Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase bewirkt die enzymatische Hydrolyse von Naphthol AS-D Chloracetat zu einer Naphtholverbindung. Diese reagiert in einer Kopplungsreaktion mit einem Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichen rotvioletten Azofarbstoff.

Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase zeigt in reifen und unreifen Granulozyten eine deutliche Reaktion. In Myelozyten, Metamyelozyten, Stabkernigen und Mastzellen lassen sich intensive Enzymaktivitäten nachweisen. Enzymaktivitäten werden teilweise in leukämischen Myeloblasten, Promyelozyten und in Auer-Stäbchen gefunden. Monozyten zeigen gelegentlich Aktivitäten. Keine bzw. sehr schwache Reaktionen zeigen Eosinophile, Basophile, Megakaryozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und die Vorläufer der roten Blutzellen.

3.3.2.3.2 Durchführung

50 mg Pararosanilin wurden in 3ml HCl 1N heiß gelöst und abgekühlt. 2 ml eisgekühltes 1M Na Nitrit (0,69g Na Nitrit + 10 ml a. dest.) wurde unter ständigem Schütteln zu der Pararosanilin-Lösung gegeben bis ein Farbumschlag von braun nach gelb erfolgte und anschließend 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die dabei entstandene Lösung wurde auf Vorrat aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

18 mg Naphtol-AS-D-Chloracetat wurde in 1 ml Dimethylformamid-gelöst. Das Ganze wurde zu einem Aliquot Pararosanilinlösung gegeben und mit PBS pH 7,3 auf 100 ml aufgefüllt. Die dabei entstehende rosa Lösung wurde durch Filtration von dem entstehenden flockigen Niederschlag befreit.

Die Schnitte durchliefen eine absteigende Alkoholreihe bis zum a. dest, wurden in PBS gespült und anschließend 1 h in der rosa Pararosanilin-Lösung inkubiert. Es folgte ein Spülschritt in Leitungswasser und eine Kernfärbung mit Hämalaun. Die Schnitte wurden mit Aquamount eingedeckt.

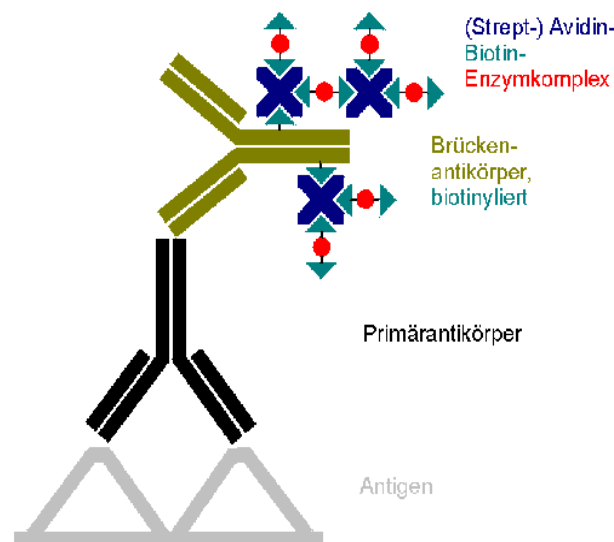
3.3.2.4 Immunhistochemie

3.3.2.4.1 Das Prinzip der ABC-Methode mit DAB als Substrat

Heutzutage ist diese Färbemethode die am meisten eingesetzte. Die Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode ist ein immunhistochemisches Verfahren zum indirekten Nachweis von Antigenen. Das Prinzip beruht dabei auf einem die Farbreaktion verstärkenden Effekt von Enzym-anti-Enzym Immunkomplexen.

Dazu wird zuerst der Primärantikörper mit dem zu untersuchenden Gewebeschnitt inkubiert, wobei er an das nachzuweisende Antigen bindet. Je nach Spezies, in welcher der Primärantikörper erzeugt wurde, muss anschließend ein passender Brückenantikörper aufgetragen werden. Dieser Brückenantikörper ist biotinyliert und stellt die Verbindung zum als nächstes aufgetragenen Streptavidin da. Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) oder auch Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Streptavidin und Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin.

Die Reihenfolge der Applikation ist unkonjugierter Primärantikörper + biotinylierter Sekundärantikörper + enzymmarkiertes Streptavidin + Substratlösung/Chromogen (in diesem Fall DAB)→ Farbe. Als Enzym wird Meerrettichperoxidase verwendet. Die ABC-Methode hat eine sehr hohe Sensitivität.



(Strept-) Avidin-Biotin-Complex

ABC-Methode

Abbildung 11: Prinzip der ABC-Methode

(Quelle: www.pathologie-online.de)

3.3.2.4.2 Der GFAP Antikörper

Dieser Antikörper ist ein sehr spezifisches Mittel das fibrilläre saure Gliafaserprotein (GFAP), das hauptsächliche Zwischenfilament der gereiften Astrozyten (Eng, L. F. et al. 2000), darzustellen. GFAP ist astrozytenspezifisch und somit ein spezifischer Marker zur Identifikation der Astrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) unter normalen und pathologischen Konditionen.

GFAP ist ein 50 kDa intrazytoplasmatisches filamentöses Protein, welches einen Anteil des Zellskeletts in Astrozyten bildet. Es ist der spezifischste Marker für Zellen astrozytärer Herkunft. Funktionell wird GFAP als wichtig in der astrozytischen Motilität und der Form erachtet, die den astrozytischen Prozessen strukturelle Stabilität bietet. Bei einer Verletzung des ZNS, verursacht durch Trauma, genetische Störungen oder Chemikalien, proliferieren Astrozyten und zeigen eine extensive Hypertrophie des Zellkörpers und der Fortsätze, GFAP wird merklich hochreguliert. Im Gegensatz dazu gibt es bei einer erhöhten astrozytischen Malignität einen progressiven Verlust der GFAP-Produktion. Somit haben maligne Astrozytome weniger Tumorzellen, die sich positiv und intensiv nach GFAP verfärben, als es weniger maligne Astrozytome und normale Gehirnspezies tun (Rutka, J. T. et al. 1997) (www.dakogmbh.de).

3.3.2.4.3 Der B220 Antikörper

Der Klon RA3-6B2 Antikörper reagiert mit einem Epitop auf der extrazellulär Domäne des CD45 Glykoproteins, das wiederum abhängig ist von der Expression von Exon A und spezifischen Zuckerresten (Kitamura, K. et al. 1995). Es wird auf B-Lymphozyten jeder Entwicklungsstufe, von unreif bis zur aktivierten B-Zelle, exprimiert. Das CD45R/B220 Antigen findet sich weder auf hämatopoetischen Stammzellen oder Plasmazellen, noch auf T-Zellen oder MHC-assoziierte Zellen. CD 45R/B220 ist Mitglied der

Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) Familie. Die CD 45 Isoformen, die in der Maus gefunden wurden sind abhängig von Zelltyp, Reife- und Aktivierungsgrad. Die CD45 Isoformen spielen eine komplexe Rolle in der T- und B-Zell Antigen Rezeptor Signal Transduktion. CD45R/B220 wird meistens als umfassender B-Zell Marker verwendet (www.bdbiosciences.com).

3.3.2.4.4 *Der CD 11b Antikörper*

Rat anti mouse CD 11b (MCA711) reagiert mit den Maus-Komplement Rezeptor Typ 3 (CR3) und präzipitiert ein Heterodimer aus 165 und 95kD. CD 11b kann ebenfalls ein Rezeptor für Fibrinogen, Faktor X und ICAM 1 sein. Es erkennt P1 und P2 Peptide der Fibrinogen gamma Kette. CD 11b wird zu 8% in der Milz, zu 44% im Knochenmark und zu weniger als 1% im Thymus exprimiert. Im Nervengewebe dient es gemeinhin als Mikroglia marker (Giese, A. et al. 1998). Ebenfalls werden andere aktivierte Makrophagen markiert. Der Klon 5C6 verhindert *in vitro* eine Adhäsion und *in vivo* eine Verstärkung von Entzündung. Er verhindert des Weiteren eine verzögerte Hypersensitivität, Entzündung und Typ I Diabetes und ermöglicht bakterielle Infektionen. Zum Teil beugt er LPS-induzierter myelomonocytyischer Zellrekrutierung vor (www.serotec.com).

3.3.2.4.5 *Der CD 8 Antikörper*

Der Rat anti mouse MCA1768 Antikörper erkennt das murine CD 8 Oberflächenantigen, das auf einer Subpopulation von T-Lymphozyten exprimiert wird. Das CD 8-Antigen ist ein Oberflächen-Glykoprotein, das auf den meisten zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert wird und welches effizient Zell-Zell Interaktionen innerhalb des Immunsystems vermittelt. In seiner Rolle als Ko-Rezeptor erkennt es gemeinsam mit dem T-Zell-Rezeptor auf T-Lymphozyten das von den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) dargebotene Antigen im Rahmen der Klasse I MHC Moleküle. Der funktionelle Ko-Rezeptor bildet entweder ein Homodimer bestehend aus 2 alpha Ketten oder ein Heterodimer bestehend aus einer alpha und einer beta Kette. Sowohl die alpha, als auch die beta Kette teilen maßgebliche Homologin mit der variablen, leichten Kette der Immunglobuline. CD 8 wird von den meisten Thymozyten und auf annähernd einem Drittel aller T-Zellen im peripheren Blut des Menschen exprimiert. CD 8 alpha/beta Heterodimere werden nur auf TCR alpha/beta T-Zellen exprimiert, während CD 8 alpha Homodimere auf alpha/beta und gamma/delta T-Zellen und einigen NK Zellen des Menschen exprimiert werden. Das Wissen über das Expressionsmuster bei anderen Spezies ist noch etwas rudimentär. (www.abcam.com)

3.3.2.4.6 *Durchführung*

Die bei -20°C gelagerten Schnitte wurden unmittelbar aus dem Gefrierschrank in 100% Alkohol überführt, um Kryofaktoren vorzubeugen. Die Schnitte durchliefen daraufhin eine absteigende Alkoholreihe (96%, 70%) und wurden dann 3x 5min in PBS gespült. Nun wurden die Schnitte 5min mit 3% H₂O₂ in PBS inkubiert um die endogene Peroxidase zu inaktivieren. Die Schnitte wurden nun wieder 3x 5min in PBS gespült und anschließend 20min mit 2% BSA behandelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Für alle Leberfärbungen wurde an dieser Stelle ein Schritt zum Blocken des endogenen Biotins eingeschaltet. Dazu wurden die Schnitte zuerst 15min mit einer Avidinlösung und dann 15min mit einer Biotinlösung inkubiert (beides Vektor). Es folgte ein kurzes Tauchbad in PBS.

Nun wurde der Primärantikörper, der zuvor mit PBS verdünnt worden und mit 1% Mausnormalserum für 1 Stunde bei 37° inkubiert worden war, aufgetragen. Pro Schnitt wurde

jeweils eine Gesamtflüssigkeitsmenge von 150µl Flüssigkeit verwendet. Als Primärantikörper wurde für die Mikrogliafärbung der monoklonale Rattenantikörper CD 11b (Serotec) mit einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt, in der Leber wurde er mit der Verdünnung 1:100 verwendet. Für die GFAP Färbung wurde ein polyklonaler Antikörper mit der Verdünnung 1:500 (Dako) verwendet. Für die Färbung von B-Lymphozyten wurde ein monoklonaler Rat anti mouse Antikörper in der Verdünnung 1:20 verwendet, der B220 bindet (BD Pharmingen). Zur Darstellung einer T-Lymphozyten Subpopulation wurde ein CD 8 bindender monoklonaler Rat anti mouse Antikörper (Serotec) in der Verdünnung 1:100 eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, wobei der Schnitt mit einer Folie überschichtet wurde, um die gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit zu gewährleisten.

Die Schnitte wurden nun wieder 3x 5min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (Dako) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS aufgetragen, mit einer Plastikfolie überschichtet und 30min inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend 3x 5min in Tris-Puffer gespült und mit 1:100 in PBS verdünntem Streptavidin (Dako) für 30min inkubiert. Nun folgten 3 weitere Waschschrte für 5min in PBS. Nun wurde die DAB-Lösung (Dako) (1 Tablette gelöst in 10ml Tris-Puffer pH 7,6) pro ml mit 1µl H₂O₂ versetzt und für 20min auf den Schnitt geträufelt. Die Schnitte wurden nun 2 x 2min in Aqua dest. gespült, 30sek in Hämalun gegengefärbt, 5min in Leitungswasser gebläut, durchliefen eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und wurden am Ende aus Xylol heraus mit Coverquick eingedeckelt.

Als Positivkontrolle wurde stets ein Scrapie-infiziertes Gehirn mitgefärbt. Hier weiß man, dass die Mikroglia stark aktiviert wird (Giese, A. et al. 1998) und die GFAP Expression ansteigt (Mackenzie, A. 1983). Für die B220 und CD 8 Färbung der Leber wurde jeweils ein Milzschnitt mitgefärbt. Als Negativkontrolle wurde stets ein Schnitt anstelle des Primärantikörpers mit PBS inkubiert.

3.3.2.4.7 Auswertung

Pro Tier wurde jeweils ein Schnitt angefertigt, gefärbt und mikroskopiert, so dass pro Gruppe fünf Schnitte für die Auswertung herangezogen werden konnten. Die Schnitte wurden geblindet für die jeweilige Behandlung mikroskopiert.

Die Färbeintensitäten im Gehirn wurde in den Regionen Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Striatum, Mittelhirn und der periventrikular Region anhand einer Skala (● Basisfärbung; + milde Färbung; ++ mäßige Färbung; +++ starke Färbung) eingruppiert (Colburn, R. W. et al. 1997). In der Leber erfolgte die Auswertung an 10 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern.

4 Ergebnisse

4.1 Veränderungen im Gehirn

4.1.1 Histologische Untersuchung des Gehirns

4.1.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gehirnregionen Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Striatum, Mittelhirn und die periventricular-Region wurden auf Zelldichte, mögliche Invasion von Entzündungszellen und Pathologien der Gewebsarchitektur untersucht.

Bei der histologischen Untersuchung von 5x-CpG-ODN, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen konnten in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) keine pathologisch veränderten Merkmale der Gewebsarchitektur, keine Invasion von Entzündungszellen und auch kein sonstiger Einfluss der CpG-ODN-Gabe festgestellt werden. Somit zeigte sich kein Unterschied zwischen den CpG-ODN behandelten Tieren und den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrolltieren.

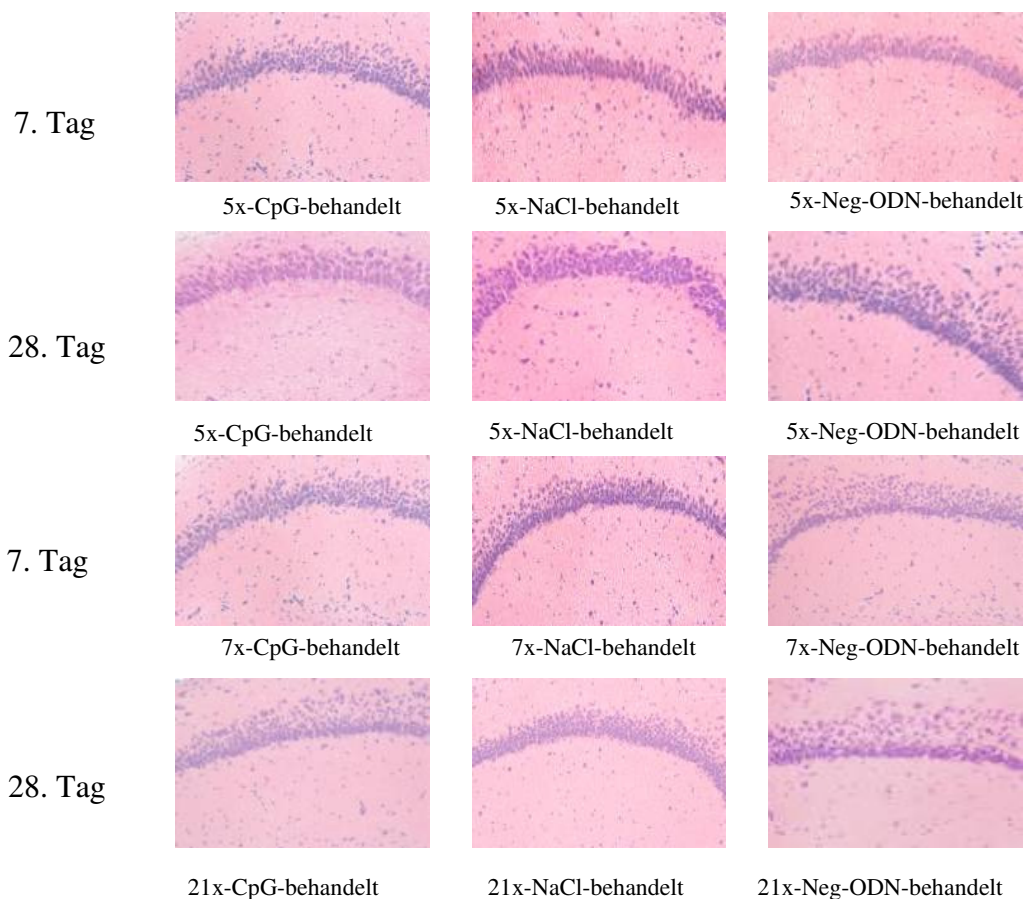


Abbildung 12: HE-Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Gehirnschnitte

Histologische Auswertung von Gehirnschnitten nach wiederholter peripherer CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation.

10µm dicke Gefrierschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt. Hier jeweils ein repräsentativer Schnitt pro behandelter Gruppe.

Darstellung des Hippocampus in 100-facher Vergrößerung.

Morphologische Veränderungen der Gehirnarchitektur können weder bei den CpG-ODN behandelten Tieren, noch bei den entsprechenden Kontrollen beobachtet werden.

4.1.1.2 Immunhistologie

4.1.1.2.1 CD 11b

Die Gehirnregionen Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Striatum, Mittelhirn und die periventrikular-Region wurden auf CD 11b positive Zellen untersucht und anhand einer Skala (● Basisfärbung; + milde Färbung; ++ mäßige Färbung; +++ starke Färbung) eingruppiert (Colburn, R. W. et al. 1997).

Der Antikörper CD 11b, der an aktivierte Makrophagen und Mikroglia bindet, konnte bei den CpG-ODN behandelten Gruppen keine signifikant stärkere Mikrogliaaktivierung nachweisen als bei den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren.

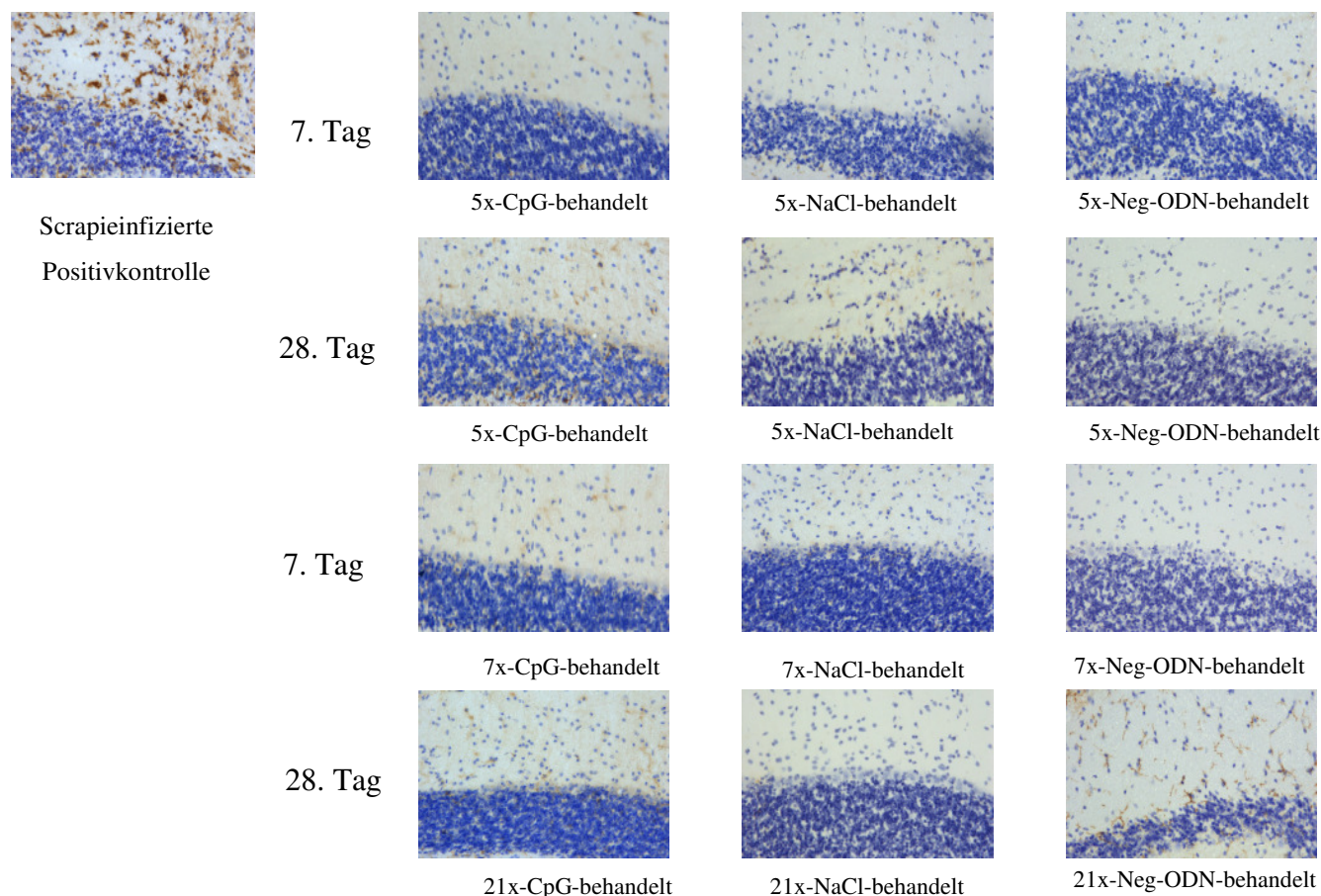


Abbildung 13: CD 11b Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Gehirnschnitte

Histologische Auswertung von Gehirnschnitten nach wiederholter peripherer CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation.

10µm dicke Schnitte des Gehirns, gefärbt mit dem Antikörper CD 11b zum Nachweis von aktivierten Mikrogliazellen.

Darstellung des Cerebellums in 200-facher Vergrößerung.

Zwischen den Gruppen zeigt sich unabhängig von ihrer Behandlung bei manchen Tieren eine leichte Aktivierung der Mikroglia, diese zeigt aber keine signifikante Verstärkung durch die repetitive CpG-ODN-Applikation.

4.1.1.2.2 GFAP

Die Gehirnregionen Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Striatum, Mittelhirn und die periventricular-Region wurden auf GFAP positive Zellen untersucht und anhand einer Skala (● Basisfärbung; + milde Färbung; ++ mäßige Färbung; +++ starke Färbung) eingruppiert (Colburn, R. W. et al. 1997).

Bei den immunhistologisch gefärbten Gehirnschnitten konnte mit einem GFAP bindenden Antikörper als Indikator für eine Gliose keine signifikanten Unterschiede zwischen CpG-ODN behandelten Mäusen und den entsprechenden Kontrollen festgestellt werden.

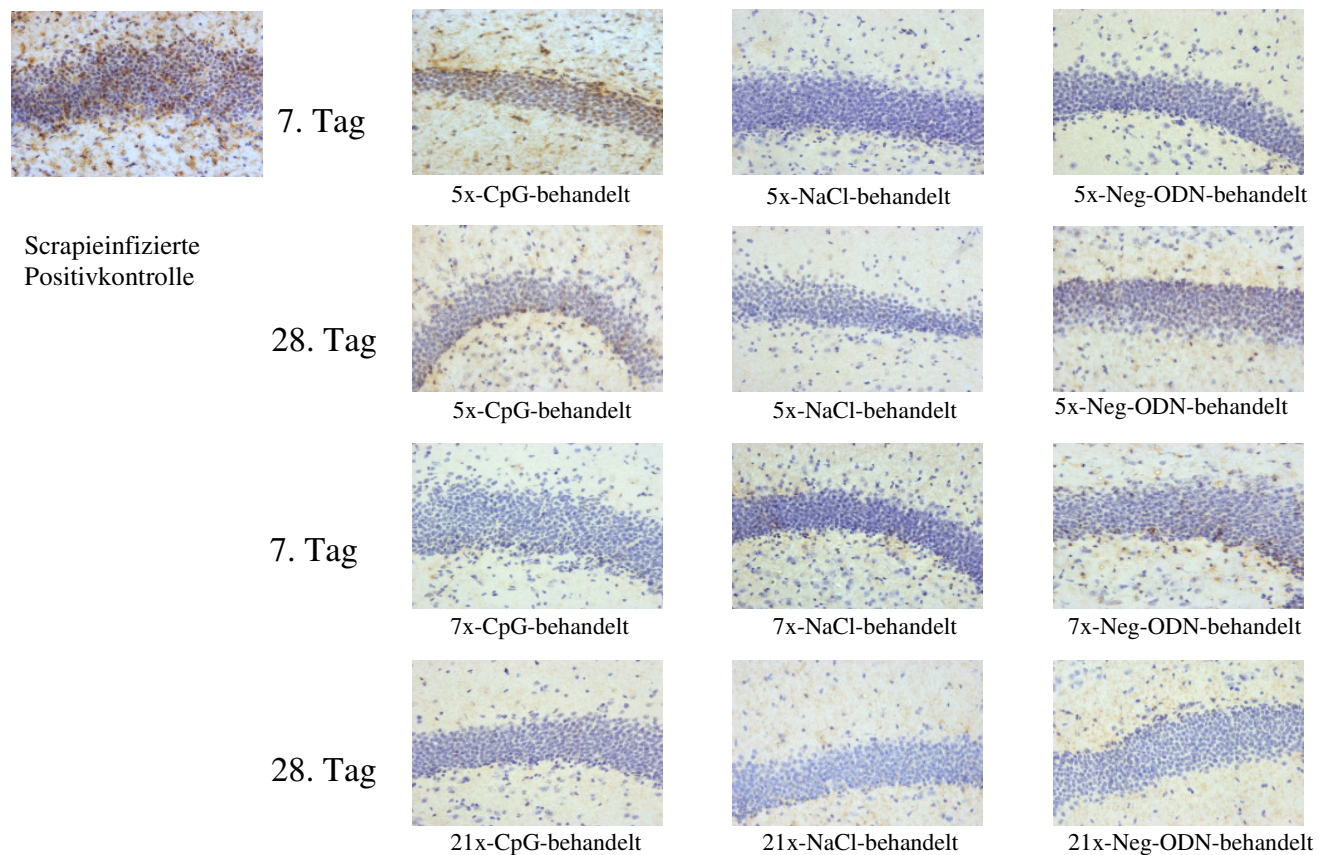


Abbildung 14: GFAP-Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Gehirnschnitte

Histologische Auswertung von Gehirnschnitten nach wiederholter peripherer CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation.

10µm dicke Schnitte des Gehirns, gefärbt mit einem GFAP bindenden Antikörper zum Nachweis von Astrozyten.

Darstellung des Hippocampus in 200-facher Vergrößerung.

Zwischen den Gruppen zeigt sich unabhängig von ihrer Behandlung bei manchen Tieren eine leichte verstärkte Anfärbbarkeit der Astrozyten, diese zeigt aber keine signifikante Verstärkung durch die repetitive CpG-ODN-Applikation.

4.1.2 Veränderungen der mRNA Expression bei der Real-time PCR

Die in der Real-time PCR gewonnenen Rohdaten wurden mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak, K. J. et al. 2001) ausgewertet (siehe auch 3.3.1.10).

4.1.2.1 TNF α

Im Gehirn konnte nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation eine mindestens einwöchig bestehende Hochregulierung der TNF α mRNA Expression nachgewiesen werden.

Die Hochregulierung mit der deutlichsten statistischen Signifikanz fand sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren, gefolgt von den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren. Eine, wenn auch schon deutlich niedrigere signifikante Hochregulierung fand sich in den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren. Keine Signifikanz ergab sich für die 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren verglichen mit ihren jeweiligen Kontrollen.

Die Hochregulierung durch CpG-ODN betrug maximal ca. den doppelten Wert verglichen mit der Expression in NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren.

An Tag 7 konnten erhöhte TNF α Werte bei den CpG-ODN behandelten Tieren im Gegensatz zu den jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollen sowohl in den 5x-CpG-ODN ($p \leq 0,005$; $p < 0,001$) behandelten als auch in den 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,012$; $p \leq 0,011$) beobachtet werden. An Tag 28 zeigten sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten Tieren verglichen mit den jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN Kontrollen keine erhöhten TNF α Werte, während die 21x-CpG-ODN Gruppe signifikant höhere TNF α mRNA Werte als die entsprechenden Kontrollen zeigte ($p \leq 0,032$; $p \leq 0,008$).

Die TNF α Werte in 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 28 waren signifikant niedriger als an Tag 7 ($p < 0,001$), ebenso wie in 7x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 7 ($p \leq 0,015$) und in 21x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 28 ($p \leq 0,003$). Die TNF α Spiegel waren an Tag 28 bei den 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen niedriger als an Tag 7 in 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen.

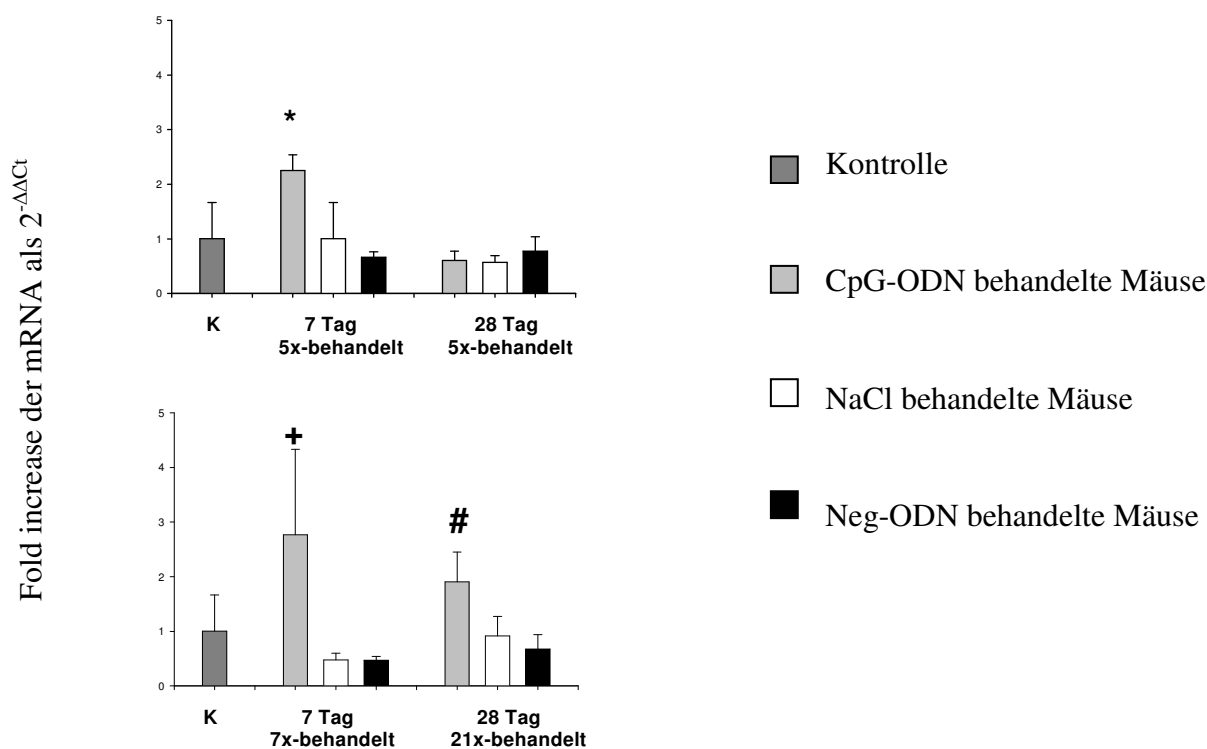


Abbildung 15: ZNS-assoziierte TNF alpha mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene TNF α mRNA Werte in 5x-CpG-ODN-, 7x-CpG-ODN- und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, +, #) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,005$) und 5x-Neg-ODN behandelten Tieren, getötet an Tag 7 ($p < 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p < 0,001$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,012$) und zu 7x-Neg-ODN behandelten Mäusen, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,011$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,015$).

Signifikanter Unterschied zu 21x-NaCl-behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,032$) und zu 21x-Neg-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,008$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,003$).

4.1.2.2 C1q

Die C1q Expression zeigt im Gegensatz zur TNF α Expression keine länger andauernde Erhöhung der Expression.

Auch für die mRNA Expression von C1q findet sich nach peripherer CpG-ODN-Gabe eine Hochregulierung, diese ist jedoch, ebenso wie beim anschließend beschriebenen IFN γ nur während der CpG Behandlung bzw. bis 2 Tage nach der Beendigung der Applikation nachweisbar.

Genau betrachtet zeigten 5x-CpG-ODN behandelte, an Tag 7 getötete Mäuse eine signifikant höhere Expression um das ca. doppelte als 5x-NaCl behandelte Tiere ($p \leq 0,032$) und höhere C1q Werte verglichen mit den entsprechenden Neg-ODN behandelten Mäusen.

7x-CpG-ODN behandelte, an Tag 7 getötete Tiere zeigten statistisch signifikant höhere C1q Werte als 7x-NaCl-behandelte Mäuse ($p \leq 0,028$) und 7x-Neg-ODN behandelte Tiere ($p \leq 0,018$) an Tag 7. 5x-CpG-ODN behandelte, an Tag 7 getötete Tiere zeigten eine signifikant höhere C1q Expression als 5x-CpG-ODN behandelte, an Tag 28 getötete Mäuse ($p \leq 0,022$).

Sehr interessant ist hier, dass die C1q mRNA Werte der 5x-CpG-ODN behandelten Mäuse höher waren als die Vergleichswerte in 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 7.

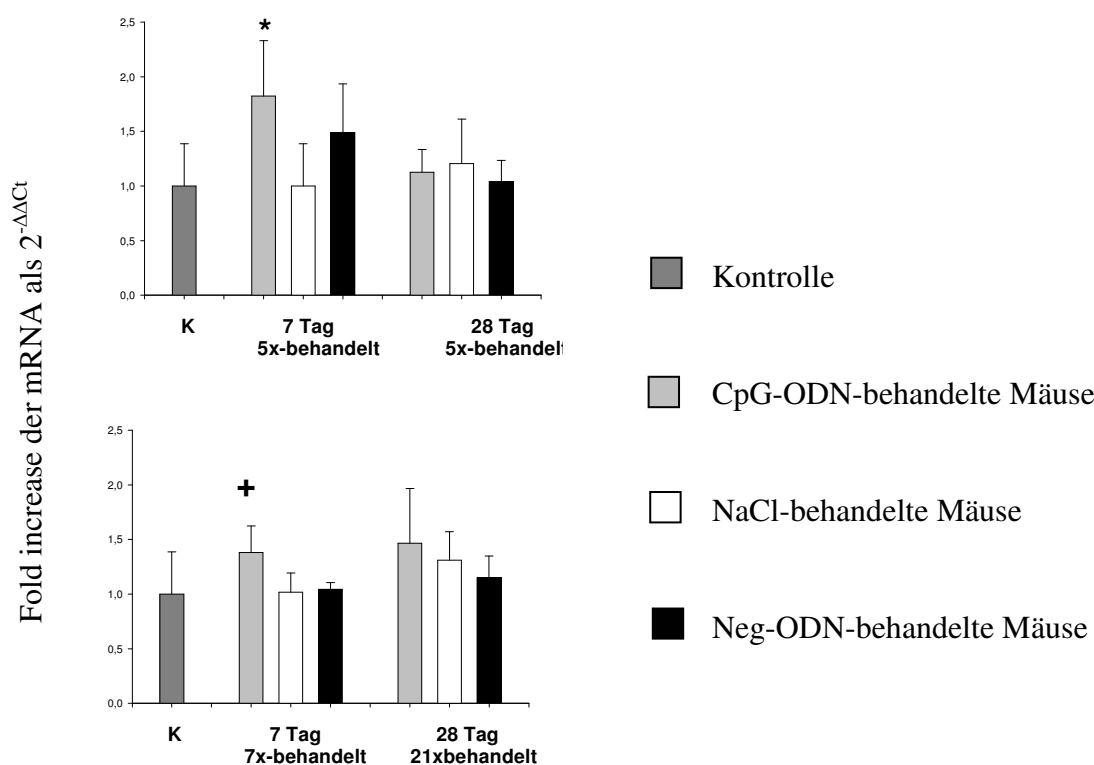


Abbildung 16: ZNS-assoziierte C1q mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene C1q mRNA Werte in 5x-CpG-ODN-, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, +) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,032$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,022$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,028$) und 7x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,018$).

4.1.2.3 IFN gamma

Die IFN gamma Expression zeigt im Gegensatz zur TNF α Expression keine länger anhaltende Erhöhung der Expression. Es verhält sich ähnlich dem C1q. Die Werte für die IFN γ Expression sind nur in den Tieren die während bzw. 2 Tage nach der letzten CpG-ODN-Gabe getötet wurden signifikant um das ca. 10-fache erhöht.

Genau betrachtet finden sich in den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren verglichen mit ihren jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN Gruppen signifikante Hochregulierungen der IFN γ Expression ($p < 0,001$; $p < 0,001$). Ebenso verhält es sich mit den 7x-CpG-ODN behandelten an Tag 7 getöteten Tieren verglichen mit ihren jeweiligen Kontrolltieren ($p \leq 0,013$; $p \leq 0,014$). Beim Vergleich der CpG-ODN behandelten Gruppen untereinander fand sich eine signifikant höhere Expression bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren im Vergleich sowohl zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten als auch zu den 21x-CpG-ODN behandelten an Tag 28 getöteten Mäusen ($p < 0,001$; $p \leq 0,018$).

Eine signifikant höhere Expression zeigten auch die 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäuse verglichen mit den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,016$). Sehr interessant ist auch, dass die IFN γ mRNA Werte an Tag 7 der 5x-CpG-ODN behandelten Mäuse höher waren als die Vergleichswerte in 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen.

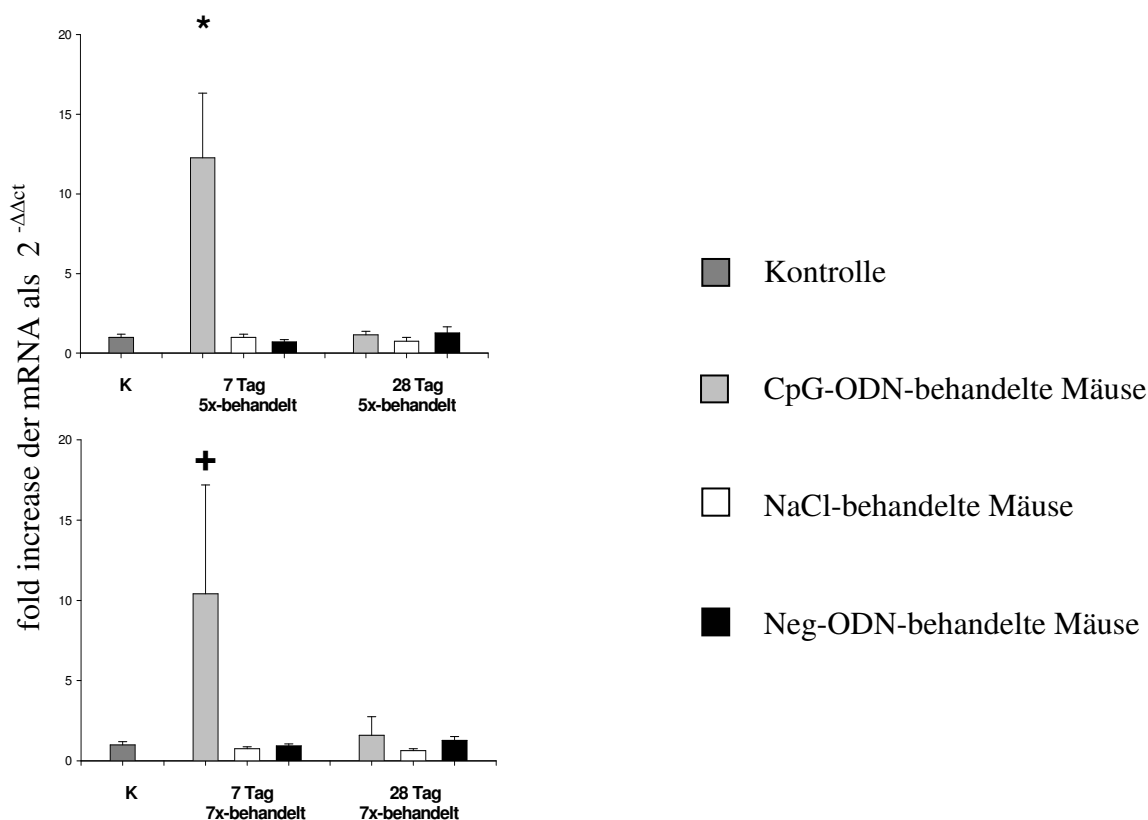


Abbildung 17: ZNS-assozierte IFN γ mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene IFN γ mRNA Werte in 5x-CpG-ODN-, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf

Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, +) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p < 0,001$) bzw. zu 5x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p < 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p < 0,001$) und zu 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,018$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,013$) und 7x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,014$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,016$).

4.1.2.4 IL-12p40

Die Hochregulierung von IL-12p40 lässt sich durch repetitive CpG-ODN-Gabe im Gehirn nicht verlängern. Der Effekt einer signifikant erhöhten Expression war nur in den Mäusen, die unter der CpG-ODN-Gabe getötet wurden nachzuweisen.

Eine signifikante Erhöhung der IL-12p40 Expression um das ca. 1,5-fache fand sich so nur in den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen im Vergleich mit ihrer NaCl-Kontrollgruppe ($p \leq 0,03$). Bei den Vergleichen der anderen CpG-ODN behandelten Mäusen mit ihren jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN Kontrollen fiel auf, dass die Expressionswerte der CpG-Tiere jeweils höher waren als in den NaCl bzw. Neg-ODN Tieren. Diese Erhöhung war aber bei keiner der weiteren Gruppen signifikant.

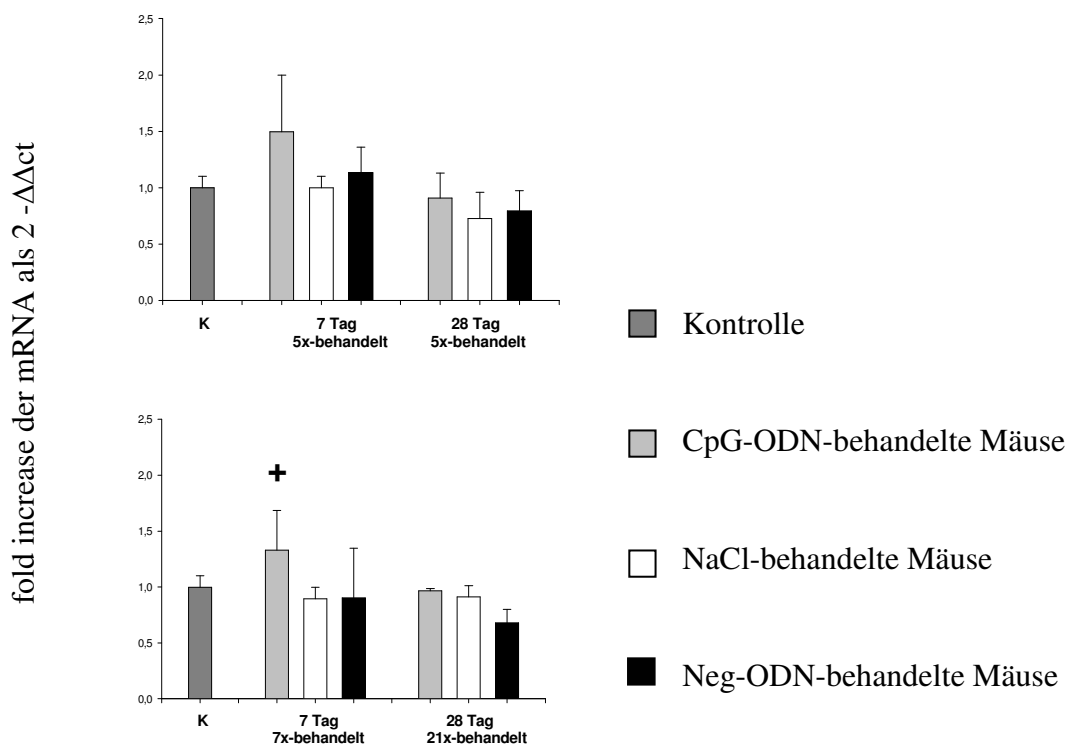


Abbildung 18: ZNS-assoziierte IL-12p40 mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene IL-12p40 mRNA Werte in 5x-CpG-ODN, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf

Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Das Symbol (+) steht für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,03$)

4.1.2.5 STAT3

Die Untersuchungen für STAT3 im Gehirn ergaben keine verwertbaren, signifikanten Hochregulierungen für CpG-ODN behandelte Tiere verglichen mit ihren jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrolltieren.

4.1.2.6 GFAP

Die Untersuchungen für GFAP im Gehirn ergaben keine verwertbaren, signifikanten Hochregulierungen für CpG-ODN behandelte Tiere verglichen mit ihren jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrolltieren.

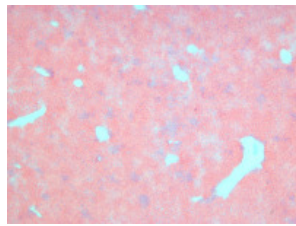
4.2 Veränderungen in der Leber

4.2.1 Histologische Untersuchung der Leber

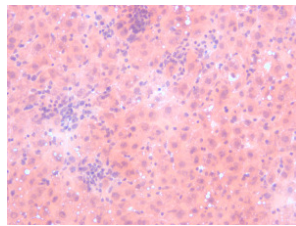
4.2.1.1 HE-Färbung

Die Leberschnitte wurden geblindet an 10 über das gesamte Organ verteilten, zufällig gewählten Gesichtsfeldern auf die Zelldichte, die Invasion von Entzündungszellen und die Gewebearchitektur untersucht.

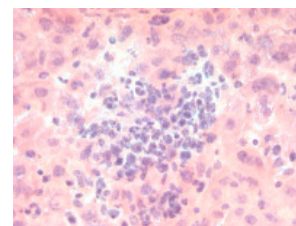
In der HE-Färbung zeigen sich sowohl bei den 5x als auch bei den 7x-CpG-ODN behandelten an Tag 7 getöteten Tieren zahlreiche diffus verteilte Leukozyteninfiltrate im gesamten Leberparenchym. Vorwiegend finden sich Lymphozyten und Makrophagen. In den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren finden sich deutlich weniger und deutlich kleinere bis keine Areale solcher Infiltrate. An Tag 28 finden sich auch in den 5x-CpG-ODN behandelten und in den 21x-CpG-ODN behandelten Tieren sehr wenige bis keine dieser Leukozyteninfiltrate mehr.



x 40

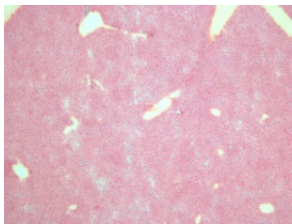


x 100

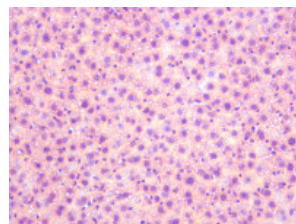


x 200

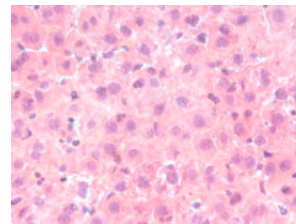
Charakteristisches Bild aller 5x bzw. 7x CpG-ODN behandelten Mäuse an Tag 7



x 40



x 100



x 200

Charakteristisches Bild aller 5x bzw. 21x- CpG-ODN behandelten Mäuse an Tag 28, aber auch für alle 5x bzw. 7x NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Mäuse an Tag 7 und für alle 5x bzw. 21x-NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Mäuse an Tag 28

Abbildung 19: HE-Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte

Histologische Auswertung der Leberschnitte nach wiederholter peripherer CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation.

5µm dicke Gefrierschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt.

Zahlreiche Leukozyteninfiltrate bei 5 bzw. 7x behandelten an Tag 7 getöteten Tieren. Wenige bis keine Leukozyteninfiltrate fanden sich in sämtlichen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren und auch nicht in 5 bzw. 21x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 28.

4.2.1.2 Chloracetat-Esterase-Färbung

Wie in der HE- Färbung schon erkennbar war, handelt es sich bei den Zellen der diffusen Infiltrate um Lymphozyten und Makrophagen. Um aber sicherzugehen, dass nicht doch Granulozyten an der Reaktion beteiligt sind wurde eine Chloracetat- Esterase- Färbung durchgeführt.

In der Chloracetat-Esterase-Färbung waren keine angefärbten Granulozyten sichtbar.

4.2.1.3 Immunhistologie

Durch die Immunhistologie wurde versucht speziell die Zellen der Infiltrate und ihre Verteilungsmuster noch genauer zu charakterisieren.

4.2.1.3.1 CD 11b

An Tag 7 findet sich sowohl in den 5x-CpG-ODN als auch in den 7x-CpG-ODN behandelten Tieren eine große Zahl deutlich CD 11b positiver Makrophagen. Diese finden sich

verstärkt in den in der HE-Färbung beobachteten Infiltraten, sind allerdings nicht auf diese beschränkt, sondern finden sich im gesamten Leberparenchym, wobei es sich hier vorwiegend um die Darstellung der Kupfferschen-Sternstellen handelt, die dem retikulo-endothelialen System angehören. Auch an Tag 28 finden sich bei den 21x-CpG-ODN mehrere und bei den 21x-CpG behandelten Tieren vereinzelt noch CD 11b positive Zellen. In den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrolltieren finden sich hingegen keine positiv gefärbten Zellen.

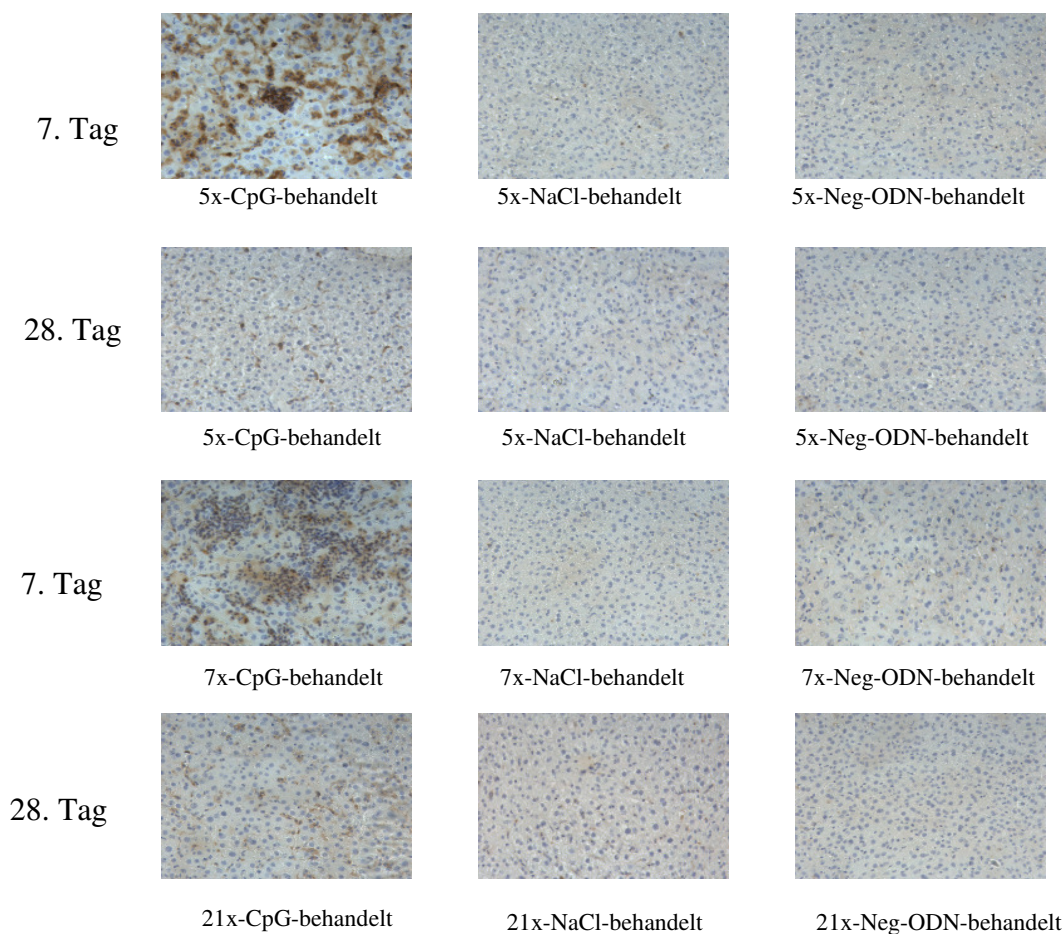


Abbildung 20: CD 11b Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte

Histologische Auswertung von Leberschnitten nach wiederholter peripherer CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation.

5µm dicke Schnitte der Leber, gefärbt mit einem CD 11b bindenden Antikörper zum Nachweis von aktivierten Makrophagen.

Darstellung in 200-facher Vergrößerung.

Stark positive Zellen inner- und außerhalb der Infiltrate an Tag 7 in 5x-CpG-ODN und in 7x-CpG-ODN behandelten Tieren. Vereinzelt positive Zellen im Leberparenchym an Tag 28 in 5x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen. Keine CD 11b positiven Zellen in den jeweiligen Kontrollgruppen.

4.2.1.3.2 CD 8

In den Infiltraten finden sich an Tag 7 sowohl in 5x-CpG-ODN behandelten, als auch in 7x-CpG-ODN behandelten Tieren zahlreiche CD 8 positive T-Lymphozyten. In den je-

weiligen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrolltieren finden sich keine CD 8 positiven Lymphozyten. Auch an Tag 28 fanden sich weder in den 5x-CpG-ODN noch in den 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen CD 8 positive Zellen. In den entsprechenden NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrolltieren fanden sich ebenfalls keine CD 8 positiven Zellen.

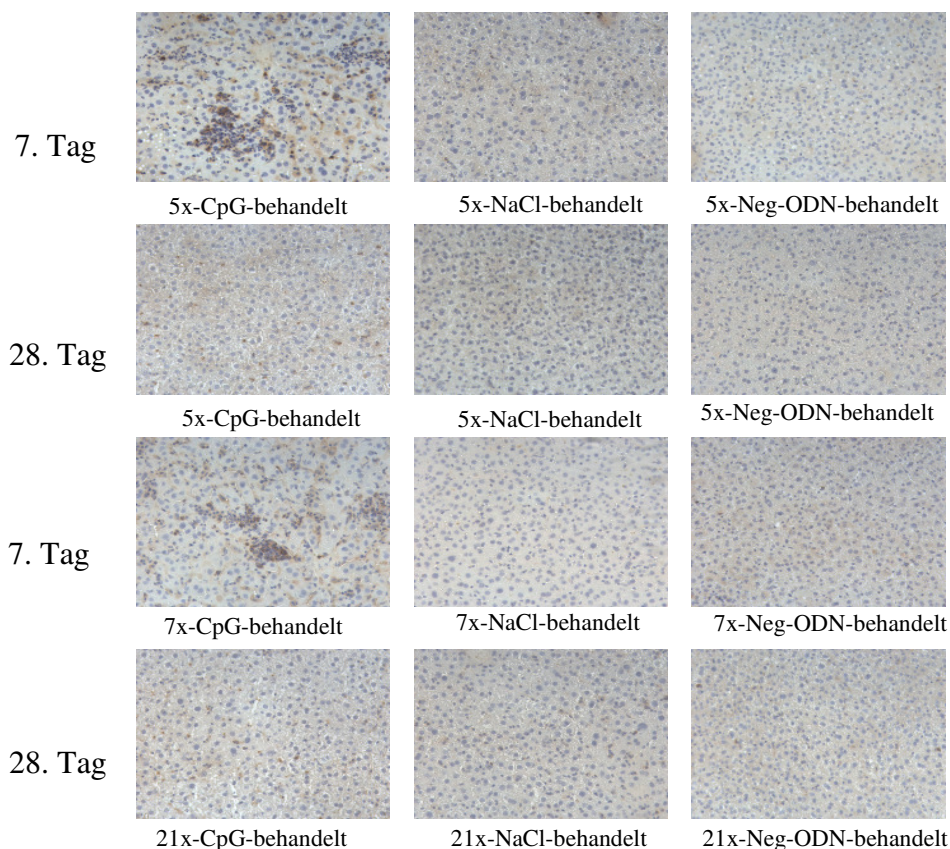


Abbildung 21: CD 8 Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte

Histologische Auswertung von Leberschnitten nach wiederholter peripherer CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation.

5µm dicke Schnitte der Leber, gefärbt mit einem CD 8 bindenden Antikörper zum Nachweis einer T-Lymphozytensubpopulation.

Darstellung in 200-facher Vergrößerung.

CD 8 positive Zellen vorwiegend innerhalb der Infiltrate an Tag 7 in 5x-CpG-ODN und in 7x-CpG-ODN behandelten Tieren. Keine CD 8 positiven Zellen sowohl in den jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren, als auch an Tag 28 in den 5x-CpG-ODN und in 21x-CpG-ODN behandelten Tieren.

4.2.1.3.3 B220

An Tag 7 finden sich sowohl bei den 5x-CpG-ODN als auch bei den 7x-CpG-ODN behandelten Tieren innerhalb der Infiltrate, aber auch verteilt im gesamten Leberparenchym, B220 positive B-Lymphozyten. Auch an Tag 28 finden sich im Leberparenchym vereinzelte aktivierte B-Lymphozyten in 5x-CpG-ODN und in 21x CpG-ODN behandelten Tieren. Keine B220 positiven Zellen finden sich hingegen in den jeweiligen Kontrollgruppen.

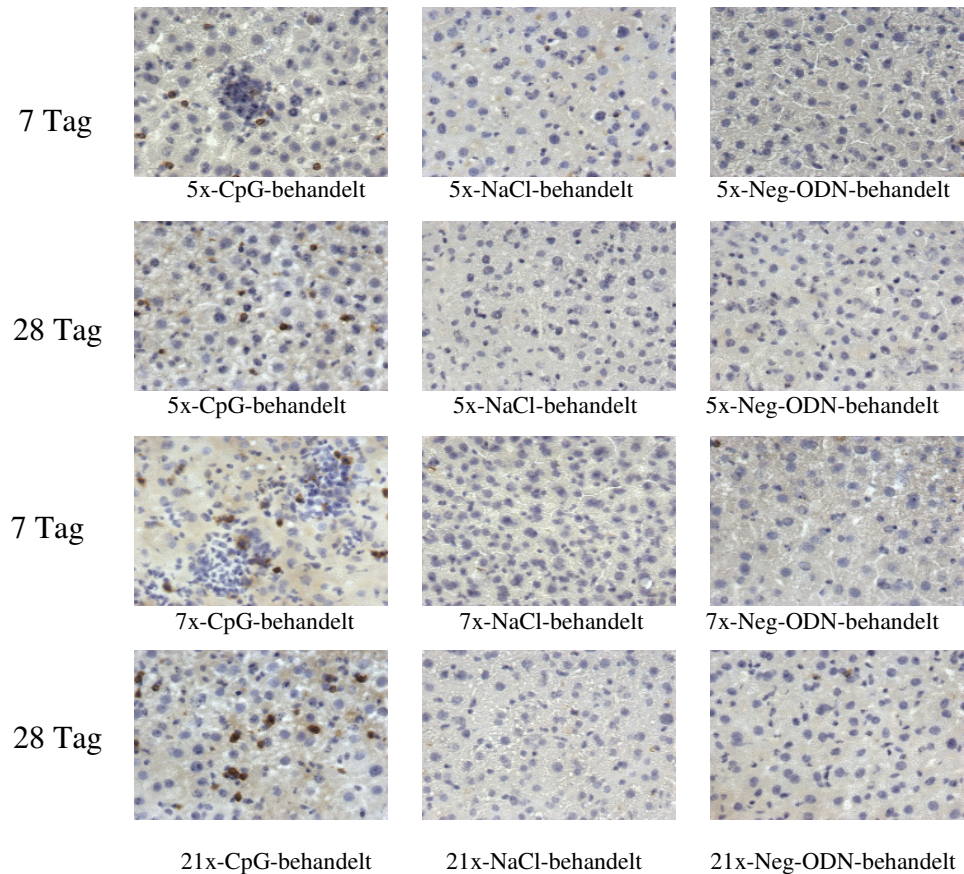


Abbildung 22: B220 Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte

Histologische Auswertung von Leberschnitten nach wiederholter peripherer CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation.

5µm dicke Schnitte der Leber, gefärbt mit einem B220 bindenden Antikörper zum Nachweis von B-Lymphozyten.

Darstellung in 200-facher Vergrößerung.

Stark positive Zellen inner- und außerhalb der Infiltrate an Tag 7 in 5x-CpG-ODN und in 7x-CpG-ODN behandelten Tieren. Mehrere positive Zellen im Leberparenchym an Tag 28 in 5x-CpG-ODN und in 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen. Keine B220 positiven Zellen in den jeweiligen Kontrollgruppen.

4.2.2 Veränderungen der mRNA Expression bei der Real-time PCR

4.2.2.1 IL-12p40

In der Leber konnte für dieses Zytokin der längste Wirkungseffekt von CpG-ODN nachgewiesen werden. Nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation konnte eine dreiwöchige Hochregulierung der IL-12p40 mRNA nachgewiesen werden.

Die stärkste Hochregulierung um das ca. 100-fache fand sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren, gefolgt von den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren, um ca. Faktor 80. Eine, wenn auch schon deutlich niedrigere Hochregulierung um das ca. 4-fache fand sich in den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren. Überraschend war jedoch das für dieses Zytokin einzigartige Ergebnis der zwar deutlich weniger ausgeprägten, aber verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen immer noch signifikanten Hochregulierung um das doppelte, drei Wochen nach der letzten CpG-ODN-Applikation.

Im Einzelnen konnten an Tag 7 erhöhte IL-12p40 Werte bei den CpG-ODN behandelten Tieren im Gegensatz zu den jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollen sowohl in den 5x-CpG ($p < 0,001$; $p < 0,001$) behandelten, als auch in den 7x-CpG behandelten Mäusen ($p < 0,001$; $p < 0,001$) beobachtet werden.

Auch an Tag 28 zeigten sich sowohl bei den 21x-CpG-ODN behandelten ($p \leq 0,002$; $p \leq 0,001$) als auch bei den 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$) signifikante Unterschiede zu ihren jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN Kontrollgruppen.

Beim Vergleich aller CpG-ODN behandelten Gruppen zeigte sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 behandelten Mäusen jeweils ein signifikant höherer IL-12p40 Wert als in 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$) und als in 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,002$). In 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren fand sich eine signifikant höhere IL-12p40 Expression als in 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,029$) und als in 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$). In 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen fanden sich signifikant niedrigere IL-12p40 Spiegel als in 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,003$).

Auch hier zeigt sich das interessante Phänomen, dass die Expression in 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren höher ist als in 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren.

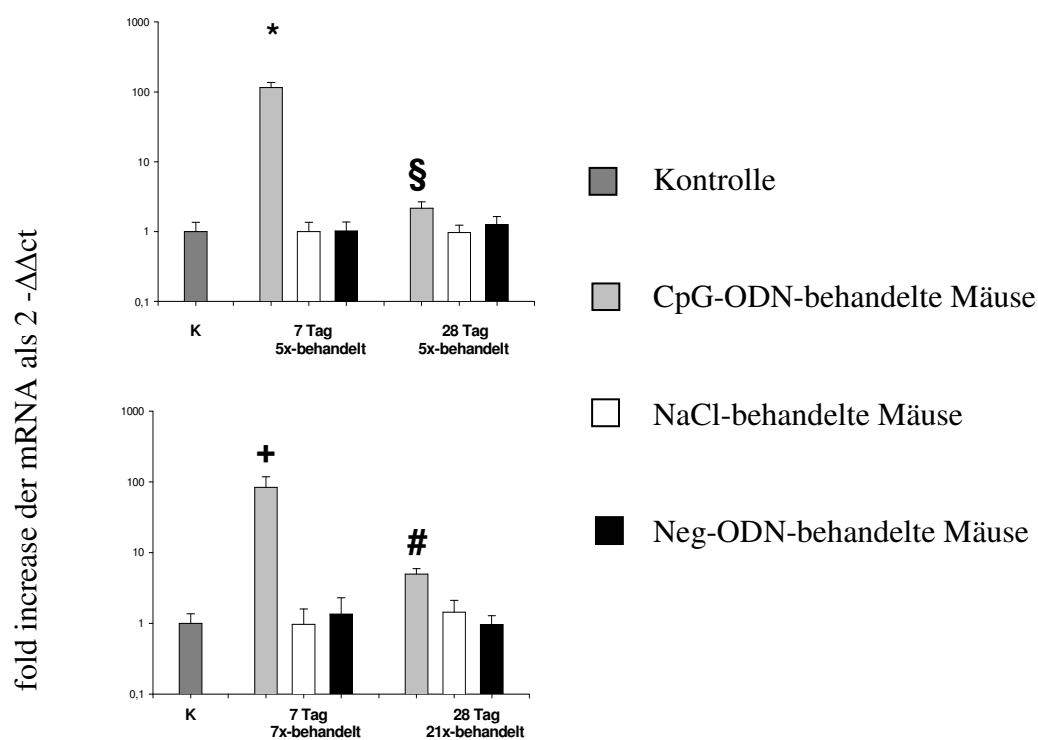


Abbildung 23: Leber-assoziierte IL-12p40 mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene IL-12p40 mRNA Werte in 5x-CpG-ODN, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, §, +, #) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p < 0,001$) und 5x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p < 0,001$) und 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,002$).

§ Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,001$) und zu 5x-Neg-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,011$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p < 0,001$), den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$) und den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,003$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$) und 7x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,029$) und den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$).

Signifikanter Unterschied zu 21x-NaCl-behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,002$) und zu den 21x-Neg-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,002$), den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,029$) und den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,003$).

4.2.2.2 TNF α

In der Leber konnte nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation eine einwöchige Hochregulierung der TNF α mRNA Expression nachgewiesen werden.

Die Hochregulierung mit der deutlichsten statistischen Signifikanz, ca. 150 mal höher verglichen mit der Expression bei den Kontrolltieren, fand sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren, gefolgt von den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren um das über 100-fache. Eine, wenn auch schon deutlich niedrigere signifikante Hochregulierung um das beinahe 3-fache fand sich in den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren. Keine Signifikanz ergab sich für die 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren verglichen mit ihren jeweiligen Kontrollen.

Genau dargestellt konnten an Tag 7 bei den CpG-ODN behandelten Tieren im Vergleich zu den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren sowohl in den 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,029$; $p \leq 0,016$) als auch in den 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,008$; $p \leq 0,008$) signifikant erhöhte TNF α Werte festgestellt werden. Bei den 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen, zeigten sich an Tag 28 signifikant höhere TNF α Werte als in den jeweiligen Kontrolltieren ($p < 0,001$; $p < 0,001$).

Beim Vergleich der CpG-ODN behandelten Gruppen untereinander fand sich, dass die Expressionshöhe in 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 28 signifikant niedriger war als an Tag 7 ($p < 0,016$). Ebenso verhielt es sich im Vergleich mit den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,008$) und den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p < 0,001$). Bei den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen konnten signifikant niedrigere TNF α Werte beobachtet werden als in 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 behandelten Mäusen ($p \leq 0,004$). Sehr interessant auch hier, dass an Tag 7 die TNF α Expressionshöhe in 5x-CpG-ODN behandelten Tieren höher war als in 7x-CpG-ODN behandelten Tieren.

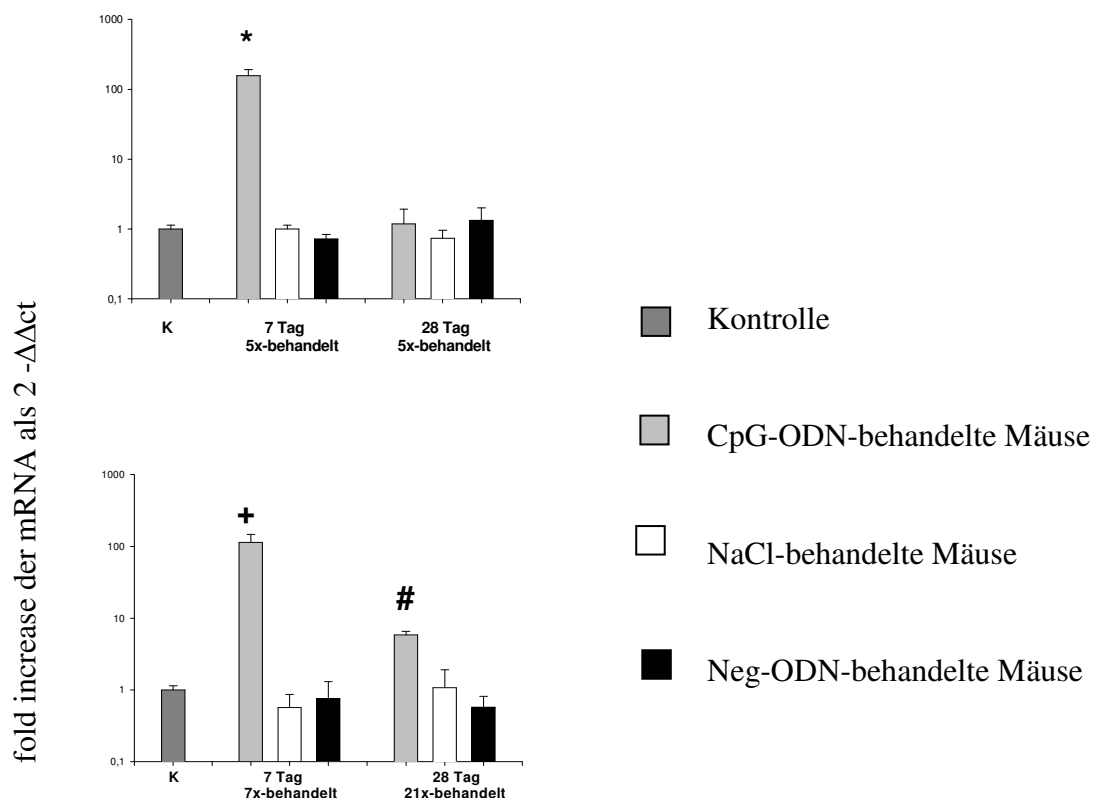


Abbildung 24: Leber-assoziierte TNF alpha mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene TNF α mRNA Werte in 5x-CpG-ODN, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, +, #) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,029$) und den 5x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,016$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,016$) und den 21x-CpG behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,004$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,008$) und 7x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,008$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,008$).

Signifikanter Unterschied zu den 21x-NaCl behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$) und den 21x-Neg-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,004$) und zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$).

4.2.2.3 C1q

In der Leber konnte nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation eine einwöchige Hochregulierung der C1q mRNA Expression nachgewiesen werden.

Die höchsten C1q-Spiegel fanden sich an Tag 7 in den 5x und 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen. Hier war eine Hochregulierung um den Faktor 10 nachweisbar. Eine, wenn auch

schon deutlich niedrigere signifikante Hochregulierung fand sich in den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren. Keine Signifikanz ergab sich für die 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren verglichen mit ihren jeweiligen Kontrollen.

Genauer gesagt konnten an Tag 7 bei den CpG-ODN behandelten Tieren im Vergleich zu den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren sowohl in den 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,029$; $p < 0,001$) als auch in den 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,008$; $p \leq 0,008$) erhöhte C1q Werte festgestellt werden. An Tag 28, konnten bei den 5x-CpG-ODN behandelten Tieren, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen kein erhöhter C1q Spiegel nachgewiesen werden. Bei den 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen hingegen, zeigten sich signifikant höhere C1q Werte als in der jeweiligen NaCl-Kontrollgruppe ($p < 0,015$).

Die Expression in 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 28 war signifikant niedriger war als an Tag 7 ($p < 0,001$). Ebenso verhielt es sich im Vergleich mit den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$) und den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p < 0,007$). Bei den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen konnten signifikant niedrigere C1q Werte beobachtet werden als in 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 behandelten Mäusen ($p \leq 0,001$). Die C1q Werte waren bei den 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 28 signifikant niedriger als bei den 7x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 7 ($p \leq 0,006$).

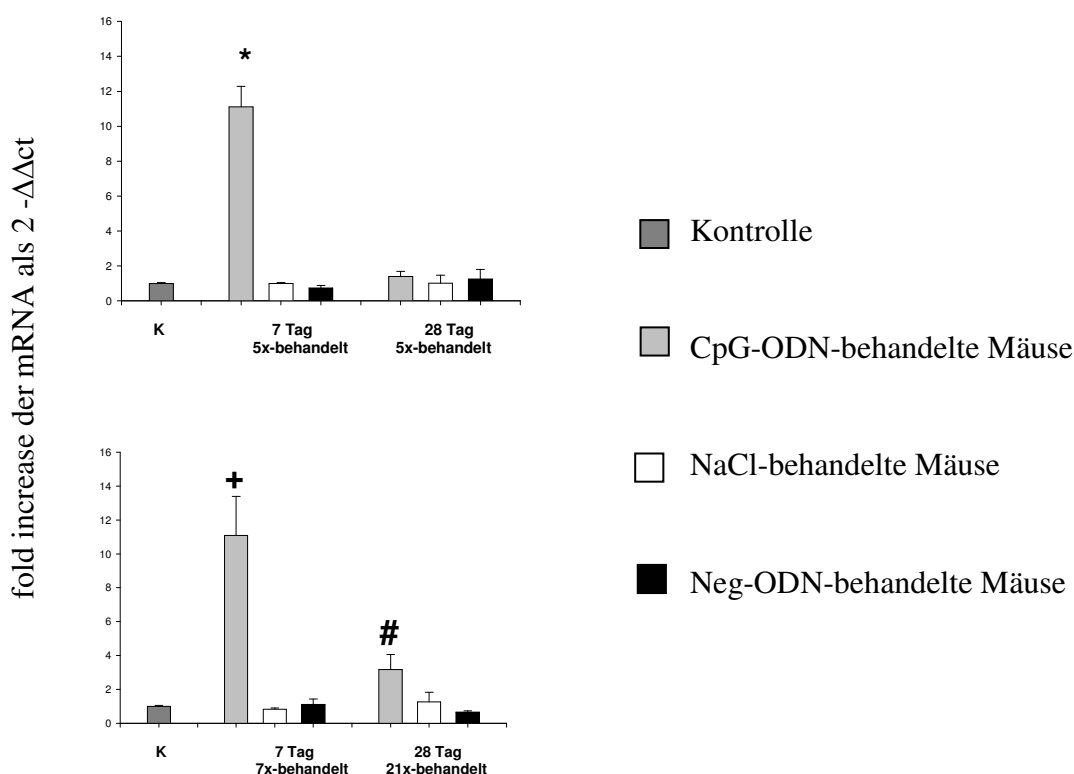


Abbildung 25: Leber-assoziierte C1q mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene C1q mRNA Werte in 5x-CpG-ODN, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, +, #) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,029$) und 5x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$) und den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,001$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,008$) und 7x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,008$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,006$) und den 5x-CpG-ODN behandelten an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$).

Signifikanter Unterschied zu den 21x-Neg-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,015$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,001$), den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,006$) und den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,007$).

4.2.2.4 IFN γ

In der Leber konnte nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation eine einwöchige Hochregulierung der IFN γ mRNA Expression nachgewiesen werden.

Die Hochregulierung mit der deutlichsten statistischen Signifikanz fand sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren, um das knapp 150-fache über der Expression der Kontrolltiere, gefolgt von den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ca. um den Faktor 50. Eine, wenn auch schon deutlich niedrigere signifikante Hochregulierung fand sich in den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren um das knapp 3-fache. Keine Signifikanz ergab sich für die 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren verglichen mit ihren jeweiligen Kontrollen.

Genauer gesagt konnten an Tag 7 bei den CpG-ODN behandelten Tieren im Vergleich zu den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren sowohl in den 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p \leq 0,029$; $p < 0,016$) als auch in den 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p < 0,001$; $p < 0,001$) erhöhte IFN γ Werte festgestellt werden. An Tag 28, konnten bei den 5x-CpG-ODN behandelten Tieren, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen kein erhöhter IFN γ Spiegel nachgewiesen werden. Bei den 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen hingegen, zeigten sich signifikant höhere IFN γ Werte als in der jeweiligen NaCl-Kontrollgruppe ($p < 0,024$) bzw. der Neg-ODN behandelten Kontrolle ($p \leq 0,009$).

Beim Vergleich der 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäuse fand sich ein signifikant höherer C1q Spiegel als in den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,014$). Die Expressionshöhe in 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 28 war signifikant niedriger als an Tag 7 ($p < 0,016$). Ebenso verhielt es sich im Vergleich mit den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$). Bei den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen konnten signifikant niedrigere IFN γ Werte beobachtet werden als in 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,037$) und in 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,027$).

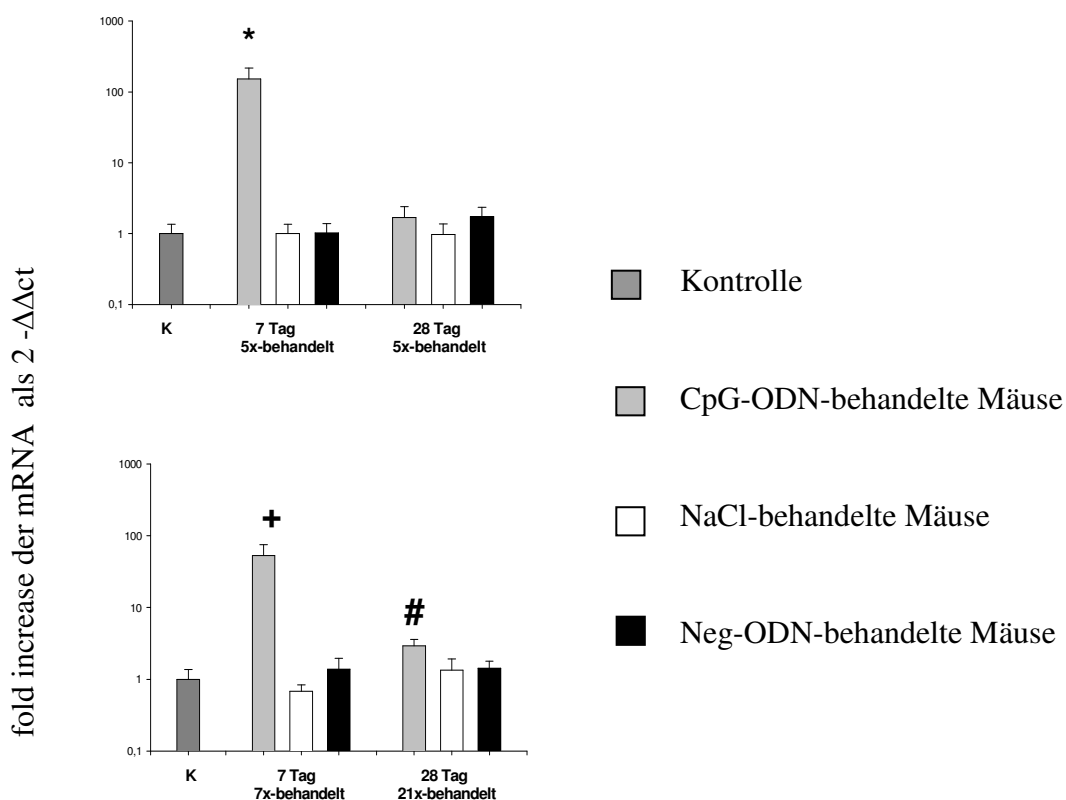


Abbildung 26: Leber-assoziierte IFN γ mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene IFN γ mRNA Werte in 5x-CpG-ODN, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, +, #) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,029$) und 5x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,016$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p < 0,014$), den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,016$) sowie zu den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,037$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$) und 7x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,014$), den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,027$), sowie den 5x-CpG-ODN behandelten an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$).

Signifikanter Unterschied zu den 21x-NaCl behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,024$) und den 21x-Neg-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,009$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,037$) und den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,027$).

4.2.2.5 STAT3

In der Leber konnte nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation nur eine kurzfristige zwei Tage bestehende Hochregulierung der STAT3 mRNA Expression nachgewiesen werden.

Die Hochregulierung mit der deutlichsten statistischen Signifikanz fand sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren, um das knapp 2,5-fache verglichen mit der Expression der Kontrolltiere, gefolgt von den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren um das 1,7-fache. An Tag 28 gab es weder bei den 5x-CpG-ODN noch bei den 21x-CpG-ODN behandelten Tieren signifikante Unterschiede zu ihren jeweiligen NaCl oder Neg-ODN Kontrollen.

Genauer gesagt konnten an Tag 7 bei den CpG-ODN behandelten Tieren im Vergleich zu den NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Tieren sowohl in den 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p < 0,001$; $p < 0,001$) als auch in den 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen ($p < 0,001$; $p < 0,003$) erhöhte STAT3 Werte festgestellt werden. Beim Vergleich der CpG-ODN behandelten Gruppen untereinander ergab sich folgendes: An Tag 7 zeigten die 5x-CpG-ODN behandelten Tiere interessanterweise einen signifikant höheren STAT3 Spiegel als die 7x-CpG-ODN behandelten Tiere ($p < 0,001$). Die Expressionshöhe in 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 28 war signifikant niedriger als an Tag 7 ($p < 0,001$). Ebenso verhielt es sich im Vergleich mit den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$). Bei den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen konnten signifikant niedrigere STAT3 Werte beobachtet werden als in 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 behandelten Mäusen ($p \leq 0,005$) und den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,004$).

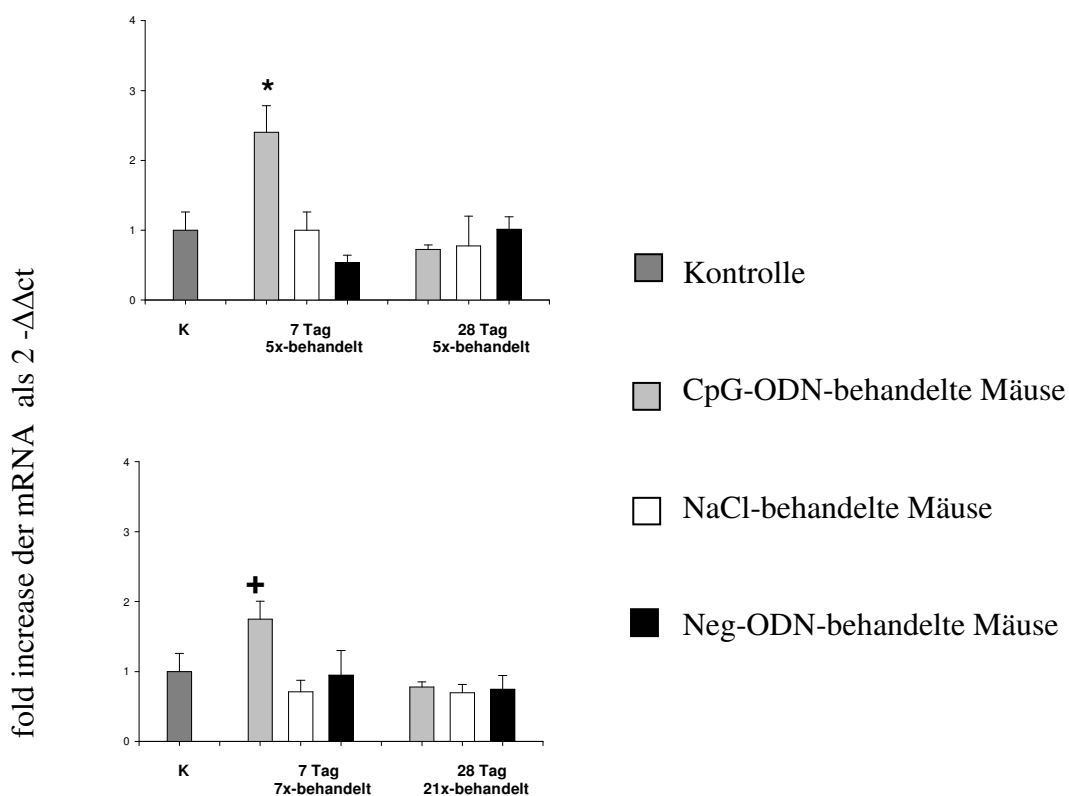


Abbildung 27: Leber-assoziierte STAT3 mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN

Durch Real-time PCR erhobene STAT3 mRNA Werte in 5x-CpG-ODN, 7x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen und entsprechenden Kontrollen.

Die Daten sind als Fold increase ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) verglichen zu NaCl behandelten Mäusen dargestellt. Als Referenzgen diente GAPDH. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei bis fünf Tieren. Zur Erhebung der Expressionsunterschiede wurde der Student's t-test mit den jeweils zugehörigen Kontrollgruppen durchgeführt.

Die Symbole (*, +) stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen CpG-ODN behandelten Tieren und ihren NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollgruppen ($p \leq 0,05$).

* Signifikanter Unterschied zu 5x-NaCl-behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,001$) und 5x-Neg-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p \leq 0,001$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,018$) sowie zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p < 0,001$) und zu den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,005$).

+ Signifikanter Unterschied zu 7x-NaCl behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p < 0,001$) und 7x-Neg-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen ($p \leq 0,003$). Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren ($p \leq 0,018$), zu den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren ($p \leq 0,004$) und zu den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Mäusen ($p < 0,001$).

5 Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der immunstimulatorische Effekt durch eine repetitive Gabe von CpG-ODN verlängert werden kann, wobei im Gehirn keine Anzeichen einer potentiellen Organschädigung nachweisbar waren. Weder in der HE-Färbung zeigten sich pathologische Veränderungen noch waren mit CD 11b bzw. GFAP bindenden Antikörpern reaktive Zellen feststellbar. In der Real-time PCR jedoch war eine Aktivierung des Immunsystems über einen längerfristigen Zeitraum nachweisbar.

In der Leber waren sowohl bei den Tieren, die während der CpG-ODN-Behandlung getötet worden waren als auch bei den Tieren, die zwei Tage nach der letzten CpG-ODN-Gabe getötet worden waren, pathologische Veränderungen sowohl in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung als auch in der Immunhistologie nachweisbar, die aber nach dem Absetzen der CpG-ODN-Gabe rasch reversibel waren und somit der Leber keinen histologisch sichtbaren Schaden zufügen, während, anhand der Ergebnisse der Real-time PCR gezeigt, der immunstimulatorische Effekt beibehalten werden konnte. Somit wäre es denkbar, repetitive CpG-ODN-Gabe als Therapeutikum einzusetzen und möglicherweise organspezifische Immunität zu induzieren. Allerdings müssten noch genauere Studien durchgeführt werden, welche die inflammatorische Wirkung genauer untersuchen, vor allem bezogen auf die Hepatotoxizität.

5.1 Gehirn

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mehrmalige periphere CpG-ODN-Gabe zu länger anhaltender TNF α mRNA und kurzzeitiger IFN γ und C1q mRNA Überexpression führen kann. Die Hochregulierung von IL-12p40 im Gehirn kann hingegen durch die repetitive CpG Gabe nicht verlängert werden. Da keine pathologisch sichtbaren Veränderungen und keine verstärkte reaktive Gliose im Gehirngewebe sichtbar waren, spricht das dafür, dass die Hochregulierung der TNF α , IFN γ , IL-12p40 und C1q mRNA Werte nicht zu einem entzündungsbedingten Gehirngewebsschaden führt.

5.1.1 Histologie

5.1.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Dass sich in der HE Färbung keine pathologischen Veränderungen zeigen, kann als Zeichen gewertet werden, dass eine repetitive CpG-Gabe im Gehirn zwar einen immunstimulatorischen Effekt bewirkt, wie in der Real-time PCR nachgewiesen werden konnte, dieser sich aber in Bezug auf die Immunstimulation positiv äußert und es zu keiner Gewebeschädigung durch die Aktivierung kommt.

5.1.1.2 CD 11b

In der Immunhistologie konnte mit diesem Antikörper keine verstärkte Mikroglia-Aktivierung bei den CpG-ODN behandelten Tieren nachgewiesen werden. Hier ist aber anzunehmen, dass zumindest eine kurzfristige Aktivierung besteht, was in der Real-time PCR mit C1q als Mikroglia marker gezeigt werden konnte. Da die signifikante Erhöhung des mRNA Wertes von C1q nur etwa das 1,5-fache der Kontrolltiere beträgt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Erhöhung mit der weniger sensitiven Methode der Immunhistologie unterhalb der Nachweisschwelle liegt.

5.1.1.3 GFAP

Auch mit dieser Färbung konnten keine Unterschiede der GFAP Expression zwischen den CpG-ODN behandelten Tieren und ihren jeweiligen Kontrolltieren nachgewiesen werden. Zwar könnte auch hier angenommen werden, dass die Sensitivität der Immunhistologie nicht ausreicht um eine Hochregulierung nachzuweisen, da aber auch in der Real-time PCR für diesen Marker keine signifikante Hochregulierung erfolgte, kann angenommen werden, dass Astrozyten weniger auf eine CpG-ODN-Gabe ansprechen als Mikrogliazellen oder erst ab einer höheren Dosis reagieren. Ebenfalls denkbar wäre eine extrem kurze Reaktion von nur einigen Stunden, die wir mit diesem Versuchsaufbau nicht nachweisen konnten.

5.1.2 Real-time PCR

5.1.2.1 TNF α

An Tag 7 konnten erhöhte TNF α Werte bei den CpG-ODN behandelten Tieren im Gegensatz zu den jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN behandelten Kontrollen sowohl in den 5x-CpG behandelten als auch in den 7x-CpG behandelten Mäusen beobachtet werden, was auf eine Induktion von ZNS-assoziiertes TNF α mRNA nach peripherer Applikation hindeutet.

Es gab keinen nennenswerten Unterschied zwischen 5x-CpG-ODN behandelten und 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 7, was deutlich macht, dass zwei zusätzliche CpG Applikationen keine signifikante Veränderung der TNF α mRNA bewirken. An Tag 28 zeigten sich bei den 5x-CpG-ODN behandelten Tieren verglichen mit den jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN Kontrollen keine erhöhten TNF α Werte, während die 21x-CpG-ODN behandelte Gruppe signifikant höhere TNF α mRNA Werte als die entsprechenden Kontrollen zeigte. Das spricht dafür, dass die Induktion von TNF α mRNA direkt an die Applikation von CpG-ODN geknüpft ist, auch weil die TNF α Spiegel 2 Wochen nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation wieder annähernd Normalmaß erreicht haben, was sich in 5x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 28 und den entsprechenden Kontrollen ablesen lässt.

Das Abfallen des TNF α Spiegels wird weiterhin dadurch verifiziert, dass die TNF α Werte in 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 28 signifikant niedriger waren als an Tag 7, ebenso wie in 7x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 7 und in 21x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 28. Die TNF α Spiegel waren an Tag 28 bei den 21x-CpG-ODN behandelten Mäusen niedriger als an Tag 7 in 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen, was ein Indiz dafür ist, dass nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation der TNF α Spiegel konstant abfällt.

5.1.2.2 C1q

5x-CpG-ODN behandelte Mäuse zeigten eine signifikant höhere Expression als 5x-NaCl behandelte Tiere und höhere C1q Werte verglichen mit Neg-ODN behandelten Mäusen.

7x-CpG-ODN behandelte Tiere zeigten statistisch signifikant höhere C1q Werte als 7x-NaCl-behandelte Mäuse und Neg-ODN behandelte Tiere. Der Anstieg von C1q zeigte hingegen einen anderen zeitlichen Verlauf als die TNF α Induktion. Sowohl 5x-CpG-ODN als auch 21x-CpG-ODN-behandelte Mäuse zeigten beide beinahe normale C1q Werte, wie ein Vergleich mit Kontrollen an Tag 28 zeigt. Diese Beobachtung spricht für eine nur kurze Induktion des C1qs nach peripherer CpG-ODN-Applikation mit merklich anderem zeitlichen Verlauf als TNF α .

C1q mRNA Werte waren an Tag 7 sowohl in 5x-CpG-ODN als auch in 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen erhöht. An Tag 28 hingegen hatten sowohl 5x-CpG-ODN als auch 21x-CpG-ODN behandelte Mäuse eine annähernd normale C1q mRNA Expression, so dass unabhängig von mehrmaliger CpG-ODN-Gabe keine Verlängerung der Hochregulierung nachgewiesen werden konnte. Diese Hochregulierung ist weitgehend auf eine Mikroglia Aktivierung zurückzuführen (Johnson, S. A. et al. 1994); (Pasinetti, G. M. et al. 1992); (Schafer, M. K. et al. 2000). Die Tatsache, dass histologisch mit dem CD 11b bindenden Antikörper keine sichtbaren Zeichen einer starken Mikrogliaaktivierung beobachtet werden konnten, spricht für einen niedrigen Mikrogliaaktivierungszustand, der sich nur in der mRNA Expression bemerkbar macht, nicht aber mit der wesentlich weniger sensitiven Methode der Immunhistologie nachzuweisen ist. Alternativ kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die C1q Hochregulierung von anderen Zelltypen ausgeht, auch wenn bei Lynch et al. (Lynch, N. J. et al. 2004) beschrieben ist, dass Mikroglia die einzigen Zellen im Gehirn sind, die in vivo C1q synthetisieren. Die Folgen einer C1q-Hochregulierung müssten noch weiter erforscht werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass C1q wichtig ist beim Schutz gegen eine Streptokokkenmeningitis (Rupprecht, T. A. et al. 2007). Demzufolge, könnte man durch eine repetitive CpG-ODN-Gabe das angeborene Immunsystem aktivieren und somit eine Schutzwirkung gegen Streptokokken induzieren.

C1q Werte waren niedriger bei den 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen als bei den 5x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 7. Das spricht für eine Induktion von Hyporesponse nach 7 aufeinander folgenden Tagen, wie sie auch für Makrophagen beschrieben ist (Yeo, S. J. et al. 2003).

5.1.2.3 IFN γ

An Tag 7 zeigten sowohl 5x-CpG-ODN behandelte Mäuse eine signifikant höhere Expression als 5x-NaCl bzw. Neg-ODN behandelte Tiere als auch 7x-CpG-ODN behandelte Tiere verglichen mit ihren jeweiligen NaCl bzw. Neg-ODN Kontrollgruppen. IFN γ zeigt hier einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie C1q.

Sowohl 5x-CpG-ODN und 21x-CpG-ODN-behandelte Mäuse zeigten beide beinahe normale IFN γ Werte, wie ein Vergleich mit Kontrollen an Tag 28 zeigt. Auch hier zeigt sich ein gleichmäßiger Abfall der IFN γ Werte, da die IFN γ Expression in den 21x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren auf einem etwas höheren Niveau liegt als in den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 28 getöteten Tieren, bei welchen die letzte Applikation um zwei Wochen länger zurück liegt.

Sehr interessant ist auch hier, dass die IFN γ mRNA Werte der 5x-CpG-ODN behandelten Mäuse höher waren als die Vergleichswerte in 7x-CpG-ODN behandelten Mäusen an Tag 7. Auch hier wird als mögliche Erklärung eine Art Hyporesponse angenommen (Yeo, S. J. et al. 2003).

5.1.2.4 IL-12p40

Als einzige signifikante Hochregulierung wurden erhöhte IL-12p40 Werte in den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Mäusen gefunden. Das spricht dafür, dass sich IL-12p40 im speziellen von einer längerfristigen CpG Gabe nicht beeinflussen lässt, obwohl dieses Zytokin ja relativ spezifisch auf die Anwesenheit von CpG, verglichen mit LPS, reagieren soll (Dalpke, A. H. et al. 2002); (Takeshita, S. et al. 2001). Die höchste Expression findet sich weiterhin auch hier in den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren und nicht in den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren.

5.1.2.5 STAT3

Die repetitive CpG-ODN Gabe scheint im Gehirn keine Wirkung auf die Höhe der STAT3 mRNA Expression zu besitzen. Es kann dennoch sein, dass es zu einer Hochregulierung kommt, die aber nur maximal einige Stunden anhält und somit in unserem Versuchsaufbau, bei dem die erste Untersuchung in den 7x CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren 18 Stunden nach der letzten CpG Gabe stattfand, nicht mehr erfasst wurde. Hier kann man davon ausgehen, dass sich keine verlängerte STAT3 Expression durch eine repetitive CpG Gabe erzielen lässt.

Es wäre durchaus denkbar, dass die verminderte Verlängerung der Zytokinexpression spezifisch ist für C1q und IFN γ und dass TNF α in einer anderen Art und Weise im Gehirn hochreguliert wird. Ein ähnliches Phänomen ist bei Makrophagen beschrieben, wo einige Zytokine durch Selbstinduzierte-Hyporesponse beeinflusst werden, andere hingegen nicht (Yeo, S. J. et al. 2003). Hinzu kommt die Tatsache, dass die CpG-ODN vermittelte Hyporesponse nicht bloß eine Induktion von Zellabbau ist, sondern vielmehr eine höchst unterschiedliche Umprogrammierbarkeit von Zellen widerspiegelt. Das würde bedeuten, dass die Induktion von Selbst-Hyporesponse, genauso wie für Makrophagen bestätigt (Yeo, S. J. et al. 2003), auch im Gehirn existiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine mehrmalige periphere CpG-ODN-Applikation einen verstärkten Anstieg von TNF α mRNA im Gehirn bewirkt, der annähernd zwei Wochen nach Beendigung der CpG-ODN-Applikation zurück auf Normalniveau absinkt. Das zeigt der Vergleich mit nahezu normalen mRNA Werten in 5x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 28, aber erhöhten TNF α mRNA Werten in 21x-CpG-ODN behandelten Tieren an Tag 28. Daher ist es nicht einfach nur eine Induktion der Immunaktivierung über die Länge der CpG-ODN-Applikation, sondern wie der hohe TNF α Wert der 21x-CpG-ODN an Tag 28 getöteten Tieren beweist, bleibt der höhere Wert über eine Woche nach der letzten Applikation erhalten.

Das könnte einerseits als Depot-Effekt nach mehrmaliger CpG-ODN-Gabe interpretiert werden. Andererseits könnten die TNF α produzierenden Zellen über den untersuchten Zeitraum hinweg aktiviert bleiben. Da man sehr genau weiß, dass CpG-ODN den Effekt bakterieller DNA nachahmt (Takeshita, S. et al. 2001), hätten das zur Folge, dass ein mehrfacher, peripherer Kontakt mit bakterieller DNA, wie er z.B. bei Patienten mit Sepsis vorkommt, zu erhöhten TNF α mRNA Werten im ZNS führt. Patientenbezogene klinische Studien mit Sepsis Patienten müssten zur Bestätigung dieser Theorie herangezogen werden. Man weiß, dass ZNS-assoziierte Zytokine, wie TNF α einen immunoprotektiven Effekt beim Schutz vor ZNS Infektionen (Chao, C. C. et al. 1994); (Cheeran, M. C. et al. 2000) und Tumoren (Nakaichi, M. et al. 1996) besitzen. Hierfür bietet das Aufrechterhalten von erhöhten TNF α Werten durch mehrmalige periphere CpG-ODN-Applikation einen möglichen therapeutischen Ansatz, um eine länger andauernde Immunoprotektivität zu erzielen.

Dennoch sollte im Auge behalten werden, dass ebenfalls Studien vorliegen, bei denen Mäuse CpG-ODN verabreicht bekamen und anschließend basischem Myelin-Protein ausgesetzt wurden. Diese Tiere hatten ein erhöhtes Risiko eine experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE) zu entwickeln (Segal, B. M. et al. 1997). Deshalb ist hier Vorsicht geboten. Betrachtet man den Möglichkeiten, die zur Aktivierung der ZNS Zellen nach peripherer CpG-ODN-Gabe führen, ist es denkbar, dass CpG-ODN direkt die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Aufgrund des hohen Molekulargewichts von CpG, ist diese Möglichkeit aber vorwiegend bei einer nicht mehr intakten Blut-Hirn Schranke gegeben. Wahrscheinlicher ist, dass CpG-ODN einen second-messenger aktiviert, der zu einer Zytokinhochregulierung im Gehirn führt. Weitere Studien sind dringend nötig, um die Vermittlung der Wirkungsweise von CpG-ODN auf das Gehirn besser zu verstehen und um die Folgen von anhaltender ZNS-Immunkaktivierung nach mehrmaliger CpG-ODN-Applikation genauer zu untersuchen.

5.2 Leber

In der Leber kam es sowohl histologisch als auch in der Real-time PCR nachweisbar zu einer längerfristigen Immunaktivierung. Das histologische Bild zeigte kurzfristig deutliche Leukozyteninfiltrate, die als pathologische Veränderung der Leber zu werten sind. Da diese jedoch nur kurzfristig nach der CpG-ODN-Applikation auftraten und sich nach deren Absetzen rasch zurückbildeten, die immunstimulatorische Wirkung jedoch anhielt, wird angenommen, dass der positive Effekt überwiegt.

5.2.1 Histologie

5.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Es fanden sich während und zwei Tage nach der letzten CpG-ODN-Applikation verstärkt Lymphozyteninfiltrate, die auf eine Hepatitis zurückzuführen sind. Da sich die Infiltrate jedoch mit dem Absetzen der CpG-ODN-Applikation rasch zurückbildeten, ist die Leberpathologie reversibel und scheint der Leber keine bleibenden Schäden zuzuführen. Dennoch müssten, um CpG-ODN als Therapeutikum nutzen zu können noch genauere Studien über Lebertoxizität durchgeführt werden.

5.2.1.2 Chloracetat-Esterase-Färbung

Da in der Chloracetat-Esterase-Färbung keine angefärbten Granulozyten sichtbar waren, lässt sich daraus ableiten, dass die Leukozyteninfiltrate hauptsächlich aus Zellen des erworbenen Immunsystems bestehen. Es handelt sich hier, wie durch die anderen Immunhistologischen Färbungen gezeigt werden konnte, um T- und B-Lymphozyten aber auch Makrophagen.

5.2.1.3 CD 11b

Eine Aktivierung der Kupffer-Sternzellen war bis zu zwei Tage nach der letzten CpG-ODN-Gabe nachweisbar. Eine allgemein verstärkte Makrophagen-Invasion ist bis zu drei Wochen nach der letzten CpG-ODN-Gabe nachweisbar. Makrophagen scheinen zu den durch die CpG-ODN-Gabe am stärksten beeinflussbaren Zellen zu gehören. Es wird davon ausgegangen, dass sie eine der Hauptquellen für die Hochregulierung der Zytokinexpression darstellen. Die Makrophagen ihrerseits aktivieren wiederum verstärkt B- und T-Lymphozyten, die ebenfalls an der Immunreaktion beteiligt sind.

5.2.1.4 CD 8

Es fanden sich kurzfristig CD 8 positive T-Lymphozyten, vorwiegend in den Infiltraten. Das könnte bedeuten, dass es kurzfristig zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten kommt, diese aber nach dem Ende der CpG-ODN-Applikation rasch wieder abnimmt. Somit bestünde ein potentiell Risiko für eine Autoimmunitätsreaktion.

5.2.1.5 B220

Es kam zu einer längerfristigen B-Lymphozyten Aktivierung. Diese Zellen sind jedoch nicht ausschließlich auf die Infiltrate beschränkt, sondern verteilen sich im gesamten Leberparenchym. Es scheint also zu einer verstärkten Antikörperproduktion zu kommen, wie sie bisher nur für der Milz beschrieben ist (Sethi, S. et al. 2005).

5.2.2 Real-time PCR

5.2.2.1 IL-12p40

IL-12p40, das eine relativ spezifische Reaktion auf CpG-ODN im Vergleich zu LPS zeigen soll (Dalpke, A. H. et al. 2002), war in der Leber bis zu drei Wochen nach Ende der CpG-ODN-Applikation hochreguliert. Von allen untersuchten Zytokinen in der Leber hatte es die längste Nachweisbarkeit. Im Gegensatz dazu war es im Gehirn wiederum nur sehr kurzfristig hochreguliert. Das könnte an der noch nicht vollständig erforschten Weise liegen, wie die Wirkung von CpG-ODN die Blut-Hirn Schranke passiert.

Auch hier zeigte sich die höchsten mRNA Expression bei den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren, anstatt wie zu erwarten wäre, in den 7x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren. Auch hier wird als Ursache eine Art Hyporesponse angenommen. Auch fällt der Zytokinpiegel konstant ab, was auf jeden Fall für eine CpG-ODN indizierte Stimulierung spricht.

5.2.2.2 TNF α , C1q und IFN γ

Die drei Zytokine TNF α , C1q und IFN γ scheinen in der Leber demselben Aktivierungsmuster und demselben zeitlichen Verbleib im Organismus zu folgen, da diese sowohl jeweils mindestens eine Woche nach der letzten CpG-ODN-Gabe noch signifikant hochreguliert waren, als auch mit demselben zeitlichen Verlauf abgebaut werden und auch hier das Phänomen der Hyporesponse in den 5x-CpG-ODN behandelten, an Tag 7 getöteten Tieren zu beobachten ist. Das könnte heißen, dass sie alle einem gleichen Reaktionsspektrum eines bestimmten Zelltyps, hier vermutlich vorwiegend Makrophagen, unterliegen.

5.2.2.3 STAT3

Da STAT3 in der Leber auch nur eine sehr kurze Hochregulierung erfährt, scheint für dieses Zytokin eine anderer zeitlicher Verlauf vorzuliegen, der sich auch durch die repetitive Gabe von CpG-ODN nur um 2 Tage verlängern lässt. Jedoch auch hier findet sich, wie bei den anderen Zytokinen, das Phänomen der selbstregulierenden Hyporesponse. Es scheint, dass STAT3 anderen Signalkaskaden unterliegt, die durch eine repetitive CpG-ODN-Gabe weitgehend unbeeinflusst bleiben.

Abschließend fällt auf, dass die Expressionswerte in der Leber oft das 100-fache der Gehirnspiegel erreichen. Wie das CpG-ODN seine Wirkung durch die Blut-Hirn-Schranke entfaltet, ist wie bereits erwähnt, noch unerforscht. Es scheint eine positive immunstimu-

latorische Wirkung zu zeigen, allerdings müsste man noch genauere Studien über eine potentielle Hepatotoxizität oder Autoimmunität durchführen, um mehr Sicherheit beim Einsatz als Therapeutikum zu gewähren.

6 Zusammenfassung

Unmethylierte bakterielle DNA, die reich an CG Sequenzen ist stimuliert das angeborene Immunsystem. Die Vermittlung dieser Wirkung erfolgt über den Toll-like Rezeptor 9. Reine CG Sequenzen sind im Organismus nicht stabil, da sie sehr rasch von den körpereigenen Nukleasen abgebaut werden. Mit synthetisch hergestellten Oligodeoxyribonukleotiden, sogenannten CpG-ODNs, kann eine Nukleaseresistenz erzielt werden und der immunstimulatorische Effekt nachgeahmt werden.

Weiterhin wirken sich CpG-ODNs positiv auf den Verlauf von bakteriellen Infektionen, Tumoren und Prioninfektionen aus.

Man weiß, dass eine Aktivierung des Immunsystems durch einmalige Gabe von CpG-ODNs nur über einen kurzen Zeitraum stattfindet. Die CpG-ODNs führen im Organismus innerhalb von Minuten zu einem mRNA Anstieg und innerhalb von Stunden zu einer kurzfristigen Zytokinsekretion und IgM Produktion, werden dann aber rasch abgebaut, so dass der immunstimulatorische Effekt in der Regel nur kurz anhält.

Um CpG-ODN als Therapeutikum besser nutzen zu können liegt der Wunsch nahe, die Wirkung von CpG-ODN zu verlängern. Eine mögliche Strategie ist hierbei eine repetitive Applikation.

Ziel dieser Arbeit war, den immunstimulatorischen Effekt von repetitiver CpG-ODN-Gabe besser zu verstehen und mit der Repetition die Wirkung zu verlängern. Damit könnte CpG-ODN als Therapeutikum bei bakteriellen Infektionen, Tumoren und bei Prionerkrankungen wirkungsvoll eingesetzt werden.

In dieser Arbeit wurden jeweils 12 Gruppen zu je 5 Mäusen gebildet, wobei die jeweiligen Gruppen an 5, 7 oder 21 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN Applikation i.p. erhielten. Die Mäuse wurden anschließend an Tag 7 oder 28 während bzw. nach der Behandlung getötet. So erhielt man folgende Gruppen:

5x-CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelte, an Tag 7 getötete Mäuse
5x-CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelte, an Tag 28 getötete Mäuse
7x-CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelte, an Tag 7 getötete Mäuse
21x-CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelte, an Tag 28 getötete Mäuse

Im Verlauf der Arbeit, die die immunmodulatorische Wirkung auf das Gehirn und die Leber der Maus untersucht, konnten zusammenfassend folgende Ergebnisse herausgearbeitet werden, die mittels Real time PCR und Immunhistologie gewonnen wurden.

Im Gehirn führt CpG-ODN zu einer mindestens einwöchigen Hochregulierung der mRNA von TNF α . Des Weiteren kommt es zu einer mindestens zweitägigen C1q und IFN γ Hochregulierung. Eine IL-12p40 Hochregulierung findet nur ca. 18 Stunden statt, während eine STAT3 Hochregulierung nicht nachweisbar ist. In der histologischen Betrachtung finden sich in der HE Färbung keine pathologischen Veränderungen der Hirnarchitektur und in einer immunhistologischen Färbung mit CD 11b und GFAP bindenden Antikörpern keine Unterschiede zwischen den CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Tieren.

In der Leber findet sich eine signifikante Hochregulierung von IL-12p40 über mindestens drei Wochen und eine C1q, TNF α und IFN γ Hochregulierung von mindestens einer Woche. Histologisch finden sich in der HE Färbung massive Leukozyteninfiltrate über min-

destens zwei Tage. In der Immunhistologie sieht man an den Infiltraten beteiligte aktivierte Makrophagen, T und B-Lymphozyten, jeweils dargestellt mit CD 11b, CD 8 und B220 bindenden Antikörpern.

Es zeigte sich, dass eine repetitive CpG-ODN-Gabe eine verlängerte stimulatorische Wirkung auf das Immunsystem ausübt, was Voraussetzung für den Einsatz als Therapeutikum ist. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass man durch periphere Gabe von CpG-ODN im Gehirn eine Immunstimulierung erreichen kann. Diese könnte im Rahmen einer Therapie von Prionerkrankungen, anderen Gehirninfectionen, Morbus Alzheimer oder Gehirntumoren Anwendung finden. Allerdings sind noch weitere Studien nötig, um Risiken wie Hepatotoxizität oder Autoimmunität besser abschätzen zu können und den Mechanismus zu erforschen, wie durch periphere Gabe von CpG-ODN eine immunologische Gehirnaktivierung erreichen wird. Eine wichtige Frage für die Zukunft ist hierbei, ob die Wirkung von CpG-ODN direkt auf die Gehirnzellen wirkt oder ob es einen second messenger gibt, der die Blut-Hirn-Schranke überwindet.

7 Summary

Immunostimulatory effect of repeated CpG-ODN-administration to the murine brain and the liver

It is well known, that unmethylated bacterial DNA, which contains CG motifs has a stimulatory effect to the immune system. The recognition of this effect is mediated via the toll-like receptor 9. This immunostimulatory effect was mimicked by synthetic oligodeoxyribonucleotides (CpG-ODNs), which are much more stable in the living organism.

It has been shown that CpG-ODN administration has a positive effect on infection diseases, tumors and prion infections.

This study wanted to investigate whether the strategy of consecutive CpG-ODN administration could be used to induce brain relevant immune activation as prion infection predominantly affects the brain.

Furthermore it was investigated whether the consecutive administration of CpG-ODN led to detrimental sideeffects in brain and liver tissue.

We choose four application patterns for CpG-ODN including a saline or Neg-ODN treated control respectively. So we got 12 groups following the proximate pattern:

5x-CpG-ODN, saline or Neg-ODN treated mice, sacrificed at day 7

5x-CpG-ODN, saline or Neg-ODN treated mice, sacrificed at day 28

7x-CpG-ODN, saline or Neg-ODN treated mice, sacrificed at day 7

21x-CpG-ODN, saline or Neg-ODN-treated mice, sacrificed at day 28

We were able to detect the following results by Real-time PCR and immunohistology on the immunomodulatory effect and chronological sequence on the murine brain and the liver.

In the brain mRNA TNF α levels are upregulated up to 1 week, mRNA levels of C1q und IFN γ are upregulated up to at least two days. Upregulation of IL-12p40 is detectable for a minimum of 18 h. An upregulation of STAT3 was not detectable in the brain. In immunohistology we didn't observe any pathological changes in brain morphology and no enhanced staining of microglia and astrocytes using antibodies for GFAP and CD 11b.

In the liver a significant upregulation for IL-12p40 mRNA for a minimum of 3 weeks was detected. Furthermore we observed upregulated mRNA levels for C1q, TNF α and IFN γ for minimum 1 week. STAT3 mRNA levels were upregulated up to two days.

By HE staining we observed massive infiltrates of leukocytes for at least 2 days. In immunohistology we detected active macrophages, T- and B-Lymphocytes by the antibodies CD 11b, CD 8 and B220.

Our study showed that it was possible to induce brain specific immune activation without observable side effects this may indicate the possibility to use such a strategy to combat brain diseases like prion infection, Alzheimer's disease etc.

Regarding the liver no longterm side effects were observed however further studies are needed to completely rule out relevant liver toxicity.

8 Literaturverzeichnis

- Akira, S. (2001) Toll-like receptors and innate immune system; *Tanpakushitsu Kakusan Koso* (46) 562 - 566
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity; *Nat.Immunol.* (2) 675 - 680
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H. R. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR; *Expert.Rev.Mol.Diagn.* (5) 209 - 219
- Baines, J. and Celis, E. (2003) Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides; *Clin.Cancer Res.* (9) 2693 - 2700
- Bird, A. P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation; *Nature* (321) 209 - 213
- Boje, K. M. and Arora, P. K. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death; *Brain Res.* (587) 250 - 256
- Boya, J., Calvo, J. L., Carbonell, A. L., and Borregon, A. (1991) A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells; *J.Anat.* (175) 229 - 236
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., and Van Noort, J. M. (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system; *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* (61) 1013 - 1021
- Byun, H. J., Jung, W. W., Lee, J. B., Chung, H. Y., Sul, D., Kim, S. J., Park, C. G., Choi, I., Hwang, K. W., and Chun, T. (2007) An evaluation of the neonatal immune system using a listeria infection model; *Neonatology.* (92) 83 - 90
- Carpentier, A. F., Xie, J., Mokhtari, K., and Delattre, J. Y. (2000) Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs; *Clin.Cancer Res.* (6) 2469 - 2473
- Chao, C. C., Gekker, G., Hu, S., and Peterson, P. K. (1994) Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines; *J.Immunol.* (152) 1246 - 1252
- Cheeran, M. C., Hu, S., Gekker, G., and Lokensgard, J. R. (2000) Decreased cytomegalovirus expression following proinflammatory cytokine treatment of primary human astrocytes; *J.Immunol.* (164) 926 - 933
- Colburn, R. W., DeLeo, J. A., Rickman, A. J., Yeager, M. P., Kwon, P., and Hickey, W. F. (1997) Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat; *J.Neuroimmunol.* (79) 163 - 175

- Cowdery, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K., and Krieg, A. M. (1996) Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides; *J.Immunol.* (156) 4570 - 4575
- Dalpke, A. H., Schafer, M. K., Frey, M., Zimmermann, S., Tebbe, J., Weihe, E., and Heeg, K. (2002) Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia; *J.Immunol.* (168) 4854 - 4863
- DeArmond, S. J., Mobley, W. C., DeMott, D. L., Barry, R. A., Beckstead, J. H., and Prusiner, S. B. (1987) Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection; *Neurology* (37) 1271 - 1280
- Dittmer, U. and Olbrich, A. R. (2003) Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs; *Curr.Opin.Microbiol.* (6) 472 - 477
- El Andaloussi, A., Sonabend, A. M., Han, Y., and Lesniak, M. S. (2006) Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors; *Glia* (54) 526 - 535
- Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., Stibitz, S., Conover, J. S., and Klinman, D. M. (1999) Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria; *J.Immunol.* (162) 2291 - 2298
- El-Malky, M., Shaohong, L., Kumagai, T., Yabu, Y., Noureldin, M. S., Saady, N., Maruyama, H., and Ohta, N. (2005) Protective effect of vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen and CpG as an adjuvant against *Toxoplasma gondii* in susceptible C57BL/6 mice; *Microbiol.Immunol.* (49): 639 - 646
- Elvin, S. J., Healey, G. D., Westwood, A., Knight, S. C., Eyles, J. E., and Williamson, E. D. (2006) Protection against heterologous *Burkholderia pseudomallei* strains by dendritic cell immunization; *Infect.Immun.* (74) 1706 - 1711
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., and Lee, Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000); *Neurochem.Res.* (25) 1439 - 1451
- Garcia, R. and Jove, R. (1998) Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling; *J.Biomed.Sci.* (5) 79 - 85
- Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U., and Pre-sky, D. H. (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses; *Annu.Rev.Immunol.* (16) 495 - 521
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G., and Sher, A. (1996) In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha; *J.Immunol.* (157) 798 - 805

- Giese, A., Brown, D. R., Groschup, M. H., Feldmann, C., Haist, I., and Kretzschmar, H. A. (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease 31; *Brain Pathol.* (8) 449 - 457
- Gilkeson, G. S., Ruiz, P., Phippen, A. M., Alexander, A. L., Lefkowitz, J. B., and Pisetsky, D. S. (1996) Modulation of renal disease in autoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA; *J.Exp.Med.* (183) 1389 - 1397
- Giulian, D. (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system; *J.Neurosci.Res.* (18) 155 - 3
- Giulian, D. and Baker, T. J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain; *J.Neurosci.* (6) 2163 - 2178
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression; *Methods* (25) 386 - 401
- Halliday, G. M., Cullen, K. M., Kril, J. J., Harding, A. J., and Harasty, J. (1996) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry in human cortex: a quantitative study using different antisera; *Neurosci.Lett.* (209) 29 - 32
- Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R., and Aguzzi, A. (2004) Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration; *Nat.Med.* (10) 187 - 192
- Hirano, T., Ishihara, K., and Hibi, M. (2000) Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors 21; *Oncogene* (19) 2548 - 2556
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition; *Annu.Rev.Immunol.* (20) 197 - 216
- Johnson, S. A., Pasinetti, G. M., and Finch, C. E. (1994) Expression of complement C1qB and C4 mRNAs during rat brain development; *Brain Res.Dev.Brain Res.* (80) 163 - 174
- Kennedy, D. W. and Abkowitz, J. L. (1997) Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model; *Blood* (90) 986 - 993
- Kimmelman, A. and Liang, B. C. (2001) Familial neurogenic tumor syndromes; *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* (15): 1073 - 1084
- Kishore, U. and Reid, K. B. (2000) C1q: structure, function, and receptors; *Immunopharmacology* (49) 159 - 170
- Kitamura, K., Maiti, A., Ng, D. H., Johnson, P., Maizel, A. L., and Takeda, A. (1995) Characterization of the interaction between CD45 and CD45-AP; *J.Biol.Chem.* (270) 21151 - 21157

- Kline, J. N., Waldschmidt, T. J., Businga, T. R., Lemish, J. E., Weinstock, J. V., Thorne, P. S., and Krieg, A. M. (1998) Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma; *J.Immunol.* (160) 2555 - 2559
- Klinman, D. M., Conover, J., and Coban, C. (1999) Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection; *Infect.Immun.* (67) 5658 - 5663
- Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., and Krieg, A. M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (93) 2879 - 2883
- Kopp, E. and Medzhitov, R. (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors; *Curr.Opin.Immunol.* (15) 396 - 401
- Krieg, A. M. (1995) CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus?; *J.Clin.Immunol.* (15) 284 - 292
- Krieg, A. M. (2000) Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs; *Vaccine* (19) 618 - 622
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Kotretzky, G. A., and Klinman, D. M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation; *Nature* (374) 546 - 549
- Lawson, L. J., Perry, V. H., and Gordon, S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain; *Neuroscience* (48) 405 - 415
- Levy, D. E. and Lee, C. K. (2002) What does Stat3 do?; *J.Clin.Invest* (109) 1143 - 1148
- Lien, E. and Ingalls, R. R. (2002) Toll-like receptors; *Crit Care Med.* (30) S1 - S11
- Ling, E. A., Penney, D., and Leblond, C. P. (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats; *J.Comp Neurol.* (193) 631 - 657
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method 1; *Methods* (25) 402 - 408
- Lynch, N. J., Willis, C. L., Nolan, C. C., Roscher, S., Fowler, M. J., Weihe, E., Ray, D. E., and Schwaeble, W. J. (2004) Microglial activation and increased synthesis of complement component C1q precedes blood-brain barrier dysfunction in rats 1; *Mol.Immunol.* (40) 709 - 716
- Mackenzie, A. (1983) Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in scrapie; *J.Comp Pathol.* (93) 251 - 259
- Mallat, M., Houlgatte, R., Brachet, P., and Prochiantz, A. (1989) Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro; *Dev.Biol.* (133) 309 - 311

- Messina, J. P., Gilkeson, G. S., and Pisetsky, D. S. (1991) Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA; *J.Immunol.* (147) 1759 - 1764
- Mor, G., Singla, M., Steinberg, A. D., Hoffman, S. L., Okuda, K., and Klinman, D. M. (1997) Do DNA vaccines induce autoimmune disease?; *Hum.Gene Ther.* (8) 293 - 300
- Murabe, Y., Iyata, Y., and Sano, Y. (1981) Morphological studies on neuroglia. III. Macrophage response and "microgliocytosis" in kainic acid-induced lesions; *Cell Tissue Res.* (218) 75 - 86
- Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T. L. (2000) Signaling and transcription in T helper development; *Annu.Rev.Immunol.* (18) 451 - 494
- Nakaichi, M., Takeuchi, A., Sasaki, N., Shitara, N., and Takakura, K. (1996) Antitumor activity of natural-type human tumor necrosis factor on experimental brain tumors in rats; *J.Vet.Med.Sci.* (58) 885 - 891
- Nakajima, K. and Kohsaka, S. (1993) Functional roles of microglia in the brain; *Neurosci.Res.* (17) 187 - 203
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, R., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression; *J.Biomol.Tech.* (14) 33 - 43
- Pasinetti, G. M., Johnson, S. A., Rozovsky, I., Lampert-Etchells, M., Morgan, D. G., Gordon, M. N., Morgan, T. E., Willoughby, D., and Finch, C. E. (1992) Complement C1qB and C4 mRNAs responses to lesioning in rat brain; *Exp.Neurol.* (118) 117 - 125
- Pedras-Vasconcelos, J. A., Goucher, D., Puig, M., Tonelli, L. H., Wang, V., Ito, S., and Verthelyi, D. (2006) CpG oligodeoxynucleotides protect newborn mice from a lethal challenge with the neurotropic Tacaribe arenavirus; *J.Immunol.* (176) 4940 - 4949
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., and Aderem, A. (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (102) 9577 - 9582
- Rupprecht, T. A., Angele, B., Klein, M., Heesemann, J., Pfister, H. W., Botto, M., and Koedel, U. (2007) Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system; *J.Immunol.* (178) 1861 - 1869
- Rutka, J. T., Murakami, M., Dirks, P. B., Hubbard, S. L., Becker, L. E., Fukuyama, K., Jung, S., Tsugu, A., and Matsuzawa, K. (1997) Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review; *J.Neurosurg.* (87) 420 - 430
- Sako, K., Okuma, Y., Hosoi, T., and Nomura, Y. (2005) STAT3 activation and c-FOS expression in the brain following peripheral administration of bacterial DNA; *J.Neuroimmunol.* (158): 40 - 49

- Sartor, C. I., Dziubinski, M. L., Yu, C. L., Jove, R., and Ethier, S. P. (1997) Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells; *Cancer Res.* (57) 978 - 987
- Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., and Marunouchi, T. (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture; *Brain Res.* (491) 394 - 397
- Sawada, M., Suzumura, A., Yamamoto, H., and Marunouchi, T. (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C; *Brain Res.* (509) 119 - 124
- Schafer, M. K., Schwaeble, W. J., Post, C., Salvati, P., Calabresi, M., Sim, R. B., Petry, F., Loos, M., and Weihe, E. (2000) Complement C1q is dramatically up-regulated in brain microglia in response to transient global cerebral ischemia; *J.Immunol.* (164) 5446 - 5452
- Segal, B. M., Klinman, D. M., and Shevach, E. M. (1997) Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway; *J.Immunol.* (158) 5087 - 5090
- Sethi, S., Ebner, S., Hinske, C., and Kretzschmar, H. (2005) Multiple administrations of oligodeoxynucleotides containing CpG motifs influence Ig isotype production; *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* (27) 447 - 460
- Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H., and Kretzschmar, H. (2002) Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity; *Lancet* (360) 229 - 230
- Sfondrini, L., Besusso, D., Rumio, C., Rodolfo, M., Menard, S., and Balsari, A. (2002) Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in HER-2/neu transgenic mice by foreign DNA; *FASEB J.* (16) 1749 - 1754
- Sonobe, Y., Yawata, I., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2005) Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations; *Brain Res.* (1040) 202 - 207
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K., and Wagner, H. (1997) Bacterial DNA causes septic shock; *Nature* (386) 336 - 337
- Spinner, D. S., Kasczak, R. B., Lafauci, G., Meeker, H. C., Ye, X., Flory, M. J., Kim, J. I., Schuller-Levis, G. B., Levis, W. R., Wisniewski, T., Carp, R. I., and Kasczak, R. J. (2007) CpG oligodeoxynucleotide-enhanced humoral immune response and production of antibodies to prion protein PrP^{Sc} in mice immunized with 139A scrapie-associated fibrils; *J.Leukoc.Biol.* (81) 1374 - 1385
- Streit, W. J., Graeber, M. B., and Kreutzberg, G. W. (1988) Functional plasticity of microglia: a review; *Glia* (1) 301 - 307
- Takeshita, F., Gursel, I., Ishii, K. J., Suzuki, K., Gursel, M., and Klinman, D. M. (2004) Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9; *Semin.Immunol.* (16) 17 - 22

- Takeshita, S., Takeshita, F., Haddad, D. E., Janabi, N., and Klinman, D. M. (2001) Activation of microglia and astrocytes by CpG oligodeoxynucleotides; *Neuroreport* (12) 3029 - 3032
- Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., and . (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity; *J.Natl.Cancer Inst.* (72) 955 - 962
- Trinchieri, G. (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity; *Annu.Rev.Immunol.* (13) 251 - 276
- Watson, C. J. and Miller, W. R. (1995) Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts; *Br.J.Cancer* (71) 840 - 844
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., and Williams, P. M. (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro; *Anal.Biochem.* (270) 41 - 49
- Wittwer, C. T., Fillmore, G. C., and Garling, D. J. (1990) Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples; *Anal.Biochem.* (186) 328 - 331
- Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S., and Tokunaga, T. (1988) In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG; *Jpn.J.Cancer Res.* (79) 866 - 873
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., and Tokunaga, T. (1992a) Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of IFN] and augment IFN-mediated [correction of IFN] natural killer activity; *J.Immunol.* (148) 4072 - 4076
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Shimada, S., Kuramoto, E., Yano, O., Kataoka, T., and Tokunaga, T. (1992b) DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth; *Microbiol.Immunol.* (36) 983 - 997
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein; *Science* (308) 1626 - 1629
- Yeo, S. J., Yoon, J. G., Hong, S. C., and Yi, A. K. (2003) CpG DNA induces self and cross-hyporesponsiveness of RAW264.7 cells in response to CpG DNA and lipopolysaccharide: alterations in IL-1 receptor-associated kinase expression; *J.Immunol.* (170) 1052 - 1061

Andere verwendete Quellen:

Internet:

www.wikipedia.de

www.biocarta.com

www.sigma.com

www.dakogmbh.de

Teile dieser Doktorarbeit sind zur Publikation angenommen und im Journal Immunopharmacology and Immunotoxicology 2007; 29 (3-4): 413-24 erschienen.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Zytokinnetzwerk	11
Abbildung 2: Die Komplementaktivierungskaskade	18
Abbildung 3: Die TNF Signalkaskade	21
Abbildung 4: Das Interferonsystem	22
Abbildung 5: NO-2 abhängige IL-12 Signalkaskade in Natürlichen Killerzellen	23
Abbildung 6: Die STAT3 Signalkaskade	25
Abbildung 7: Multiple Applikation von CpG Oligodeoxynukleotiden	28
Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Lightcyclers	35
Abbildung 9: Phasen der PCR-Produktakkumulation	36
Abbildung 10: Real Time PCR	41
Abbildung 11: Prinzip der ABC-Methode	44
Abbildung 12: HE-Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Gehirnschnitte	47
Abbildung 13: CD 11b Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Gehirnschnitte	48
Abbildung 14: GFAP-Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Gehirnschnitte	49
Abbildung 15: ZNS-assozierte TNF alpha mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN	51
Abbildung 16: ZNS-assozierte C1q mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN	52
Abbildung 17: ZNS-assozierte IFN γ mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN	53
Abbildung 18: ZNS-assozierte IL-12p40 mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN	54
Abbildung 19: HE-Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte	56
Abbildung 20: CD 11b Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte	57
Abbildung 21: CD 8 Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte	58
Abbildung 22: B220 Färbung der CpG-ODN, NaCl oder Neg-ODN behandelten Leberschnitte	59
Abbildung 23: Leber-assozierte IL-12p40 mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN	60

Abbildung 24: Leber-assoziierte TNF alpha mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN.....	62
Abbildung 25: Leber-assoziierte C1q mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN.....	63
Abbildung 26: Leber-assoziierte IFN γ mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN.....	65
Abbildung 27: Leber-assoziierte STAT3 mRNA Werte nach mehrmaliger Applikation von CpG-ODN.....	66

10 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Complementfactor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy DNA
Cl ⁻	Chlorid
c-myc	Myelocytomatosis Cellular Oncogene
CO ₂	Kohlendioxid
Cp	Crossing Point
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CR	Complement-Receptor
CRH	Cortikotropin-Releasing-Hormon
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony-Stimulating-Factor
Ct	Threshold Cycle
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritic Cell
DD	Death Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	3`-desoxy-Ribonukleosid-5`triphosphat
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
E.coli	Escherichia coli

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
G-Phase	Gap-Phase
g	Gramm
g	Konstante für die Schwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Acides Gliafaserprotein
h	Hora (Stunde)
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
INH	Inhibitor
i.p.	intraperitoneal
JAK	Januskinase
K ⁺	Kalium
kDA	Kilo-Dalton
konz.	konzentriert
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphotoxin
M	molar
MAC	Membranangriffskomplex
MBL	Mannose-bindendes-Lektin
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
μ	My (Mikro)
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
Neg	Negativ
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NGF	Nerve-Growth-Factor
NK	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodeoxynukleotid
OX	Oxidation
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P DGFR	Platelet-derived growth factor receptor
pH	Potential Hydrogenium
PTP	Tyrosin Phosphatase
q PCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	ohne reverse Transkriptase
sek	Sekunde
Ser	Serin
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
S-Phase	Synthese-Phase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Th	T-Helfer Zelle
TLR	Toll-like-Receptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trail	TNF-related apoptosis inducing ligand
x (5/7/21x)	mal
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

11 Danksagung

Herrn Professor Dr. Hans Kretzschmar danke ich ganz herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas und die exzellente Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Shneh Sethi danke ich für die äußerst nette Betreuung und die wertvolle Hilfe beim Zustandekommen dieses Werks.

Weiterhin danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Schmahl für sein Engagement als Doktorvater und sein Interesse an diesem Thema.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Wei Xiang und Herrn Dr. Armin Giese für die stets prompte Hilfe und den kompetenten Rat bei Problemstellungen.

Ebenfalls sehr dankbar bin ich Frau Ramona Heptner, Herrn Michael Schmidt und Frau Angelika Henn, die mir stets mit großer Geduld beim Erlernen der verwendeten Methoden zur Seite standen und das stets offene Ohr bei meinen Fragen. Ein herzliches Dankeschön an das Tierstallteam, speziell an Dr. Gerda Mitteregger und Dr. Claudia Pace für die stets sehr nette Zusammenarbeit. Besonders dankbar bin ich auch Herrn Jens Wagner, Herrn Christian Hinske, Frau Sabine Ebner und Frau Julia Strangmann für das nette, kollegiale Klima in der Arbeitsgruppe. Außerdem Frau Dorothee Rieger und Herrn Benedikt Bader, neuerdings auch Herrn Dr. Ulrich Schüller für die stets amüsanten Mittagspausen und Frau Steffi Ochs geb. Walter für unser lustiges Duo.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Cindy Echt und Herrn Diether Moskanke für so manch vergnügliche Stunde, außerdem allen Mitwirkenden des „Grippenspiels“ und den wackeren, unerschrocken Mitläuferinnen beim Oberland Firmenlauf.

Auch an alle anderen Mitarbeiter des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung ein herzliches Dankeschön für die schöne, kollegiale Arbeitsatmosphäre, wo trotz intensiver Arbeit der Spaß nie auf der Strecke blieb.

Mein größter Dank gilt meiner Mama und Richard für die finanzielle Unterstützung während des Studiums und ihr liebevoller Einsatz für mich, sowie meinem Freund Tom für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts und einfach, dass es ihn gibt.