

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Bedeutung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Lokalisation
für CpG-vermittelte Immunstimulation
bei humanen B-Zellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von
Miriam Mende
aus Lübeck

Lübeck 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2004 bis November 2006 am Institut für Molekulare Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck unter der Betreuung von Prof. Dr. Georg Sczakiel angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Georg Sczakiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Horst Stürzbecher

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich diese Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich nicht vorher oder anderenorts einen Zulassungsantrag gestellt, oder diese Dissertation vorgelegt habe und dass ich mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

Lübeck den 22.11.2006



Those Who
Hear Not
The Music

Think The
Dancers
Mad.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Immunstimulatorisch wirksame Oligonukleotide	4
1.2 Chemische Modifikationen	6
1.3 Verschiedene Klassen immunstimulatorisch wirksamer ODN	8
1.4 Geschichte	10
1.5 Therapeutischer Einsatz von CpG-ODN	12
1.6 Effekte von CpG-ODN auf zellulärer Ebene	15
1.7 Molekulare Wirkmechanismen von CpG-ODN	20
1.8 Bedeutung der Aufnahme für Immunstimulation durch CpG-ODN	23
1.9 Zielsetzung der Arbeit	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien	30
2.1.4.1 Zellkultur-Medien und Zusätze	31
2.1.5 DNA-Größenstandards	31
2.1.6 Kits	32
2.1.7 Zelllinien und primäre Zellen	32
2.1.8 Antikörper	32
2.1.9 Oligonukleotide	33

2.2	Methoden	35
2.2.1	Analyse und Manipulation von Nukleinsäuren	35
2.2.1.1	Spektralphotometrie	35
2.2.1.1.1	Konzentrationsbestimmung im Photometer	35
2.2.1.1.2	Konzentrationsbestimmung im Nanodrop [®]	36
2.2.1.2	Gelelektrophorese	36
2.2.1.2.1	Analytische, denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.1.2.2	Analytische, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.2.1.2.3	Analytische, native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.2.1.3	Radioaktive Markierung von ODN zur Generierung einer Sonde	38
2.2.2	Zellkulturmethoden	39
2.2.2.1	Auftauen der Zellen	39
2.2.2.2	Kultivierung der Nierenfibroblasten-Zelllinie BHK-21	39
2.2.2.3	Kultivierung der Burkitt-Lymphoma-Zelllinie BJA-B	40
2.2.2.4	Kryokonservierung von Zellen	41
2.2.2.5	Präparation der PBMCs aus <i>buffy coats</i> und Kultivierung	41
2.2.2.6	Bestimmung der Lebendzellzahl mit Tryphanblau	42
2.2.3	Manipulation von Zellen mit Oligonukleotiden	42
2.2.3.1	Inkubation der Zellen mit Oligonukleotiden	42
2.2.3.2	Kultivierung der Zellen für Mikroinjektion	43
2.2.3.3	Mikroinjektion	43
2.2.3.4	Elektroporation	44
2.2.4	Proliferationsassay (Inkubation der Zellen mit CFSE)	45
2.2.5	Präparation der Zellen für die Messung im Durchflusscytometer	46
2.2.6	Durchflusscytometrie (FACS)	46
2.2.7	Bestimmung der IFN-alpha-Sekretion von pDCs	49
2.2.8	Manipulation der Zellen für Fluoreszenzmikroskopie	49
2.2.9	Herstellung von Präparaten für Fluoreszenzmikroskopie	50
2.2.10	Fluoreszenzmikroskopie	50
2.2.11	Quantifizierung von ODN in Zelllysaten mittels radioaktiver Hybridisierung	53

3	Ergebnisse	55
3.1	Untersuchung der Sequenz TM6₄ auf verbesserte Aufnahme in BJA-B	56
3.2	Untersuchung des Sequenzmotivs TM6₄ auf immunstimulatorische Potenz	57
3.3	Charakterisierung der immunstimulatorischen Potenz von TM6₄	60
3.3.1	Charakterisierung des Effektes von TM6 ₄ in der Zelllinie BJA-B	61
3.3.2	Charakterisierung des Effektes von TM6 ₄ in humanen PBMCs	63
3.3.3	Charakterisierung des Effektes von TM6 ₄ in humanen pDCs	69
3.4	Charakterisierung der zellulären Aufnahme von TM6₄	71
3.5	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen immunstimulatorischer Potenz und Aufnahme	75
3.5.1	Konzentrations- und zeitabhängige Korrelation von Aufnahme und Effekt	75
3.5.2	Korrelation von Aufnahme und Effekt bei Nukleaseschutz	81
3.5.3	Einfluss des Sequenzmotives TM6 ₄ auf die ODN-Aufnahme	84
3.5.4	Zwischenfazit zur Bedeutung der zellulären Aufnahme von ODN für CpG-vermittelte Immunstimulation	91
3.6	Abhängigkeit des Effektes von der intrazellulären Lokalisation des ODN	92
3.6.1	Untersuchung des Effektes nach cytoplasmatischer Applikation von ODN	94
3.6.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation	101
3.6.2.1	Intrazelluläre Lokalisation von ODN in Bezug auf lysosomale Kompartimente	102
3.6.2.2	Intrazelluläre Lokalisation von ODN in Bezug auf den TLR9-Rezeptor	107
3.6.3	Zwischenfazit zur Bedeutung der intrazellulären Lokalisation von ODN für CpG-vermittelte Immunstimulation	113
4	Diskussion	114
4.1	Immunstimulatorische Potenz des „Aufnahme-Motivs“ TM6 ₄	114
4.2	Bedeutung der zellulären Aufnahme für CpG-vermittelte Immunstimulation	118
4.3	Bedeutung der intrazellulären Lokalisation für CpG-vermittelte Immunstimulation	122
4.4	Ausblick	125
5	Zusammenfassung	126

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	IV
---------------------------	----

Literaturverzeichnis	128
-----------------------------	-----

Publikationen	138
----------------------	-----

Lebenslauf	139
-------------------	-----

Danksagung	140
-------------------	-----

Zitate	141
---------------	-----

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ad	ergänzt auf
AK	Antikörper
amol	attomol (entspricht 10^{-18} Molen)
APC	“ <i>antigen presenting cells</i> ”
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
b	Basen
BSA	Rinder-Serumalbumin (engl: <i>bovine serum albumine</i>)
BPB	Bromphenolblau
°C	Grad Celsius
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotid
cpm	“ <i>counts per minute</i> “
DCs	“ <i>dendritic cells</i> ”
dest.	destillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	“ <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> ”
FACS	Durchflußcytometer
FKS	Fötales Kälberserum
fmol	femtomol (entspricht 10^{-15} Molen)
g	Gramm
HCl	Salzsäure
hPa	Hektopascal

H ₂ O	Wasser
IFN	Interferon
κ	Kappa
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
M	Molarität
m-RNA	<i>messenger-RNA</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
μci	Mikrocurie
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Na	Natrium
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxyribonukleotide (kurzkettige, einzelsträngige DNA)
³² P	Phosphor-Isotop mit der Massenzahl 32
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	<i>“peripheral blood mononuclear cells“</i>
pDCs	<i>“plasmacytoid dendritic cells“</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
pmol	picomol (entspricht 10 ⁻¹² Molen)
PTO	Phosphorothioat

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	“ <i>rotations per minute</i> ”
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium (engl: <i>Sodium</i>) Dodecyl Sulfat
sec	Sekunde
si-RNA	<i>small interfering</i> -RNA
Std.	Stunde
TAE	Tris-Acetat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen (engl: <i>weight/volume</i>)
x g	Gravitationsbeschleunigung an der Erdoberfläche
zmol	zeptomol (entspricht 10^{-21} Molen)
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Immunstimulatorisch wirksame Oligonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide (ODN) sind kurzkettige, einzelsträngige DNA-Moleküle, die aus mehreren Nukleotiden bestehen, welche über Phosphatbrücken über eine 3'-5'-Bindung miteinander verbunden sind. Bei den Phosphatbrücken handelt es sich bei natürlich vorkommender DNA um Phosphodiesterbrücken; diese können aber bei synthetisch hergestellten ODN durch Phosphorothioatbrücken ersetzt werden, um die Stabilität der ODN durch den Schutz vor Nukleasen zu verbessern.

Einige Oligodesoxyribonukleotide sind in der Lage bei Säugetieren eine Immunantwort auszulösen. Diese immunstimulatorische Wirkung beruht auf der Anwesenheit von unmethylierten CpG-Dinukleotiden (Abfolge eines Cytidin-Guanosin, die über eine Phosphatbindung verknüpft sind) in einem bestimmten Kontext flankierender Basen in der Sequenz, bezeichnet als CpG-Motiv. Ursächlich für die immunstimulatorische Potenz synthetischer ODN ist die Nachahmung bakterieller DNA. In Vertebraten ist das Vorkommen von CpG-Motiven auf 23% der statistischen Häufigkeit von 1 zu 16 einer zufälligen (engl: *random*) Sequenz stark supprimiert (Ramsahoye *et al.*, 1996).

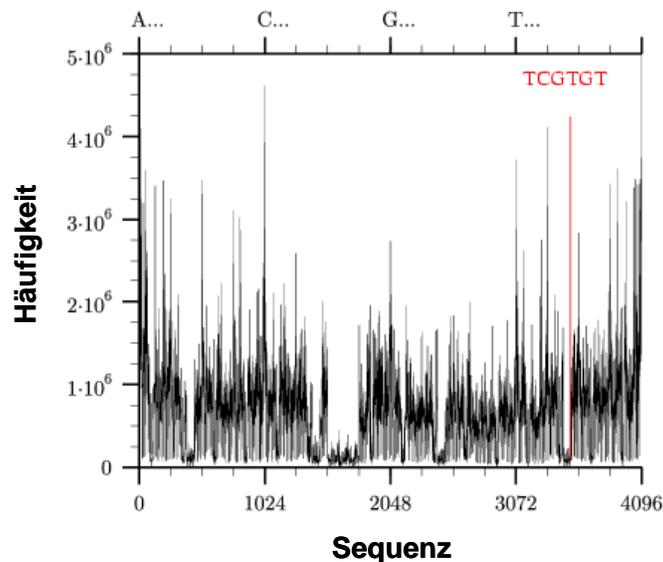


Abb. 1.1 Verteilungsmuster von Hexamersequenzen im humanen Genom

Auf der x-Achse ist die Sequenz der 4096 möglichen Hexamere aufgetragen von AAAAAA bis TTTTTT, auf der y-Achse die Häufigkeit des Auftretens der jeweiligen Sequenzen im humanen Genom. CpG-haltige Sequenzen sind deutlich supprimiert wie an den Einbrüchen in der Häufigkeitsverteilung zu erkennen. Das Hexamer TCGTGT ist rot hervorgehoben.

Zusätzlich ist im Vertebraten-Genom das Cytosin in CpG-Motiven zu 70-80% methyliert (Bird, 2002). Methylierung reduziert die Wirkung von CpG-haltigen ODN (Krieg et al., 1995; Sparwasser et al., 1997), und eine Behandlung bakterieller DNA mit CpG-Methylase macht diese immunstimulatorisch unwirksam (Krieg *et al.*, 1995; Stacey et al., 1996). Trotz dieser signifikanten Unterschiede kann die Unwirksamkeit von Vertebraten-DNA gegenüber bakterieller DNA nicht allein durch die Suppression aktiver Sequenzen erklärt werden. So steht beispielsweise einer Suppression aktiver Oktamer-Sequenzen im Mausgenom auf 13,6%, was einem Faktor 7 entspricht, ein Faktor 23 an unterschiedlicher Wirksamkeit zwischen demethylierter Maus-DNA und *E.coli*-DNA gegenüber (Stacey *et al.*, 2003).

Es ist weiterhin möglich, dass diese Diskrepanz ursächlich auf ein unvollständiges Verständnis über die Notwendigkeit eines bestimmten Basenkontextes aktiver CpG-Dinukleotide zurückzuführen ist. So entsprechen auch die flankierenden Basen von CpG-Dinukleotiden im Vertebraten-genom nicht einer *random*-Verteilung. Die am häufigsten einem CpG-Dinukleotid vorangehende Base ist ein Cytosin und die häufigste nachstehende Base ein Guanin, was der Beobachtung entspricht, dass ODN mit CpG-Dinukleotiden in diesem Basenkontext wenig immunstimulatorisch aktiv sind (Krieg, 2002). In diesem Zusammenhang ist auch die Existenz inhibitorischer ODN bekannt. Da auch Vertebraten-DNA unmethylierte CpG-Motive enthält, sollte man annehmen, dass auch eine Inkubation mit Vertebraten-DNA in entsprechend hohen Konzentrationen immunstimulatorisch wirksam ist. So kann genomische DNA, die von sterbenden Zellen freigesetzt wird, die Reifung Antigen-präsentierender Zellen induzieren (Ishii *et al.*, 2004). Bekannt ist außerdem, dass Inhibitoren der DNA-Methylierung *systemischen lupus erythematoses* (SLE), eine Autoimmunerkrankung, induzieren können (Richardson, 2003). Es stellte sich die Frage, ob diese Wirksamkeit genomischer DNA auf die wenigen enthaltenen CpG-Motive oder auf non-CpG-Sequenzen zurückzuführen ist, die unter diesen Bedingungen wirksam werden. Sie wurde beantwortet durch die Beobachtung, dass eine verstärkte Aufnahme von non-CpG-ODN durch Komplexierung an DOTAP zu immunstimulatorischen Effekten in murinen DCs führte. Außerdem konnte in Ligand-Bindungsstudien bei hohen Konzentrationen von non-CpG-ODN (2x-3,5x Überschuss) Bindung an den für CpG-vermittelte Immunstimulation verantwortlichen Rezeptor (TLR9) nachgewiesen werden (Yasuda *et al.*, 2006).

Unter normalen Umständen bleibt jedoch Vertebraten-DNA auch in hohen Konzentrationen unwirksam; im Gegenteil: eine Koinkubation von bakterieller DNA mit gleicher Menge Vertebraten-DNA führt zu einer Aufhebung der Wirksamkeit der bakteriellen DNA, was auf die Anwesenheit inhibitorischer Sequenzen hinweist (Chen *et al.*, 2001b). Als verantwortlich für diese inhibitorischen Effekte zeigten sich CpG-Dinukleotide, die im Basenkontext eines vorangehenden Cytosins und eines nachfolgenden Guanins standen. Als hemmende Sequenzen wirken außerdem Phosphorothioat-ODN mit 2 bis 3 Guanin-Substitutionen innerhalb des zentralen CpG-Sequenzmotivs (Lenert *et al.*, 2001). Diese neutralisierenden Motive wirken als spezifische Antagonisten der stimulatorischen Effekte von wirksamen CpG-Motiven (Krieg *et al.*, 1998). Es wurde zunächst beschrieben, dass in Vertebraten adenovirale DNA-Sequenzelemente als inhibitorische Sequenzen die immunstimulatorischen Effekte unmethylierter CpG-Motive ausgleichen können (Krieg *et al.*, 1998). Auch für synthetische Oligonukleotide mit inhibitorischen Sequenzmotiven wurde gezeigt, dass sie CpG-DNA-induzierte Effekte blockieren können (Krieg *et al.*, 1998; Stunz *et al.*, 2002). Über den Wirkmechanismus dieser Sequenzen bestehen hingegen unterschiedliche Ansichten. Eine Konkurrenz der inhibitorischen Sequenzen mit den wirksamen Sequenzen um die zelluläre Aufnahme konnte als Ursache für die inhibitorische Wirkung ausgeschlossen werden (Stunz *et al.*, 2002), wurde jedoch in einer anderen Arbeit als ursächlich für den Effekt beschrieben (Stacey *et al.*, 2003).

1.2 Chemische Modifikationen

Die allgemeinen Wirkungen, die mit CpG-ODN erzielt werden können, sind im vorangehenden Teil beschrieben worden. Wie bereits erwähnt, werden zur Gewährleistung einer verbesserten Nukleasestabilität neben Phosphodiester PO-ODN auch Phosphorothioat-PS-ODN, die CpG-Motive in ihrer Sequenz enthalten, eingesetzt.

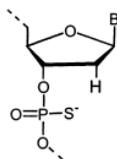


Abb. 1.2 Darstellung der Phosphorothioat-Modifikation von Desoxyribonukleinsäuren

ODN mit einem PO-Rückrat werden schnell innerhalb von Lymphocyten degradiert (Zhao *et al.*, 1993). Für Phosphorothioat-Modifikationen wurde gezeigt, dass sie ein bevorzugtes Profil für die Entwicklung von Therapeutika besitzen in Hinsicht auf Nukleasestabilität, pharmakokinetische Verteilung und zelluläre Aufnahme. So wurden PS-ODN weitaus effizienter aufgenommen als die entsprechenden PO-ODN (Zhao *et al.*, 1993; Tamsamani *et al.*, 1994). PS-Modifikationen führen, verglichen mit PO-ODN, aber auch zu einem erhöhten Maß an Proteinbindung, welches viele unspezifische und auch toxikologische Effekte dieser ODN-Klasse verursacht. *In vitro* bewirken PS-ODN die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Sp1*, Inhibition von Zellproliferation und Zellmigration, Störungen der Bindung von Zelloberflächenrezeptoren und die Induktion von Veränderungen in der Zellmorphologie (Perez *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Rockwell *et al.*, 1997; Anselmet *et al.*, 2002). In klinischen Studien führte dies zu Müdigkeit, Fieber, Hautausschlägen, Thrombocytopenien, Leukopenien und der Aktivierung des Komplement-Systems (Yuen *and* Sikic, 2000). Für therapeutische Applikationen werden CpG-ODN jedoch typischerweise mit wenigstens teilweise PS-modifiziertem Rückrat eingesetzt, um eine verbesserte Nukleaseresistenz und damit eine gesteigerte Halbwertszeit zu gewährleisten (Krieg, 2006).

In Hinsicht auf die immunstimulatorische Aktivität haben PS-ODN neben dem durch das Phosphorothioatrückrat vermittelten Schutz vor Nukleasen und Degradation außerdem ein intrinsisches immunstimulatorisches Potential, das auf die chemische Modifikation zurückzuführen und unabhängig von der Anwesenheit von CpG-Motiven ist. So ist beschrieben, dass Phosphorothioat-Modifikation unabhängig von der Sequenz einen nicht CpG-spezifischen Effekt auf B-Zell-Proliferation und insgesamt auf humane PBMCs haben kann (Hartmann *et al.*, 1996). Es sind für die Auswirkungen des PS-Rückrats unterschiedliche Effekte bekannt. So ist z.B. im murinen System eine Wirkungssteigerung von CpG-Motiven durch den Austausch des PO-Rückrats gegen ein PS-Rückrat beschrieben worden (Zhao *et al.*, 1996b). Auch beim Menschen wurde eine erhöhte B-Zell-Proliferation beschrieben durch PS-modifizierte ODN (Liang *et al.*, 1996). Außerdem reduzierte eine PS-Modifikation drastisch (10 bis 100-fach) die für die Auslösung eines maximalen immunstimulatorischen Effektes benötigte ODN-Konzentration (Sester *et al.*, 2000; Hartmann *and* Krieg, 2000a). PS-Modifikation führte jedoch auch zur Aufhebung des Effektes, wenn bei einem wirksamen PD-ODN mit nur einem CpG-Motiv eine PS-Modifikation eingeführt wurde (Hartmann *et al.*, 2000a).

1.3 Verschiedene Klassen immunstimulatorisch wirksamer ODN

Wie bereits oben beschrieben, können ODN mit verschiedenen Rückratmodifikationen und verschiedenen Sequenzmotiven dramatische Unterschiede in den Profilen und Kinetiken des durch sie verursachten, immunstimulatorischen Effektes aufweisen.

Bei immunstimulatorisch wirksamen ODN unterscheidet man drei verschiedene Klassen, die jeweils zu einer unterschiedlichen Immunantwort führen. Gemeinsam für alle Klassen ist jedoch die Auslösung einer Immunantwort über TLR9-abhängiges *signalling* (Vollmer *et al.*, 2004).

ODN der Klasse A, auch als D-ODN bezeichnet, sind charakterisiert durch *poly-G*-Enden mit PS-Modifikation an den 5'- und 3'-Enden. Außerdem besitzen sie eine unmodifizierte, CpG-haltige Mittelsequenz, die durch flankierende, selbst-komplementäre Basen in der Lage ist, als palindromische Sequenz einen *stem-loop* auszubilden. Der Prototyp eines Klasse-A-ODN ist ODN 2216 (GGGggacgatcgcGGGGG). Klasse-A-ODN führen zu der höchsten NK-Zell-Aktivierung (IFN- γ -Sekretion) und IFN- α -Sekretion von plasmacytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) (Verthelyi *et al.*, 2001). Der hohe Grad an NK-Zell-Aktivierung und IFN- α -Sekretion wird durch den Nukleaseschutz der 5'- und 3'-PS-Modifizierung erreicht, wobei die NK-Zell-Aktivierung auf das PO-Rückrat dieser Chimere zurückzuführen ist. Die *poly-G*-Motive am 5'- und 3'-Ende der ODN führen zusätzlich durch gesteigerte zelluläre Aufnahme zu einer Verbesserung der Fähigkeit der ODN NK-Zellen zu aktivieren und IFN- α -Sekretion herbeizuführen (Krieg, 2002). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass die *poly-dG-stretches* durch die spontane Ausbildung von nukleinsäurebasierten Nanopartikeln für die hohe IFN- α -Sekretion der pDCs verantwortlich sind (Kerkmann *et al.*, 2005).

CpG-ODN der Klasse B, auch als K-ODN bezeichnet, haben hingegen ein voll modifiziertes PS-Rückrat. Sie besitzen ein oder mehrere CpG-Motive in ihrer Sequenz, jedoch keine *poly-G*-Motive oder Palindrome. Der Prototyp eines Klasse-B-ODN ist ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT) (Hartmann *et al.*, 2000b). Klasse-B-ODN stimulieren stark B-Zell-Aktivierung (Proliferation) und Produktion von Cytokinen (IL-6) und Immunglobulinen (IgM) von B-Zellen und Monocyten (Verthelyi *et al.*, 2001). Während CpG-A-ODN keine B-Zell-Aktivierung auslösen können in Abwesenheit von DCs, sind CpG-B-ODN in der Lage, B-Zellen direkt zu aktivieren (Hartmann *et al.*, 2003; Verthelyi and Zeuner, 2003).

Sie führen jedoch zu geringerer NK-Zell-Stimulation, obwohl sie durch die vollständige PS-Modifikation weitaus nukleaseresistenter sind. Klasse-B-ODN sind außerdem ein sehr potentes Th1-Adjuvant und zeigen anti-Tumor-Aktivität. Auch wenn PS-ODN als eine Klasse ähnliche Wirkungen zeigen, so können die Effekte doch qualitative Unterschiede aufweisen (Krieg, 2002).

Die immunstimulatorische Wirkung von Klasse-A-ODN (D-ODN) und Klasse-B-ODN (K-ODN) ist in Abb. 1.3 dargestellt.

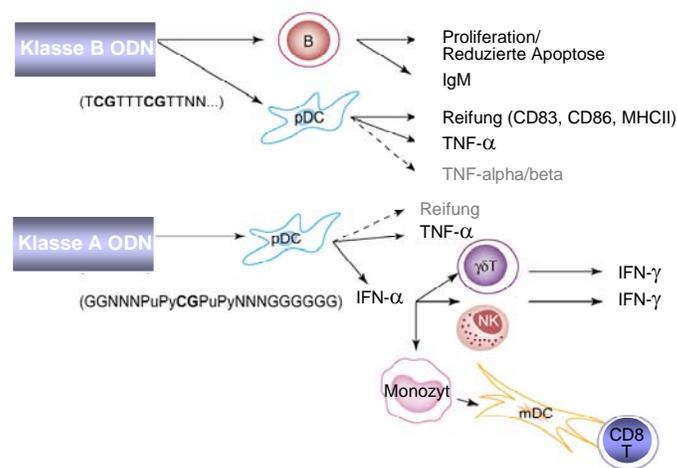


Abb. 1.3 Immunstimulation durch Klasse-A und Klasse-B CpG-ODN (Verthelyi *et al.*, 2003)

Eine dritte Klasse von CpG-ODN kombiniert die Effekte von A- und B-Klasse-ODN. Im Gegensatz zu den Klasse-A-ODN sind Klasse-C-ODN Voll-Phosphorothioate. Sie besitzen keine *poly-G*-Motive, jedoch palindromische Sequenzen kombiniert mit stimulatorisch wirksamen CpG-Motiven: optimal stimulatorischen Hexamer-Motiven (5'-TCGTCGTT-3'). Die CpG-Motive sind über einen *spacer* mit CG-reichen, palindromischen Sequenzen verlinkt (5'-CGGCGCGCGCCG-3'), wobei eine große Reihe an Modifikationen im Palindrom gut toleriert werden. Eine Zerstörung des Palindroms bewirkt jedoch eine Verringerung der IFN- α -Sekretion. Klasse-C-ODN stimulieren stark NK-Zell-Aktivierung und IFN- α -Produktion sowie auch B-Zell-Aktivierung, vergleichbar mit Klasse-B-ODN. *In vivo* Studien zeigten, dass Klasse-C-ODN auch ein sehr potentes Th1-Adjuvant sind (Vollmer *et al.*, 2004). Die drei verschiedenen Klassen an ODN sind vergleichend in Tabelle 1.1 dargestellt.

ODN-Klasse mit Beispielsequenz	Strukturelle Charakteristika	Immunstimulatorische Wirksamkeit
Klasse A CpG ODN		
GGTGCATCGATGCAAGGGGGG	<ul style="list-style-type: none"> • Gemischtes PO- (kursiv)/PS-Rückrat • Einzelnes CpG-Motiv (blau) • CpG-flankierende Regionen formen ein Palindrom (rot) • Poly-G 3'-Ende (grün) 	<ul style="list-style-type: none"> • APC-Reifung vermittelt durch IFN-α • Stimuliert präferentiell pDCs zur Sekretion von IFN-α
Klasse B CpG ODN		
TCCATGGACGTTCCCTGAGCGTT	<ul style="list-style-type: none"> • PS-Rückrat • Multiple CpG-Motive (blau) (5'-Motiv am wirksamsten) 	<ul style="list-style-type: none"> • pDC-Reifung und Produktion von TNF • Stimuliert B-Zellen zu Proliferation und zur Produktion von IgM und IL-6
Klasse C CpG ODN		
TCGTCGTTCGAACGACGTTGAT	<ul style="list-style-type: none"> • PS-Rückrat • Multiple CpG-Motive (blau) • TCG Dimer am 5'-Ende (magenta) • CpG-Motiv eingebettet in ein zentrales Palindrom 	<ul style="list-style-type: none"> • Stimuliert B-Zellen zur Produktion von IgM und IL-6 • Aktiviert pDCs zu Sekretion von IFN-α

Tabelle 1.1 Vergleich verschiedener Klassen immunstimulatorisch wirksamer ODN (Klinman, 2004)

1.4 Geschichte

Erstmals berichtete Prof. Busch aus Bonn im Jahre 1866 von der Beobachtung, dass bei Patienten mit Geschwüren der Haut oder malignen Drüsensarkomen des Halses, sich diese Geschwülste zurückbildeten, wenn der Patient gleichzeitig an dieser Stelle eine infektiöse Entzündung entwickelte (Berliner klinische Wochenschrift, 23.März 1868 S137f). Es gelang ihm denselben Effekt zu erzielen, wenn er an Halsdrüsensarkomen von anderen Patienten künstlich eine Wundentzündung erzeugte. Den Grundstein für die therapeutische Nutzung von CpG-ODN legte der New Yorker Chirurg William Coley 1893, indem er die antitumorale Wirkung von Streptokokken oder hitzeinaktivierte Bakterien, genannt „*Coley's Toxin*“, durch Injektion in die Tumormasse von nicht operablen Sarkomen demonstrierte (Coley, 1991). Tatsächlich ließen sich Erfolge bei mehr als 40% der Patienten erreichen.

Annähernd 100 Jahre nach den ersten Experimenten Coley's fanden Tokunaga *et al.* durch Experimente an Mäusen und Meerschweinchen heraus, dass bakterielle DNA aus Lysaten von Mycobakterien des *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) eine hohe antitumorale Wirkung zu entfalten vermochte (Tokunaga *et al.*, 1984).

Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Vertebraten-DNA nur bakterielle DNA, B-Zellen zu aktivieren vermochte und zu deren Proliferation und gesteigerter Immunglobulin-Sekretion führte (Messina *et al.*, 1991). Auch eine immunstimulatorische Wirkung auf murine Natürliche Killer- (NK-) Zellen, verbunden mit der Induktion von Interferonen (IFN) und Inhibition von Tumor-Wachstum, konnte lediglich durch bakterielle DNA, nicht aber durch die von Vertebraten erzeugt werden (Yamamoto *et al.*, 1992b). Um die für diese Effekte verantwortlichen Sequenzen ausfindig zu machen, wurden daraufhin synthetische, einzelsträngige ODN untersucht, wobei vermutet wurde, dass sogenannte Palindrome in den Sequenzen die Effekte hervorrufen (Yamamoto *et al.*, 1992a). Diese Theorie konnte doch bald von A.M. Krieg, der die Wirkung sogenannter *Antisense*-ODN auf B-Zellen untersuchte, widerlegt werden. Er konnte zeigen, dass einige der Kontroll-ODN, die keine Palindrome in ihrer Sequenz enthielten, ebenfalls B-Zellen aktivierten.

Letztlich konnten unmethylierte CpG-Dinukleotide als die für die immunstimulatorischen Effekte verantwortlichen Sequenzelemente identifiziert werden. Krieg zeigte 1995 im Maus-Modell, dass synthetische Oligonukleotide, die unmethylierte CpG-Motive enthalten, murine B-Zellen zur Proliferation und zur Sekretion von Immunglobulinen anregten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch der Kontext von bestimmten Basen notwendig war, um Immunstimulation auszulösen. Die optimale B-Zell-Aktivierung wurde mit einem speziellen CpG-Motiv, bei dem ein unmethyliertes CpG-Dinukleotid von zwei 5'-Purinen und zwei 3'-Pyrimidinen flankiert wird, erreicht (Krieg *et al.*, 1995). Das optimale CpG-Motiv zur Aktivierung von murinen Immunzellen wurde mit der Sequenz GACGTT gefunden (Krieg *et al.*, 1995). Für die Aktivierung humaner Immunzellen ist das beste Sequenzmotiv GTCGTT beschrieben worden (Hartmann *et al.*, 2000a;Krieg, 2002); jedoch konnte durch Bindung an die Oberfläche kationischer Mikropartikel auch das Sequenzmotiv TCGXX als das Minimalmotiv für potente IFN-Produktion in humanen Zellen identifiziert werden (Fearon *et al.*, 2003).

Es wurde außerdem beschrieben, dass immunstimulatorische Sequenzen, die ein CpG-Motiv enthalten, einen minimalen Längenanspruch haben, um in der Lage zu sein, einen

immunstimulatorischen Effekt hervorzurufen. Die meisten ODN mit signifikanter immunstimulatorischer Aktivität im murinen System sind zwischen 15 und 25 Nukleotide lang, während kürzere Sequenzen keine Aktivität zeigen (Yamamoto *et al.*, 1994). In humanen PBMCs ist eine Länge von mindestens 12 Nukleotiden notwendig, um eine Immunantwort, wie B-Zell-Proliferation oder Sekretion von IL-6 und IgM, auszulösen, während für die Induktion von IFN- α ein Längenanspruch von 14 bis 16 Nukleotiden besteht (Yamamoto *et al.*, 2000; Verthelyi *et al.*, 2001).

1.5 Therapeutischer Einsatz von CpG-ODN

CpG-ODN besitzen auch heute noch ein großes Potential als Therapeutika eingesetzt zu werden. Anhand der Lipinsky-Regeln können potentielle Wirkstoffe theoretisch auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht werden (Lipinski *et al.*, 2001). Kriterien hierfür sind unter anderem die Löslichkeit und das Molekulargewicht der Stoffe. Die Eigenschaften, die CpG-ODN als „*Drug-like*“ auszeichnen, sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Drug-like Charakteristika
<ul style="list-style-type: none"> ● Exzellente Wasserlöslichkeit ● Spontane intrazelluläre Aufnahme von bestimmten Immunzellen (inklusive besonders der TLR9-exprimierenden Zellen) ● Relativ einfache Herstellung (Synthese im <i>multi-kilogramm-scale</i>) und chromatographische Aufreinigung ● Vergleichbar gut verstandene Chemie erlaubt diverse Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ● Metabolite haben meistens Bestandteile aus DNA, nicht neuartige, kleine Moleküle ● Eine Anzahl an Rückrat-Modifikationen ist verfügbar zur Modulierung der Stabilität für verschiedene Applikationen ● Applikation möglich durch theoretisch jede Verabreichungsform (auch oral) ● Die benötigte Dosis beträgt 0,1-1% der für <i>Antisense</i>-Applikationen benötigten Menge ● Exzellente Stabilität in wässrigen Lösungen bei einem physiologischen pH-Wert ● Weit entwickelte, hoch analytische Methoden für die Chemie, Herstellung und Kontrolle ● Verfügbarkeit sehr sensitiver Methoden für die Detektion des „kalten“ Stoffes
Non-drug-like Charakteristika
<ul style="list-style-type: none"> ● Mittlere Größe: Molekulargewicht 6.000-8.000 Da (Länge typischerweise zwischen 18-25 Basen) ● Stark geladene Polyanionen ● Phosphorothioat und einige andere Rückrat-Modifikationen sind chiral ● Geringe Stabilität von Purinen in saurer Lösung ● Spaltung durch Nukleasen in Seren oder Zellextrakten (Phosphorothioat-Rückrat ist relativ nukleaseresistent) ● Starke Bindung an Proteine ● Keine gleichmäßige Verteilung auf Organe; höchste Gewebkonzentrationen in Niere, Leber und Milz ● Die Pharmakokinetiken entsprechen nicht den Pharmakodynamiken nach subkutaner Gabe ● Sequenz-unabhängige Effekte, einschließlich konzentrationsabhängiger Aktivierung von Komplement-Proteinen und Verlängerung der Thrombin-Halbwertszeit

Tabelle 1.2 Charakteristika von CpG-Oligodeoxyribonukleotiden (Krieg, 2006)

Die im vorhergehenden Teil ausführlich beschriebenen Effekte von CpG-ODN können für den immuntherapeutischen Einsatz dieser Wirkstoffe in vielfältiger Weise genutzt werden. Es gibt bisher vier hauptsächliche Anwendungsgebiete für CpG-ODN (Klinman, 2004), die in Abb. 1.4 schematisch dargestellt sind und im folgenden kurz anhand von Beispielen erläutert werden sollen.

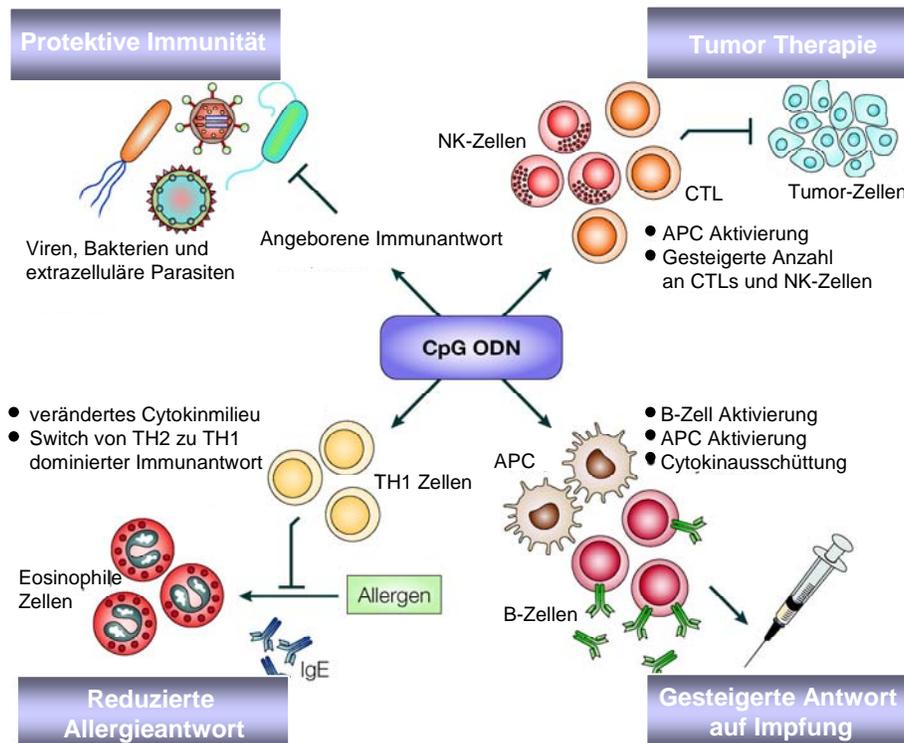


Abb. 1.4 Therapeutischer Einsatz von CpG-ODN (Klinman, 2004)

Die stimulatorische Wirkung auf das angeborene Immunsystem wird genutzt, um den Patienten vor infektiösen Pathogenen zu schützen. Des Weiteren könnten CpG-ODN vorbeugend eingesetzt werden, um die Empfänglichkeit gegenüber Infektionen zu verringern. Beispielsweise geht eine Schwangerschaft einher mit einer generellen Suppression des adaptiven Immunsystems, was zu einer erhöhten Empfänglichkeit der werdenden Mutter gegenüber Infektionen führt. Studien an schwangeren Mäusen zeigten, dass eine Behandlung mit CpG-ODN signifikant den Schutz vor bakteriellen Infektionen erhöhen konnte (Ito *et al.*, 2004).

Beim Einsatz von CpG-ODN in Kombination mit Allergenen lösen CpG-ODN eine antigenspezifische TH1-Immunantwort aus, die die Entwicklung von TH2-Immunantwort-vermitteltem Asthma verhindert. Das therapeutische Potential von CpG-ODN in dieser Hinsicht wurde eingehend im Mausmodell untersucht. Hierbei wurden Mäuse mit verschiedensten Allergenen wie z.B. *Ambrosia* sensibilisiert, und es konnte durch die Behandlung mit CpG-ODN eine deutliche Reduzierung oder sogar Heilung von allergischem Asthma erreicht werden (Sur et al., 1999; Santeliz et al., 2002).

CpG-ODN verbessern weiterhin die Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Sie schaffen außerdem ein Cytokin/Chemokin-Milieu, das zur Entwicklung einer adaptiven Immunantwort führt, die die Wirksamkeit von ko-verabreichten Medikamenten (wie z.B. Impfstoffen) verbessert. So konnte durch die Kopplung von CpG-ODN an Antigene oder die gleichzeitige Verabreichung in Liposomen eine 10 bis 100-fach größere, spezifische IgG-Immunantwort generiert werden als mit dem Antigen allein (Klinman et al., 1999; Gursel et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CpG-ODN auch den Einsatz anderer Medikamente gegen Viren, wie z.B. *Influenza* und *Hepatitis B*, verbessern (Davis et al., 1998; Moldoveanu et al., 1998).

Letztlich führt die von CpG-ODN ausgelöste Immunkaskade noch zu der Aktivierung von natürlichen Killer- (NK-) Zellen und cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs). Dadurch erleichtern CpG-ODN allein oder in Kombination mit anderen Therapien die Behandlung von Tumoren (Klinman, 2004).

Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass auch von erheblichen Schwierigkeiten bei der Applikation von CpG-ODN berichtet wurde. So verursachte im Mausmodell eine wiederholte Applikation von CpG-ODN durch Injektion dramatische Veränderungen in der Morphologie und Funktionalität der Organe des Lymphsystems (Heikenwalder *et al.*, 2004). Viele CpG-ODN wurden jedoch bereits im Tiermodell studiert und befinden sich derzeit schon in humanen klinischen Studien. Eine Auswahl dieser in Entwicklung befindlichen Medikamente ist in Tabelle 1.3 zusammengefasst.

Therapeutische Anwendung	Tiermodelle	Klinische Versuche	Wirkungsmechanismus
Infektionskrankheiten			
Monotherapie	Viele, besonders gegen Viren und intrazelluläre Bakterien	C-Klasse-ODN CPG 10101 ⁸⁵ in Phase II (Coley) für Hepatitis B	Aktivierung des angeborenen Immunsystems, TH1-spezifischer zellulärer, Cytokin- und Chemokin-Immunantwort
Impfstoffe	Viele	B-Klasse-ODN 1018 ISS in Phase III (Dynavax) und CPG 7909 in Phase I (GlaxoSmithKline/Coley und DARPA/NIAID/Coley) für Hepatitis B, Influenza, Anthrax u. andere Indikationen	Steigerung Antigen-spezifischen humoralen und zellulären adaptiven Immunantwort
Tumorthherapie			
Monotherapie	Viele, besonders intratumorale Injektion	B-Klasse-ODN PF-3512676 ¹⁴⁶ in Phase I (Pfizer/Coley)	NK-Zell-vermittelt in B16 IP Melanom Modell T-Zell-vermittelt in den meisten anderen Modellen
Impfstoffe	Viele, einschließlich Peptid- oder Protein-Antigene, Carbohydrat-Konjugate, ganz-Zell-Impfungen und DC-Impfungen	B-Klasse-ODN PF-3512676 in Phase I (Pfizer/Coley und GSK/Coley) mit Malan-Apeptid und mit MAGE rekombinantem Protein	CD4 und/oder CD8 T-Zell-vermittelt
Kombinationstherapie	Verschiedene, einschließlich Chemotherapie, Radiotherapie Chirurgie und Immunotherapie	B-Klasse ODN 1018 ISS mit Rituximab für NHL in Phase I (Dynavax) PF-3512676 mit Taxane/Platin-Chemotherapie für NSCLC in Phase III (Pfizer/Coley) HYB-2055 mit Gemcitabine und Carboplatin für Refraktion solider Tumore, Phase II (Idera)	TLR9-Stimulation steigert ADCC für Kombination mit mAb; Chemotherapie scheint präferentiell die regulatorische T-Zell-Funktion zu reduzieren mit Steigerung der CpG-induzierten antitumor T-Zell-Aktivität
Asthma/Allergie			
Monotherapie	Maus: Asthma, allergische Rhinitis, Konjunktivitis, allergische Aspergillose Meerschwein: RSV Sensibilisierung Affe: Asthma	AVE 7279 in Phase I (Sanofi-Aventis/Coley) AVE 0675 präklinisch (Sanofi-Aventis/Coley) 1018 ISS in Phase II (Dynavax) IMO präklinisch (Novartis/Idera)	Unterdrückung der TH2-Antwort und IgE-Produktion Induktion derIDO-Expression Förderung der anti-inflammatorischen Treg-Zellen und Umkehr der Atemwegs-Umbildung
Impfstoffe	Maus: Asthma, Allergie, Immunotherapie und atopische Dermatitis,	B-Klasse ODN 1018 ISS Proteinkonjugat in Phase III (Dynavax)	Suppression oder Umkehr der TH2-spezifischen allergischen Immunantwort

Tabelle 1.3 In Entwicklung befindliche CpG-ODN-basierte Therapeutika (Krieg, 2006)

1.6 Effekte von CpG-ODN auf zellulärer Ebene

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, die kollektiv den Körper vor parasitären, bakteriellen, fungalen und viralen Infektionen und vor entarteten Tumorzellen schützen. Innerhalb des Immunsystems von Vertebraten unterscheidet man ein humorales von einem zellulären Abwehrsystem.

Zum humoralen System gehören Mediatoren wie Cytokine und das Komplementsystem sowie spezifische Antikörper, die von aktivierten B-Zellen nach Antigenkontakt und klonaler Expansion adaptiv produziert werden. Zum zellulären Teil des Immunsystems rechnet man Granulocyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und Natürliche Killer- (NK-) Zellen sowie die antigenspezifischen B- und T-Lymphocyten.

Die Immunantwort des Menschen beruht auf dem Zusammenwirken einer unspezifischen, angeborenen Komponente und einer antigen-spezifischen, erworbenen (adaptiven) Komponente. Die Hauptaufgabe des angeborenen Immunsystems, bestehend aus Granulocyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und NK-Zellen, ist es, mit Hilfe von relativ unspezifischen *pattern recognition receptors* (PRRs), Pathogene und Gewebszerstörungen schnell zu erkennen. Daraufhin kann es ohne Induktionsphase als „erste Verteidigungslinie“ eine beginnende Infektion sofort bekämpfen. Außerdem ist es seine Aufgabe, durch die Vermittlung eines Gefahrensignals an das adaptive Immunsystem, dessen Aktivierung einzuleiten (Banchereau *et al.*, 2000). Das adaptive Immunsystem besteht aus Effektorzellen (B- und T-Zellen) mit spezifischen Antigenrezeptoren, die durch somatische Rekombination diversifiziert sind. Sie können erst nach einer Anlaufphase und klonaler Expansion aktiv werden. Dann sind sie jedoch in der Lage, eine große Anzahl antigenspezifischer B- und T-Zellklone zu erzeugen und um so spezifischer und effizienter die Pathogene zu bekämpfen. Außerdem wird durch die Produktion von Gedächtniszellen eine wirksame und langanhaltende Immunität gegenüber bestimmten antigentragenden Pathogenen erreicht. Die Regulierung dieses Systems erfolgt durch APCs. DCs sind die einzigen APCs, die eine primäre Immunantwort induzieren können (Banchereau *and* Steinman, 1998). Wie schon teilweise oben beschrieben, hat CpG-DNA verschiedene Wirkungen auf das Immunsystem. Am weitesten erforscht sind die Effekte von CpG-Motiven auf murine und humane Immunzellen, wie in Tabelle 1.4 vergleichend dargestellt.

Spezies	Effekte auf die Immunantwort									
	B-Zell Proliferation	NK-Zell Aktivierung	MHC I, II Expression	B7.1, B7.2 Expression	IL-6	IL-12	IL-18	TNF- α	IFN- γ	IFN α/β
Maus	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Human	+	+	+	+	+			+	+	+

Tabelle 1.4 *In vitro* Aktivität von CpG-ODN im murinen und humanen System (Mutwiri *et al.*, 2003)

Im folgenden sollen kurz die bisher bekannten Effekte auf verschiedene Zellen des humanen Immunsystems erläutert werden. Dabei induzieren CpG-Sequenzen in den verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedliche Reaktionen, schematisch dargestellt in Abbildung 1.5.

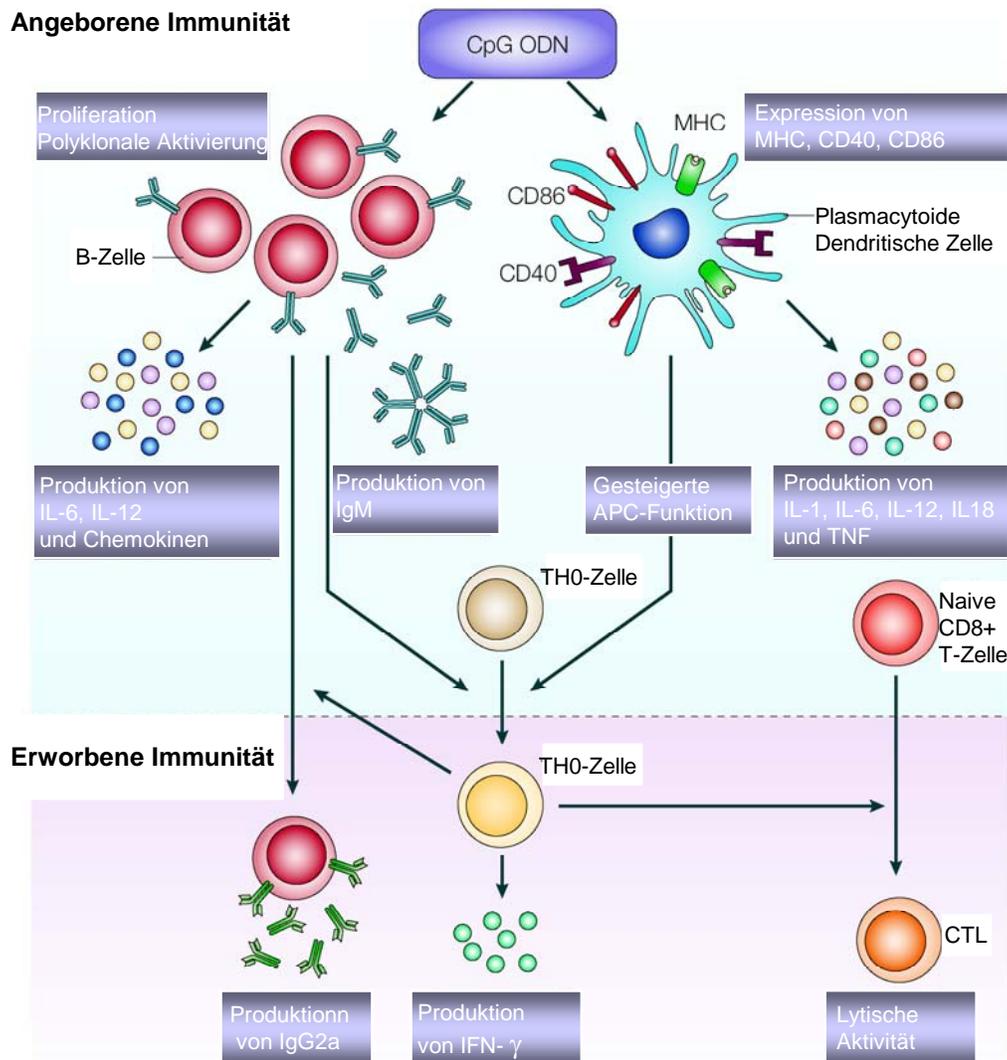


Abb. 1.5 Mechanismen der Förderung der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Klinman, 2004)

CpG-ODN induzieren eine starke Th1-dominierte Immunantwort, die die Sekretion von Cytokinen und Chemokinen einschließt, sowie die Aktivierung von B- und T-Zellen, Monocyten, NK-Zellen und Dendritischen Zellen (Krieg, 2002).

Die Zellpopulationen, die den für die CpG-Erkennung verantwortlichen TLR9-Rezeptor exprimieren, können speziesspezifisch variieren.

In Mäusen exprimieren die myloiden Immunzellen (einschließlich Monocyten, Makrophagen und myloiden DCs) den TLR9-Rezeptor, wogegen im humanen Immunsystem bei diesen Zellen keine oder nur geringe Expression von TLR9 nachgewiesen werden konnte (Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001b; Bauer et al., 2001b; Hornung et al., 2002).

Da eine markante Expression des TLR9-Rezeptors bisher nur in humanen B-Zellen und plasmacytoiden Dendritischen Zellen (pDC) nachgewiesen wurde (Verthelyi *et al.*, 2003), führt dies zu der Annahme, dass die Aktivierung der anderen nicht-TLR9-exprimierenden Immunzellen indirekt durch TLR9-vermittelte Produktion von Cytokinen und Chemokinen hervorgerufen wird (Hornung *et al.*, 2002). Des Weiteren führt eine Aktivierung des *B-cell-receptors* (BCR) zu einer rapiden Induktion der Expression des TLR9-Rezeptors in naiven B-Zellen (Bernasconi *et al.*, 2003).

In B-Zellen führt die Stimulation mit CpG-Motiven zu einer Induktion der Zellproliferation. CpG-DNA veranlasst dabei bis zu 95% der B-Zellen, in den Zellzyklus einzutreten (Krieg *et al.*, 1995). Neben der Proliferation wird die Sekretion von Cytokinen wie IL-10, IL-12 und IL-6 induziert, welche wiederum die Sekretion von Immunglobulinen (IgM) anregt (Yi et al., 1996; Redford et al., 1998). Außerdem findet im murinen System eine Steigerung der Expression von MHCII-, CD80- und CD86-Molekülen auf der Zelloberfläche statt (Krieg *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1998). In einer murinen B-Zell-Lymphoma-Zelllinie konnte zudem gezeigt werden, dass CpG-ODN die Antigenpräsentation durch die Hochregulierung der Expression der antigenpräsentierenden *major histocompatibility* Komplexe MHC-Klasse I und MHC-Klasse II sowie der Oberflächenmoleküle CD40 und CD54 (=ICAM I) verbessern können (Chen *et al.*, 2001a). Außerdem werden B-Zellen durch CpG-DNA vor spontaner und FAS-vermittelter Apoptose geschützt (Macfarlane et al., 1997; Wang et al., 1997; Yi et al., 1998a). Die zunächst für murine B-Zellen beschriebenen Ergebnisse wurden auch für humane B-Zellen bestätigt. Auch im humanen System findet neben der Sekretion von Cytokinen (Wagner *et al.*, 2004) eine Steigerung der Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie MHCII, CD40, CD54, CD80 und CD86, auf der Zelloberfläche sowie eine Induktion der Proliferation von B-Zellen statt (Hartmann *et al.*, 2000a; Jahrsdorfer et al., 2002).

Zusammenfassend ist für den Effekt von CpG-ODN (Klasse-B) auf B-Zellen eine potente, Th1-dominierte Immunantwort beschrieben. So sind CpG-ODN in der Lage, eine Immunantwort von B-Zellen in die Richtung der Produktion von TH1-spezifischen IG-Isotypen (IgG2a, IgG2b und IgG3) umzukehren und TH2-spezifische Isotypen zu unterdrücken (Lin *et al.*, 2004). Auch eine potentielle anti-Tumor-Aktivität auf *precursor*-Zellen akuter, lymphoblastischer Leukämie wurde beschrieben (Reid *et al.*, 2005).

Dendritische Zellen (DCs) sind die Bindeglieder zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Von den unter dem Begriff „Antigen-präsentierende-Zellen“ (APCs) zusammengefassten Zelltypen (Monocyten, B-Zellen und dendritische Zellen) stellen die DCs bei weitem die bedeutsamste Gruppe dar. Dendritische Zellen lassen sich in die Untergruppen von myloiden DCs und plasmacytoiden DCs unterscheiden.

Im Gegensatz zu anderen dendritischen Zell-Subpopulationen, die eine breite Anzahl an TLRs exprimieren, sind die TLR-Rezeptoren bei pDCs auf TLR7 und TLR9 reduziert (Kadowaki *et al.*, 2001). So können nicht alle Dendritischen Zellen durch CpG-Motive stimuliert werden. Für das humane System wurde beschrieben, dass lediglich die Subpopulation der plasmacytoiden DCs neben den B-Zellen direkt durch CpG-ODN aktiviert werden, nicht aber myeloide Dendritische Zellen (Krug *et al.*, 2001b; Hornung *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass nur plasmacytoide DCs mit der Produktion von IFN- α auf Stimulation mit CpG-ODN reagieren (Krug *et al.*, 2001a). Wie bereits erwähnt, sind pDCs vor allem dadurch charakterisiert, als Antwort auf Stimulation in kurzer Zeit große Mengen an Typ1 IFN (IFN-alpha and IFN-beta) produzieren zu können (Bauer *et al.*, 2001a). CpG-Motive stimulieren in DCs in erster Linie die Reifung und die Differenzierung dieser Antigen-präsentierenden Zellen. So induzieren CpG-Motive die Sekretion von Cytokinen wie Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-12 (bei Anwesenheit von CD40-Ligand) und von verschiedenen Chemokinen (Bauer *et al.*, 2001a; Krug *et al.*, 2001b). Neben dieser Wirkung weisen DCs nach CpG-Stimulation eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie MHCII, CD40, CD54, CD80, CD86 und CD83 auf der Zelloberfläche auf (Hartmann *et al.*, 1999; Behboudi *et al.*, 2000; Brunner *et al.*, 2000; Krug *et al.*, 2001b). Zudem werden durch CpG-Motive auch die Antigenprozessierung und die Halbwertszeit der MHCII-Peptid-Komplexe erhöht (Askew *et al.*, 2000). Behandlung von DCs aus humanen PBMCs induzierte außerdem T-Zellen zur Sekretion hoher Level an Th1-Cytokinen (Hartmann *et al.*, 1999).

In vivo induzieren CpG-ODN die Wanderung der Langerhans-Zellen (also der Dendritischen Zellen in der Haut) aus der Haut zu den regionären Lymphknoten, wo sie die Effektorzellen des Immunsystems aktivieren (Ban *et al.*, 2000). Diese CpG-vermittelten Reaktionen in den Antigen-präsentierenden Zellen sind so stark, dass CpG-ODN sogar eine CTL-Antwort ohne die sonst notwendige kostimulatorische Beteiligung der T-Helfer-Zellen *in vivo* induzieren können (Sparwasser *et al.*, 2000).

Als weiterer Effekt wurde für CpG-stimulierte DCs beschrieben, dass sie bei Kokultivierung mit Tumorzellen einen potenteren prophylaktischen Schutz vermitteln und eine therapeutische anti-Tumor-Effektivität zeigen (Brunner *et al.*, 2000).

Im humanen System zeigen außer B-Zellen und pDCs alle anderen Zellpopulationen des Immunsystems lediglich indirekte Effekte auf die Stimulation mit CpG-ODN (Hornung *et al.*, 2002) und sind daher hier nicht berücksichtigt.

1.7 Molekulare Wirkmechanismen von CpG-ODN

Es war lange Zeit unbekannt, welche molekularen Mechanismen für die Signaltransduktion durch CpG-ODN verantwortlich sind. Inzwischen gibt es jedoch starke Evidenz dafür, dass CpG-ODN von Zellen durch adsorptive Endocytose aufgenommen werden und die folgende zelluläre Aktivierung eine Bindung an TLR (*toll-like-receptor*) 9 benötigt (Takeshita *et al.*, 2001). Hemmi konnte als erster bei Mäusen zeigen, dass die zelluläre Antwort auf CpG-ODN durch das Transmembranprotein TLR9 vermittelt wird (Hemmi *et al.*, 2000). Später wurde auch der Zusammenhang zwischen CpG-DNA und dem humanen TLR9 beschrieben (Takeshita *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2001b; Bernasconi *et al.*, 2003).

Toll-like-Rezeptoren wurden initial in Insekten identifiziert als Rezeptoren, die essentiell für die Entwicklung der dorsoventralen Polarität während der Embryogenese sind. Neuere Studien zeigten jedoch, dass sie auch eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität von Insekten gegen Pilzinfektionen spielen (Lemaitre *et al.*, 1996). Säugetier-Homologe von *Toll* wurden durch Recherche in Datenbanken mit *expressed sequence tags* (ESTs) und genomischen Sequenzen identifiziert. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten 11 Mitglieder der TLR-Familie in Säugetieren gefunden werden (Akira, 2003). Die Unterfamilie der Nukleinsäure-erkennenden Rezeptoren umfasst TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9.

Diese Untergruppe zeichnet sich außerdem durch die gemeinsame intrazelluläre Lokalisation aus, wogegen andere TLRs auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Für diese subzelluläre Lokalisation wird angenommen, dass sie für die Spezifität der Rezeptoren verantwortlich ist und Aktivierung durch eigene Nukleinsäuren verhindert (Barton *et al.*, 2006).

Die Familie der TLRs gehört zu den *pattern recognition receptors* (PRRs), welche eine essentielle Rolle bei der Erkennung von mikrobiellen Komponenten (*pathogen-associated molecular patterns*) spielen (Medzhitov *et al.*, 1997). TLRs gehören außerdem zu der übergeordneten Superfamilie der *interleukin-1 receptors* (IL-1Rs), die sich durch signifikante Homologien in ihrer cytoplasmatischen Domäne auszeichnen. Es handelt sich dabei um einen konservierten *stretch* von 200 Aminosäuren in ihrer cytoplasmatischen Region, der daher auch als TIR-Domäne (Toll-IL-1R) bezeichnet wird. Die homologe Region im TIR-Motiv ist beschränkt auf drei konservierte Boxen, die für die Signaltransduktion entscheidende Aminosäuren enthalten. Im Unterschied zu der hoch konservierten, plasmatischen Region der TLRs sind die extrazellulären Regionen recht unterschiedlich.

Der extrazelluläre Teil der TLRs enthält einen *leucin rich repeat* (LRR), von dem angenommen wird, dass er direkt in die Erkennung einer Reihe von Pathogenen involviert ist (Akira, 2003). Die Nukleinsäure-erkennenden Rezeptoren TLR7, 8 und 9 sind untereinander mehr verwandt, als mit TLR3 und teilen einige ungewöhnliche, konservierte Bereiche in der extrazellulären Domäne. Genaugenommen besitzen TLR7, TLR8 und TLR9 ein 16 Aminosäuren großes Insert im LRR8. Dieses Insert weist vier hoch konservierte Cysteinreste auf, für die gezeigt werden konnte, dass sie essentiell für das *signalling* der Rezeptoren sind (Gibbard *et al.*, 2006). Aufgrund der Ähnlichkeit der cytoplasmatischen Domänen nutzen die IL-1R- und die TLR-Familien denselben Signaltransduktionsweg. Das Auslösen der IL-1R- oder TLR-Signalkaskade hat eine Anlagerung des Adapterprotein *myeloid differentiation marker 88* (MyD88) an den Rezeptorkomplex zur Folge. MyD88 verbindet die TIR-Domäne mit den *interleukin-1 receptor associated kinases* (IRAK-1 und IRAK-4). Die durch die Komplexbildung aktivierte IRAK-4 bewirkt die Hyperphosphorylierung von IRAK-1, welche anschließend mit einem weiteren Adapterprotein, dem *tumor necrosis factor receptor activated factor 6* (TRAF6), interagiert. Die Assoziation von IRAK-1, IRAK-4 und TRAF6 bewirkt schließlich eine Konformationsänderung der Faktoren, was zu ihrer Dissoziation vom Rezeptorkomplex führt. Der IRAK-1-, IRAK-4- TRAF6-Komplex interagiert an der

Innenseite der Zellmembran mit einem anderen vorgeformten Komplex, der aus der MAP3-Kinase TAK1 und den Adapterproteinen TAB1 und TAB2 besteht. Nach einer Phosphorylierung von TAK1 und TAB2 findet eine Translokation des Komplexes bestehend aus TAK1, TAB1, TAB2 und TRAF6 ins Cytosol statt. Das im folgenden im Cytoplasma aktivierte TAK1 führt seinerseits zu einer Aktivierung von IKK. Inaktives IKK hält den Transkriptionsfaktor NF κ B im Cytoplasma zurück. Die Aktivierung von IKK führt zu einer Phosphorylierung und Degradation von I κ B und fortlaufender Freisetzung von NF κ B. Außerdem führt die Aktivierung von TAK1 zur Aktivierung von *p38 mitogen-activated proteinkinases* = MAP-Kinasen (MAPK) und der *c-Jun NH₂- terminal kinase* (JNK). Letztendlich werden dadurch Genexpression und Cytokinsekretion induziert (Akira, 2003). Nicht vollständig geklärt bleibt hingegen, wie TLR9 CpG-DNA erkennt, da bisher keine Bindungsdomäne nachgewiesen werden konnte. Die Internalisierung von CpG-ODN und die durch CpG-ODN ausgelöste Signalkaskade bis hin zur Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt.

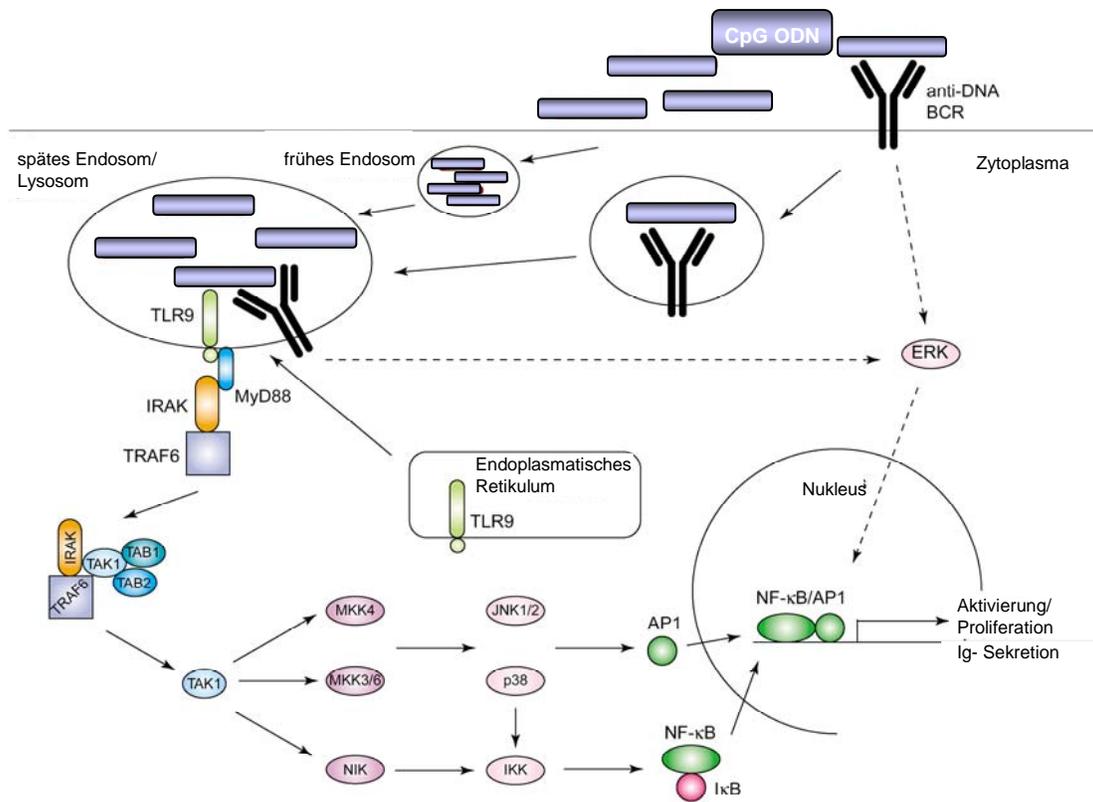


Abb. 1.6 Modell für TLR9-signalling in B-Zellen nach (Peng, 2005)

1.8 Bedeutung der Aufnahme für Immunstimulation durch CpG-ODN

Es konnte bereits 1998 gezeigt werden, dass CpG-DNA pH-abhängig durch unspezifische Endocytose in Endosomen aufgenommen werden muss, um ihre Wirkung zu entfalten (Hacker *et al.*, 1998; Yi *et al.*, 1998b). Weiterhin wurde beschrieben, dass die Aufnahme von ODN nicht durch Membranrezeptoren wie z.B. *scavenger*-Rezeptoren vermittelt wird (Zhu *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite wurde die Notwendigkeit eines zweiten Rezeptors oder Kofaktors für CpG-*signalling* diskutiert (Verthelyi *et al.*, 2003). Wegen gegensätzlicher Aussagen in der Literatur blieb der hauptsächliche Mechanismus für die effektive Internalisierung von ODN in Zellen jedoch lange Zeit unklar (Krieg, 2002).

In den aktuellen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass CpG-ODN über Clathrin-abhängige Endocytose internalisiert werden (He *and* Kogut, 2003). Auch jüngste fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen durch Kollokalisations-Experimente mit Transferrin und einem weiteren Marker für frühe Endosomen, dass CpG-DNA durch Clathrin-vermittelte, Caveolin-unabhängige Endocytose internalisiert wird (Latz *et al.*, 2004).

Interaktion zwischen CpG-ODN und TLR9 führt zu einer Anschwellung und Acidifikation der endocytotischen Vesikel und der Generation reaktiver Sauerstoffspezies (Hacker *et al.*, 1998; Yi *et al.*, 1998b). Diese Abfolge von Ereignissen ist kritisch für CpG-vermitteltes *signalling*, was dadurch gezeigt wird, dass durch Stoffe, die die endosomale Reifung und Acidification inhibieren (wie z.B. Chloroquin und Wortmannin), Immunstimulation verhindert wird (Hacker *et al.*, 1998; Yi *et al.*, 1998b; Ahmad-Nejad *et al.*, 2002).

Es wurde weiterhin beschrieben, dass, obwohl die meisten TLR-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorkommen, TLR9 jedoch nicht auf der Zelloberfläche, sondern in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Dies spricht auch für die Notwendigkeit der Internalisierung von CpG-ODN für die Signalauslösung. Auch für die humane B-lymphoide Zelllinie BJA-B konnte eine intrazelluläre Expression des TLR9-Rezeptors nachgewiesen werden (Leifer *et al.*, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass sich TLR9 nach einer Behandlung von Zellen mit CpG-ODN in endocytotischen Vesikeln (genauer in Lysosom-assoziierten Membranprotein Typ 1-positiven Lysosomen) befindet. Vor CpG-Behandlung wurde der TLR9-Rezeptor jedoch im *endoplasmatischen reticulum* (ER) lokalisiert, was die Forderung nach der Existenz eines

Translokations-Mechanismus von TLR9 zu den „*signalling compartments*“ bedingt, die die CpG-DNA enthalten (Leifer *et al.*, 2004). Im selben Jahr wurde diese Neuverteilung von TLR9 vom ER zu CpG-haltigen Strukturen fluoreszenzmikroskopisch bestätigt.

Demnach findet nach der Aufnahme von CpG-DNA in Zellen (Untersuchungen in DCs) eine Translokation von TLR9 vom ER zu CpG-DNA-haltigen Strukturen statt, die auch MyD88 akkumulieren, wo schließlich Signaltransduktion ausgelöst wird (Latz *et al.*, 2004). Es gibt zwei konkurrierende Hypothesen darüber, wie diese Translokation des Rezeptors stattfindet. Es könnte ein konstitutives Recycling von ER-abgeleiteten Vesikeln über den Golgi-Apparat stattfinden, von wo sie zu den späten Endosomen und Lysosomen targetiert werden könnten. Die derzeit favorisierte Hypothese geht jedoch von einer Verschmelzung von Ausläufern des ER mit der Plasmamembran aus, wonach die so ausgeschleusten Rezeptoren erneut durch Endocytose aufgenommen werden. Des Weiteren konnte Sequenz- und pH-abhängige Bindung von einzelsträngiger CpG-DNA an den TLR9-Rezeptor in Ligand-Bindungsstudien nachgewiesen werden (Rutz *et al.*, 2004).

Die Internalisierung von ODN erfolgt in Zellkultur spontan ohne die Notwendigkeit von Aufnahme-*enhancern* oder Transfektionsmitteln und ist sowohl temperatur- als auch energieabhängig. Lange Zeit war die allgemeine Meinung, dass während die TLR9-abhängige Aktivierung des Immunsystems kritisch von der Anwesenheit von CpG-Motiven abhängt, die zelluläre Aufnahme unabhängig von DNA-Sequenzmotiven ist. Andererseits wurde publiziert, dass die Aufnahme von CpG-ODN in Zellen der *rate limiting step* für die Aktivierung des Immunsystems ist (Sester *et al.*, 2000). Neuere Studien zeigen, dass *poly-guanosin-strings* am 3'-Ende von ODN die zelluläre Aufnahme von Phosphodiester-ODN steigern können und es wurde gezeigt, dass eine Steigerung der Aufnahme durch *poly(G)*-Motive zu einer gesteigerten immunstimulatorischen Aktivität führt (Lee *et al.*, 2000; Dalpke *et al.*, 2002; Bartz *et al.*, 2004). So sind die Ansichten zu der Bedeutung der zellulären Aufnahme für CpG-vermittelte Immunstimulation weiterhin umstritten.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Eine Selektion auf Sequenzmotive mit verbesserter Aufnahme in BHK-21 (*baby hamster kidney*) Zellen führte zu einem sechs Basen großen Sequenzmotiv 5'-TCGTGT-3' (Georg Sczakiel, persönliche Mitteilung). Die Tatsache, dass dieses Hexamermotiv ein CpG-Dinukleotid enthielt, führte zu der Fragestellung, ob dieses Sequenzmotiv immunstimulatorisch aktiv ist, und ob eine mögliche potente immunstimulatorische Aktivität auf eine verbesserte Aufnahme des Motivs in Zellen zurückzuführen ist. Dazu sollte zunächst die immunstimulatorische Aktivität in Hinblick auf die Oberflächenmoleküle CD54 und CD80, die Induktion von B-Zell-Proliferation und die Ausschüttung von Cytokinen (IFN- α) charakterisiert werden. Die Versuche zur Charakterisierung der immunstimulatorischen Aktivität wurden in der Zelllinie BJA-B (*human Burkitt-Lymphoma*), humanen PBMCs unter Betrachtung der B-Lymphocyten und in humanen pDCs durchgeführt.

Um die Bedeutung der Aufnahme von CpG-ODN für die Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes näher zu untersuchen, bezog sich das weitere Interesse auf die quantitative Bestimmung der Menge an CpG-ODN, die internalisiert werden muss, um einen immunstimulatorischen Effekt zu verursachen. Quantitative Bestimmung heißt in der vorliegenden Arbeit, dass nicht nur die extrazelluläre Konzentration von ODN beschrieben wurde, sondern auch die Anzahl der Kopien pro Zelle von ODN nach zellulärer Aufnahme. Weitere Untersuchungen zielten auf die Abhängigkeit der zellulären Aufnahme von verschiedenen Parametern, wie der ODN-Konzentration, der Inkubationszeit, der Anwesenheit eines unmethylierten CpG-Motivs und der chemischen Modifikation. Schließlich sollte untersucht werden, ob die zelluläre Aufnahme in BJA-B-Zellen sequenzspezifisch ist und ob das Maß an Internalisierung von CpG-ODN in BJA-B-Zellen mit dem durch sie vermittelten, immunstimulatorischen Effekt korreliert ist.

Das gegenwärtig akzeptierte Arbeitsmodell zur Rolle der intrazellulären Lokalisation für die Wirksamkeit immunstimulatorischer ODN sollte qualitativ untersucht werden. Grundlage für das Arbeitsmodell waren die derzeit in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse, die schematisch in Abb. 1.7 dargestellt sind.

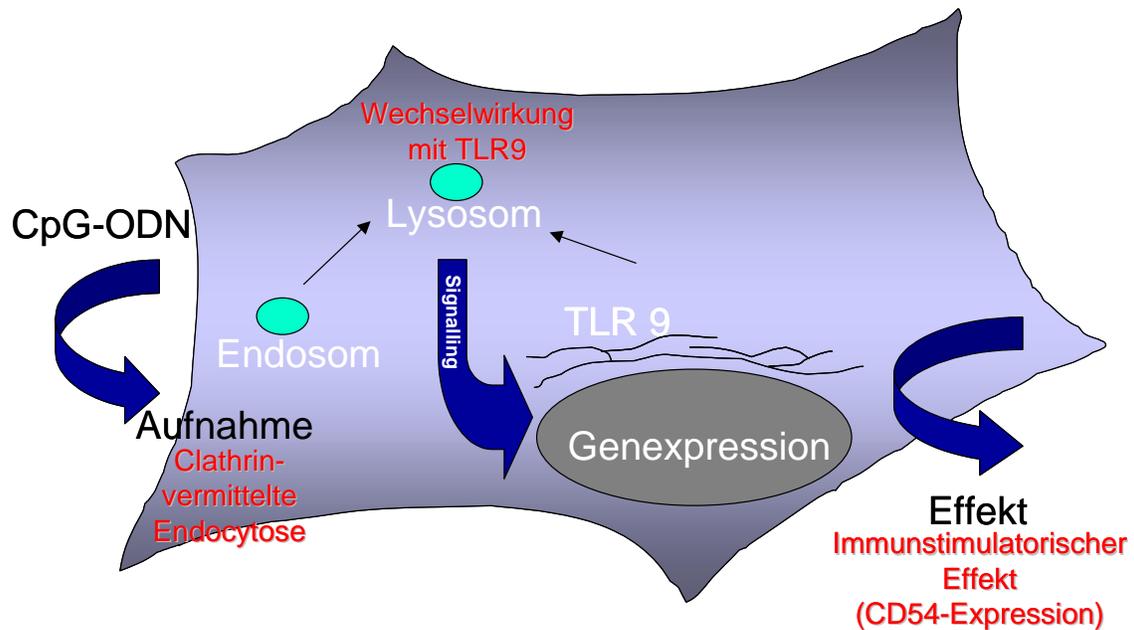


Abb. 1.7 Arbeitsmodell zur Untersuchung der Aufnahme und Wirkungsweise immunstimulatorischer ODN

CpG-ODN müssen durch Clathrin-vermittelte, Caveolin-unabhängige Endocytose in Endosomen aufgenommen werden, um ihre Wirkung zu entfalten (He *et al.*, 2003;Latz *et al.*, 2004). Weiterhin ist die Ansäuerung dieser Kompartimente zu Lysosomen wichtig für die Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes (Hacker *et al.*, 1998;Yi *et al.*, 1998b;Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Der Rezeptor, der letztlich für das Auslösen der Signalkaskade durch Wechselwirkung mit CpG-ODN verantwortlich ist, ist der TLR9-Rezeptor (Takeshita *et al.*, 2001;Bauer *et al.*, 2001b;Bernasconi *et al.*, 2003). In nicht stimulierten Zellen wurde der TLR9-Rezeptor im ER nachgewiesen, wogegen nach Inkubation der Zellen mit CpG-ODN eine Kolokalisation des TLR9-Rezeptors mit endocytotischen, lysosomalen Vesikeln gezeigt werden konnte, was die Forderung nach der Existenz eines Translokations-Mechanismus bedingt (Leifer *et al.*, 2004;Latz *et al.*, 2004).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Pipetten Pipetman	Gilson, Villiers Le Bel (Frankreich)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
pH-Meter CG 820	Schott Geräte (Merck), Mainz
Vortexer REAX 1DR	Heidolph, Cinnaminson, NJ (USA)
Schüttler IKA Vibrax-VXR	Jahnke & Kunkel, Staufen
Wasserbad W22	Medingen (Preiss Daimler), Wilsdruff
Heizblock Techne DRI-Block [®] DB 2D	Werner Hassa GmbH, Lübeck
PCR-Block UNO II	Biometra [®] , Göttingen
CO ₂ Water Jacketed Inkubator	Forma Scientific, Marietta (USA)
Sterile Werkbank: Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroinjektionsanlage FemtoJet express	Eppendorf AG, Hamburg
Mikromanipulator 5171	Eppendorf AG, Hamburg
Elektroporation Gene Pulser [®] II	Biorad, Hercules CA (USA)
Elektroporation Pulse-Controller plus	Biorad, Hercules CA (USA)
Elektroporation Capacitance Extender plus	Biorad, Hercules CA (USA)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (HBO 100)	Zeiss, Jena
Spektralphotometer DU [®]	Beckman, Palo Alto (USA)
NanoDrop [®] ND-1000 Spektralphotometer	PeQLab Biotechnologies, Erlangen
FluoroMax-3 [®] Spektralfluorometer	Horiba JobinYvon, Edison NJ (USA)
Microfuge [®] R	Beckman, Palo Alto (USA)
Laborzentrifuge 1K15	Sigma, St. Louis (USA)
Rotixa/RP	Hettich Zentrifugen, Tuttingen
Varrifuge 3,2 RS	Haraeus Sepatech, Osterode
Ultrazentrifuge CO L-70 (Rotor TFT 80-4)	Beckman (Coulter), Palo Alto (USA)

Zellcounter Gen S System 2	Beckman (Coulter), Palo Alto (USA)
Agarose-Gelkammer Mini-Sub [®] Cell GT	Biorad, Hercules CA (USA)
PAA-Gelkammer (Multigel Long)	Biometra, Göttingen
Electrophoresis Power Supply - EPS 600	Amersham Pharmacia, Freiburg
Scintillationszähler Wallac 1409	PerkinElmer, Wellesley, MA (USA)
FACSCalibur (Durchfluscytometer)	BD Biosciences, San Jose (USA)
Image Eraser	Amersham Pharmacia, Freiburg
Typhoon [™] Image	Amersham Pharmacia, Freiburg
Storage Phosphor Screens	Amersham Pharmacia, Freiburg
Millipore Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Corp., Billerica, MA (USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße. 1,5 ml Safety Cap	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Multiply [®] -µStrip Pro 4er Kette	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Kryo-Vials</i> , steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Roth-Messflaschen 20ml Typ „ <i>Vial</i> “	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, 1000µl blau, 200µl gelb	Sarstedt, Nümbrecht
MBP [®] 10 Reach [™] Pipet Tips	MolecularβProducts, San Diego (USA)
Combitipps 1,25 ml	Eppendorf, Hamburg
Cellstar [®] Einweg-Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well Micro Platte mit Abdeckplatte, TC	Greiner bio-one, Frickenhausen
12-Well Micro Platte mit Abdeckplatte, TC	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen 182 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen tissue culture dish 100x20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar [®] -15ml und 50ml PP-Test tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen
Falcon [®] -5ml Polystyrene Round-Bottom Tubes	Becton & Dickinson, Heidelberg
Polycarbonat 2ml Zentrifugen-Röhrchen	Kontron Instruments, Zürich (Schweiz)
Nick [™] -Columns	Amersham Biosciences, Freiburg
Mikroinjektionskapillaren Sterile Femtotips [®]	Eppendorf AG, Hamburg
Elektroporationsküvetten Gene Pulser [®] Cuvette	Biorad, Hercules CA (USA)

Runde Deckgläschen Ø12 mm	Roth, KarlsruheLab-Tek™ II
Kammerdeckgläser (8 Well)	Nunc™, Rochester NY (USA)
Neubauer Zählkammer	Brandt, Ludwigshafen

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40)	Roth, Karlsruhe
APS	Gibco, New York (USA),
Borsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
[γ - ³² P] ATP	PerkinElmer, Wellesley, MA (USA)
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dako Einbettmedium	DakoCytomation, Carpinteria (USA)
DMSO	Serva, Heidelberg
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (HAC)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACSFlow™	Becton & Dickinson, Heidelberg
FITC-Dextran (150 kDa)	Fluka (Sigma), Buchs, SG (Schweiz)
Ficoll (Biocoll Separating Solution Dichte:1,077)	Biochrom AG, Berlin
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycogen (20mg/ml)	MBI Fermentas, St. Leon Rot (USA)
Harnstoff	Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg
HCl	Merck, Darmstadt
Hoechst 33342 Kernfarbstoff	Sigma-Aldrich , Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
<i>Lysotracker</i> blue DND-22, 1mM in DMSO	Molecular Probes, Eugene, OR (USA)
Methanol	Roth, Karlsruhe
Millipore Aqua	Millipore Corp., Billerica, MA (USA)

Monoklonaler TLR9 FITC-AK (Maus IgG1 _κ)	Imgenex, SanDiego, CA (USA)
Na-Acetat	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NP-40 (Nondiet 40)	LKB, Bromma (Schweden)
Paraformaldehyd	Merck-Suchardt, Hohenbrunn
Penicillin/Streptomycin (100x)	Roche AG, Basel
Phenol (Roti [®] Phenol pH 7,5-8,0)	Roth, Karlsruhe
Scintillations-cocktail Rotiscint 22	Roth, Karlsruhe
Stains All	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton [®] X-100	Serva, Heidelberg
Tryphanblau	Invitrogen, New York (USA)
10x Trypsin/EDTA	Linaris, Bettingen am Main
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt, das mit Hilfe einer „Millipore“-Anlage (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) aufbereitet wurde. Die Zusammensetzung der am häufigsten verwendeten Lösungen, Puffer und Medien ist im folgenden aufgeführt:

PBS (pH 7,4):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄ 2H₂O

1,8 mM KH₂PO₄

TE-Puffer (pH 8,0):

10 mM Tris- HCl

1 mM EDTA

10x TBE-Puffer (pH 8,0):

216 g Tris
 110 g Borsäure
 14,8 g EDTA
 ad 2000 ml

50x TAE-Puffer (pH 8,5):

242 g Tris- HCl
 57 ml Eisessig
 37,2 g Na₂EDTA H₂O
 ad 1000 ml

Auftragspuffer für PAA-Gele:

5% Ficoll 400
 0,01% BPB
 0,01% Xylencyanol
 1x TBE

Auftragspuffer für Agarosegele:

25% Ficoll 400
 0,25% BPB
 0,25% Xylencyanol
 1x TAE

Stains-All-Färbelösung (pH 8,8):

10 ml (100 mg in 100 ml Formamid)
 10 ml Formamid
 50 ml Isopropanol
 1 ml 3 M Tris HCl
 ad 100 ml H₂O

Hybridisierungslösung (pH 8,0):

20 mM Tris HCl
 100 mM NaCl

2.1.4.1 Zellkultur-Medien und Zusätze

RPMI Medium (25 mM HEPES, L-Glutamin)	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM F-12 Medium (15 mM HEPES, L-Glutamin)	Invitrogen, Karlsruhe
FKS (Fötale Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
MEM (100x nichtessentielle Aminosäuren)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 DNA-Größenstandards

Größenstandards für Nukleinsäuren: „Smart Ladder“ von Eurogentec (Seraing, Belgien)

2.1.6 Kits

Human IFN-alpha Module Set (Bender MedSystems, Wien, Österreich)

VenorGeM Mycoplasmentest (Minerva Biolabs, Berlin)

2.1.7 Zelllinien und primäre Zellen

BHK-21 *Mesocricetus auratus* (Hamster) Nierenfibroblastenzelllinie DSMZ Nr.ACC61

BJA-B humane Burkitt-Lymphomazelllinie DSMZ Nr. ACC72 (DSMZ, Braunschweig)

PBMCs “*peripheral blood mononuclear cells*”

pDCs “*plasmacytoid dendritic cells*”

2.1.8 Antikörper

Bei allen Antikörpern handelte es sich um monoklonale, murine Antikörper. Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgt über die Hybridom-Technik. Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen wird zunächst eine Maus mit diesem Antigen immunisiert. Aufgrund der Immunantwort kommt es zur Reifung von B-Lymphocyten, die Antikörper bilden und sich in der Milz anreichern. Aus der entnommenen Milz werden die B-Lymphocyten isoliert und mit Zellen (Plasmazellen) einer aus einem Myelom gewonnenen Zelllinie fusioniert. Als Produkt entstehen sogenannte Hybridomzelllinien. Diese Hybridomzellen vereinigen Eigenschaften ihrer Ursprungszellen: vom B-Lymphocyt die Eigenschaft einen bestimmten Antikörper zu produzieren, von der Myelomzelle die Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum in Kultur. Für die Gewinnung des monoklonalen Antikörpers wird die Hybridomzelllinie ausgewählt, die am besten das gewünschte Epitop auf dem Antigen bindet. Die unsterbliche Zelllinie wird aufbewahrt und der Zellüberstand wird regelmäßig bei Bedarf geerntet. Die Antikörper heißen monoklonal, weil sie aus einer einzigen Ursprungs-B-Zelle stammen und daher alle identisch sind.

Die Antikörper wurden von Becton & Dickinson (Heidelberg) bezogen. Die Anregungswellenlänge des Lasers im FACSCalibur (Durchflusscytometer) beträgt 488 nm. Die Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe liegen bei 496 nm für PE und 494 nm für FITC. Die Emissionsmaxima liegen bei 578 nm (rot) für PE und bei 519 nm (grün) für FITC.

CD54	PE <i>monoclonal mouse</i> anti-ICAM-1-IgG _{2b} κ -Antikörper Cat.No.: 347977(7977)
CD80	PE <i>monoclonal mouse</i> anti-CD80-IgG ₁ κ -Antikörper Cat.No.: 557227(Was:36795X)
CD19	PE <i>monoclonal mouse</i> anti-CD19-IgG ₁ κ -Antikörper Cat.No.: 555413(Was:30655X), (B-Zell-Marker)
CD19	FITC <i>monoclonal mouse</i> anti-CD19-IgG ₁ κ -Antikörper Cat.No.: 555412(Was:30654X), (B-Zell-Marker)
Iso-Antikörper	PE <i>mouse</i> IgG ₁ κ Cat.No.: 555749 (Was:33815X)
Iso-Antikörper	FITC <i>mouse</i> IgG ₁ κ Cat.No.: 555748 (Was:33814X)
Iso-Antikörper	PE <i>mouse</i> IgG _{2b} κ (Anti-Dansyl) Cat.No.: 555743 (Was:33805X)

2.1.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Metabion GmbH (Martinsried) und von Biomers (Ulm) bezogen. Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wurden bei IBA (Göttingen) erworben. Sie wurden in nukleasefreiem TE-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 gelöst und bei -20° C gelagert.

Name	Nukleotid-Sequenz 5'→3'	chemische Modifikation	Länge (nt)
ODN 2080-C ₄	TCG TCG TTC CCC CCC CCC CCC CCC	none	24
ODN 2006	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT	none	24
S-ODN 2006	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT	PTO	24
ODN 2216	GGG GGA CGA TCG TCG GGG GG	none	20
TM6	TCG TGT	none	6
S-TM6	TCG TGT	PTO	6
TM6 ₂	TCG TGT TCG TGT	none	12
S-TM6 ₂	TCG TGT TCG TGT	PTO	12
TM6 ₃	TCG TGT TCG TGT TCG TGT	none	18
S-TM6 ₃	TCG TGT TCG TGT TCG TGT	PTO	18
TM6 ₄	TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT	none	24
S-TM6 ₄	TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT	PTO	24
TM6 ₅	TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT	none	30
S-TM6 ₅	TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT	PTO	30
TM6 ₆	TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT	none	36
S-TM6 ₆	TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT TCG TGT	PTO	36
5'TM6-Poly C	TCG TGT CCC CCC CCC CCC CCC CCC	none	24
3'TM6-Poly C	CCC CCC CCC CCC CCC CCC TCG TGT	none	24
TM6-Poly C	CCC CCC CCC TCG TGT CCC CCC CCC	none	24
TM6 ₄ -C/A ^{del.}	TAG TGT TAG TGT TAG TGT TAG TGT	none	24
S-TM6 ₄ -C/A ^{del.}	TAG TGT TAG TGT TAG TGT TAG TGT	PTO	24
TM6 ₄ -C ^{Me}	TC ^{Me} G TGT TC ^{Me} G TGT TC ^{Me} G TGT TC ^{Me} G TGT	C ^{Me} derived	24
S-TM6 ₄ -C ^{Me}	TC ^{Me} G TGT TC ^{Me} G TGT TC ^{Me} G TGT TC ^{Me} G TGT	C ^{Me} deriv.PTO	24
NOV 2009-A ₄	AAT CCT CCC CCA GTT CAC CCA AAA	none	24
S-NOV 2009-A ₄	AAT CCT CCC CCA GTT CAC CCA AAA	PTO	24
ON ah1	TGA TTC TGA TTC TGA TTC TGA TTC	none	24
ON ah2	CGG TGT CGG TGT CGG TGT CGG TGT	none	24
ON ah3	GAT AGC ACA GGA TAG CAC AGG ATA	none	24
S-G3139	TCT CCC AGC GTG CGC CAT	PTO	18
G3139-157	TCT CCC AGC GTG CGC CAT <i>GAT TCG TGT G</i>	part PTO	28
G3139-CH1	TCT CCC AGC GTG CGC CAT <i>GAT AGC ACA G</i>	part PTO	28
G3139-157-C ^{Me}	TCT CCC AGC GTG CGC CAT <i>GAT TC^{Me}G TGT G</i>	C ^{Me} part PTO	28

Tabelle 2.1. Sequenzen der Oligonukleotide

Gekennzeichnet sind immunstimulatorisch wirksame CpG-Motive. Abkürzungen: C^{Me}, Methylcytosin; PTO, Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide, kursiv, Phosphordiester-Bindungen bei Chimeren

2.2 Methoden

2.2.1 Analyse und Manipulation von Nukleinsäuren

Für die käuflich erworbenen Oligonukleotide wurde vom Hersteller eine Konzentration von 100 μM angegeben. Bevor die ODN auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt wurden, wurden die Konzentrationsangabe ebenso wie die Integrität und Reinheit der einzelnen ODN überprüft. Hierzu wurden 2 μl der ODN auf einem 15%-igen, denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und die Konzentration durch Messung im Spektralphotometers DU[®] (Beckman) oder im NanoDrop[®] ND-1000 Spektralphotometer (PeQLab Biotechnologies) überprüft.

Zur Überprüfung der Qualität der Nukleinsäurepräparationen aus Zelllysaten wurden 2 μl der Präparation auf einem 0,7%-igen Agarose-Gel aufgetrennt, um anhand der hochmolekularen DNA und der 18 S und 28 S RNA-Banden mögliche Degradation zu sehen. Außerdem wurde die DNA-Konzentration der Extraktionen durch Messung im NanoDrop[®] ND-1000 bestimmt.

2.2.1.1. Spektralphotometrie

2.2.1.1.1 Konzentrationsbestimmung im Photometer

Mit Hilfe eines Spektralphotometers DU[®] (Beckman, Palo Alto, USA) wurde die Konzentration der gelieferten Oligonukleotide überprüft. Dazu wurden die Oligonukleotide mit 10 mM Tris HCl (pH 8) 1:50 verdünnt und im Photometer bei 260 nm gemessen. Die optische Dichte (OD) sollte bei den Messungen nicht größer als 2 sein, damit man sich im linearen Messbereich befindet. Optimale OD-Werte liegen zwischen 0,1 und 1,0.

Aus den gemessenen OD-Werte ließen sich die zugehörigen Konzentrationen folgendermaßen bestimmen:

$$\begin{aligned} \text{Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} &= \text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{spez. Absorptionskoeffizient}_{\text{ssDNA}}}{1000} \mu\text{g}/\mu\text{l} \\ &= \text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \frac{50 \cdot 33}{1000} \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Den für die Versuche durchgeführten Verdünnungen wurde eine Konzentration von 100 μM zugrunde gelegt.

2.2.1.1.2 Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop[®]

Außer mit herkömmlicher Spektralphotometrie wurde die Konzentration der gelieferten Oligonukleotide auch durch Konzentrationsbestimmung im NanoDrop[®] ND-1000 Spektralphotometer (PeQLab Biotechnologies) überprüft. Das Messprinzip dieses Gerätes beruht ebenfalls auf der Spektralphotometrie, verfügt jedoch über ein patentiertes Proben-Auftrags-Verfahren. Es erlaubt den direkten Auftrag der Proben auf einen Sockel ohne Verwendung von Küvetten. Hierbei wurden die Proben unverdünnt in einem geringen Volumen von 1-3 μl auf den Lichtkanal aufgetragen. Das Gerät erzeugt beim Herunterlassen des Messarms durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine Flüssigkeitssäule. Durch die definierte Strecke der erzeugten Säule von 1 mm findet die spektralphotometrische Messung statt. Es können Proben in einem Konzentrationsbereich von 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ - 3,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Nukleinsäurekonzentration gemessen werden. Die gemessenen Adsorptionsspektren und Werte werden vom Gerät angezeigt.

2.2.1.2. Gelelektrophorese

2.2.1.2.1 Analytische, denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren nach ihrer Größe und Ladung getrennt. Es kamen 0,7 %-ige Agarose-Gele zum Einsatz. Die entsprechende Menge an Agarose wurde mit 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, anschließend auf das gewünschte Volumen mit H_2O dest. wieder aufgefüllt und mit 0,5 μg Ethidiumbromid/ml Agaroselösung versetzt.

Die Gellösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach Verfestigung mit 1 x TAE als Laufpuffer übergossen. Die Proben wurden mit einem Zehntel Volumen Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 5-10 Volt/cm. Die Nukleinsäure-Banden konnten nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht aufgrund der Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden.

2.2.1.2.2 Analytische, denaturierende Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Die Oligonukleotide wurden auf einem 15%-igen Polyacrylamidgel (8M Urea) aufgetrennt. Da die Proben vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert wurden, erfolgte die Auftrennung nach Molekulargewicht und Ladung, während die Struktur der Nukleinsäuren keine Rolle spielte. Für ein Gel wurden 17 ml einer Stammlösung, 170 µl 10% APS und 17 µl TEMED benötigt. Ein Ansatz für 20 ml Stammlösung bestand aus 10 g Harnstoff, 7,5 ml Acrylamid, 2 ml 10x TBE und 3,5 ml H₂O. Mit Hilfe einer Vorrichtung aus zwei Glasplatten, die über Abstandshalter fixiert wurden, wurde ein 1 mm dickes Gel mit einer Größe von 11 x 12 cm gegossen. Zur Erzeugung der Probentaschen wurde ein Kamm am oberen Rand der Gels aufgesteckt. Nachdem die Polymerisation erfolgt war (ca. 30 Minuten), wurde das Gel in eine Gelkammer (Biometra, Göttingen) eingespannt. Diese wurde anschließend mit 1x TBE als Laufpuffer aufgefüllt und der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde das Gel für ca. 30 Minuten bei 300 V auf die benötigte Temperatur gebracht. Als Auftragsproben wurden jeweils 2 µl der jeweiligen Oligonukleotid-Lösung, 6 µl Formamid und 2µl Auftragspuffer verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen zunächst bei 95° C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt, um eine Rückfaltung der Sekundärstrukturen zu verhindern. An das beladene Gel wurde bei Raumtemperatur weiterhin eine Spannung von 300 V angelegt. Anschließend wurde das Gel für 10 – 15 min leicht in einer *Stains-All* Lösung geschwenkt, die sowohl DNA als auch Proteine anfärbt. Die Dokumentation erfolgte unter Auflicht.

2.2.1.2.3 Analytische, native Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Zur Analyse der Hybridisierungsprodukte der aus Zelllysate extrahierten ODN und den als Sonde eingesetzten, komplementären, radioaktiv markierten ODN (siehe 2.2.1.3) wurden native 20%-ige Polyacrylamidgele verwendet. Für ein Gel wurden 17 ml einer Stammlösung (20% Acrylamid, 1x TBE) mit 0,1% APS und 0,1% TEMED zwischen zwei 11 x 12 cm große Glasplatten mit 1 mm starken Abstandshaltern gegossen. Zur Erzeugung der Probentaschen wurde ein Kamm am oberen Rand der Gels aufgesteckt. Nach der Polymerisation des Gels (nach ca. 30 Minuten), wurde es wiederum in eine Gelkammer (Biometra, Göttingen) eingespannt und diese mit 1x TBE als Laufpuffer aufgefüllt. Bevor die Proben aufgetragen wurden, wurde das Gel für ca. 10 Minuten bei maximal 200 V und 13 mA bei 4°C unter Spannung gesetzt. Als Auftragsproben wurden die Hybridisierungsansätze und 5 µl Auftragspuffer verwendet. An das beladene Gel wurde bei 4°C weiterhin eine Spannung von maximal 200 V angelegt. Die aufgetrennten, radioaktiv markierten Hybridisierungsprodukte wurden mittels Autoradiographie analysiert.

2.2.1.3 Radioaktive Markierung von ODN zur Generierung einer Sonde

Für eine spätere Hybridisierung mit den aus Zelllysate extrahierten ODN wurde eine komplementäre DNA-Sonde (*Antisense*-Strang) mit [γ - ^{32}P] ATP radioaktiv markiert. Das 5'-Ende der zu markierenden, chemisch synthetisierten ODN liegt im allgemeinen nicht phosphoryliert vor und konnte so direkt über das Anhängen eines radioaktiven Phosphats [γ - ^{32}P] durch eine Polynukleotidkinase (PNK) markiert werden. Die ODN wurden vor der Reaktion 5 min bei 95°C denaturiert mit anschließender Inkubation auf Eis. In einen 20 µl Ansatz für die Enzymreaktion wurde folgendes eingesetzt:

- 1,6 µl 10 µM DNA Sonde (*Antisense*-Strang) (= 16 pmol)
- 5 µl [γ - ^{32}P] ATP (1 mmol = 3000 Curie)
- 2 µl 10 x Puffer (*forward buffer*)
- 1 µl Enzym T₄ Polynukleotidkinase (MBI Fermentas, Hanover, USA)
- 10,4 µl H₂O dest.

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

Um die nicht eingebauten, radioaktiv markierten Nukleotide abzutrennen, wurden „NickTM-Columns“ von Amersham Biosciences mit 3 ml H₂O dest. äquilibriert. Anschließend wurde der gesamte Kinasierungsansatz (20 µl) in die Mitte der Säule gegeben und der Filter mit 400 µl H₂O dest. gespült. Die radioaktiv markierte Sonde wurde mit weiteren 400 µl H₂O dest. eluiert. Um den Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide in die Sonde zu überprüfen, wurde 1 µl der Sonde mit 2,5 ml „Scintillations-cocktail“ (Rotiscint 22, Roth) versetzt und die *counts per minute* (cpm) im Scintillationszähler (Phillips PW4700 liquid Scintillationszähler) bestimmt.

2.2.2 Zellkulturmethoden

Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich in der keimfreien Atmosphäre einer sterilen Werkbank (Herasafe, Heraeus Instruments) durchgeführt. Die humanen Zelllinien wurden ca. alle drei Monate mittels PCR-basiertem Nachweis auf mögliche Mycoplasmenkontaminationen überprüft. Dazu wurde der VenorGEM Mycoplasmentest (Minerva Boilabs) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2.1 Auftauen der Zellen

In eine Zellkulturflasche wurden 25 ml auf 37° C vorgewärmtes Medium vorgelegt. Es wurde ein *Aliquot* (enthielt 3x10⁶ Zellen der Zelllinie BJA-B oder 2,2x10⁷ Zellen der Zelllinie BHK-21) der in flüssigem Stickstoff (- 196° C) gelagerten Zellen entnommen und in der Hand möglichst schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in das vorbereitete Medium überführt und wie im Folgenden beschrieben im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.2 Kultivierung der Nierenfibroblasten-Zelllinie BHK-21

BHK-21 ist eine Hamster-Nierenfibroblasten-Zelllinie DSMZ Nr. ACC61 DSMZ Nr. ACC61 (DSMZ, Braunschweig), die 1961 aus den Nieren von fünf neugeborenen, 1 Tag alten, syrischen Hamstern (*Mesocricetus auratus*) etabliert wurde.

Es handelt sich bei der Zellmorphologie um fibroblastoide, adhärenente, im Monolayer wachsende Zellen. Diese Zelllinie ist erstmals 1962 von MacPherson et al. in *Virology* 16: 147 beschrieben worden.

Die Verdopplungszeit der Zellen bei optimalen Wachstumsbedingungen beträgt ca. 32-50 Std. Als Kulturmedium wurde D-MEM F-12-Medium mit 10% FKS und 1 x nicht essentiellen Aminosäuren verwendet. Die Zellen wurden in 20 ml Medium in 182 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Etwa alle zwei Tage wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die adhärenenten Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 5 ml auf 37°C vorgewärmtem 1 x Trypsin/EDTA für ca. 5 min abgelöst und die Reaktion mit 10 ml Vollmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 100 x g zentrifugiert und in Vollmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden 3x10⁶ Zellen in einer 182 cm² Zellkulturflasche erneut ausgesät.

2.2.2.3 Kultivierung der Burkitt-Lymphoma-Zelllinie BJA-B

BJA-B ist eine humane Burkitt-Lymphoma-Zelllinie DSMZ Nr. ACC72 (DSMZ, Braunschweig), die 1979 aus dem Tumorgewebe eines fünf Jahre alten, schwarzen Mädchens mit Burkitt-Lymphom etabliert wurde. Es handelt sich bei der Zellmorphologie um runde Zellen die einzeln oder in kleinen *Clustern* in Suspension vorkommen. Die Zelllinie ist erstmals 1975 von Menezes *et al.* im *Journal Biomedicine* 22: 276-284 beschrieben worden (Menezes et al., 1975).

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10% FKS verwendet. Die Zellen wurden in 30 ml Medium in 182 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Der Deckel der Zellkulturflasche war dabei leicht aufgedreht, um die richtige Einstellung des pH-Wertes durch die CO₂-Begasung des Mediums zu gewährleisten. Etwa alle zwei Tage wurden 20 ml der Zellsuspension abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Zum Splitten der Zellen wurden von diesen 20 ml Zellsuspension 5 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt und diese mit 20 ml Medium aufgefüllt. Um eine gleichmäßige Zellsuspension zu gewährleisten, wurden die Zellkulturflaschen vorher leicht geschwenkt.

2.2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Um eine Kryokultur der Zelllinie BJA-B herzustellen, wurden die Zellen zunächst für 3 Minuten bei 1000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden im Gefrierkulturmedium aufgenommen, so dass eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml erreicht wurde. Das Gefrierkulturmedium bestand aus 70% RPMI 1640, 20% FKS und 10% DMSO. Es wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen abgefüllt, so dass *Aliquots* mit jeweils 5×10^6 Zellen entstanden. Die Gefrierkulturen wurden zunächst in ein Isopropanol-Bad bei einer Temperatur von -80°C gestellt. Nach ca. zwei Tagen wurden sie in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

2.2.2.5 Präparation der PBMCs aus *buffy-coats* und Kultivierung

PBMCs (**p**eripher **b**lood **m**ononuclear **c**ells) gelten als Blutzellen mit rundlich geformten Nukleus (Lymphocyten und Monocyten) bestehend aus B-/T-Zellen, NK-Zellen und Dendritischen Zellen (DCs). Physiologisch stellen diese Zellen kritische Bestandteile der Abwehr gegen Infektionen dar.

Die benötigten PBMC wurden aus Blutspenden der Blutbank des Universitätsklinikums SH (Lübeck) gewonnen, bei deren Spendern keine Erkrankungen oder Allergien bekannt waren. PBMCs wurden aus frischen *buffy-coats* isoliert. Unter *buffy-coat* versteht man die Schicht aus Leukocyten und Thrombocyten, die sich nach Zentrifugation von ungerinnbar gemachtem Blut zwischen Plasma und sedimentierten Erythrocyten bildet. Die Gewinnung der PBMCs erfolgte in einer Ficoll-Lösung deren Dichte so eingestellt war, dass durch die Zentrifugalkraft Zellen mit einer größeren Dichte sedimentierten und Zellen mit einer geringeren Dichte aufschwammen. PBMCs hingegen besitzen eine ähnliche Dichte und bilden daher eine schwebende Phase zwischen sedimentierten Erythrocyten und dem Überstand. In einem 15 ml Reaktionsgefäß (Saarstedt) wurden 5 ml Ficoll (Biocoll Separating Solution Dichte:1,077) vorgelegt. Die Ficoll-Lösung wurde vorsichtig mit 8 ml einer 1:1 Verdünnung *buffy-coat* und PBS überschichtet. Es folgt eine Zentrifugation für 20 min bei $600 \times g$ (Varifuge 3,2 RS, Haraeus Sepatech) mit maximal langsamem Beschleunigen und Bremsen. Die nach der Zentrifugation als „milchiger Schleier“ sichtbare Lymphocyten-Phase wurde abgenommen und zwei mal mit 10 ml PBS gewaschen durch 10-minütige Zentrifugation bei $600 \times g$.

Die Zellzahl wurde im Zellcounter (Gen S System 2, Coulter) bestimmt und die Zellsuspension mit PBS auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Die Zellen wurden in Kulturmedium RMPI mit 10% FKS auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt und im Volumen von 300 μ l pro Well einer 96-Well-Platte ausgebracht. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.2.6 Bestimmung der Lebendzellzahl mit Tryphanblau

Tote Zellen lagern den Farbstoff Tryphanblau im Gegensatz zu lebenden Zellen, die diesen aktiv ausschleusen, ein, und erscheinen daher im Durchlicht blau. Die Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des Farbstoffes Tryphanblau (0,4% (w/v) in 0,85% NaCl, Invitrogen) und einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden Zellsuspension und Farbstoff im Verhältnis von 1:1 gemischt und das Verhältnis von angefärbten zu nicht angefärbten Zellen im Mikroskop ausgezählt.

2.2.3 Manipulation von Zellen mit Oligonukleotiden

2.2.3.1 Inkubation der Zellen mit Oligonukleotiden

Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt. Inkubationsansätze wurden in einer 12-Well-Platte (adhärente Zellen) oder in einer 96-Well-Platte (Suspensionszellen) durchgeführt. Die Zellzahl pro Well lag zwischen 100.000 Zellen (BHK-21), 200.000 Zellen (BJA-B) und 300.000 Zellen (PBMCs) in Volumina von 300 μ l. Die Zellkonzentrationen lagen demnach zwischen 3×10^5 , 6×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml. Je nach Konzentration des Oligonukleotids wurden 3 μ l (Endkonz. zwischen 1 nM und 320 nM) oder 15 μ l (Endkonz. zwischen 1 μ M und 5 μ M) Oligonukleotid zugegeben, so dass eine Verdünnung von 1:100 bzw. 1:20 stattfand. Die in den Wells vorliegende Endkonzentration der Oligonukleotide variierte je nach Versuchsansatz.

Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

- 10 nM, 20 nM, 40 nM, 80 nM, 160 nM, 320 nM, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 5 μ M

Die Inkubation mit unmodifizierten ODN erfolgte (wenn nicht anders angegeben) in einer Dreifachgabe nach 0 Std., 4 Std. und 18 Std.; die Inkubation mit Phosphorothioat-modifizierten ODN erfolgte in einer einmaligen Gabe direkt nach Aussaat der Zellen. Anschließend wurde im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ für 44 Stunden inkubiert. Bei Versuchen zur Abhängigkeit der Immunstimulation von der Inkubationszeit wurde die Inkubationszeit variiert. Abweichende Inkubationszeiten sind bei der Beschreibung der jeweiligen Versuche angegeben.

2.2.3.2 Kultivierung der Zellen für Mikroinjektion

Deckgläschen mit 12 mm Durchmesser (Roth) wurden in 70% Ethanol getaucht, abgeflammt und in Petrischalen (Sarstedt) überführt. Anschließend wurden BJA-B-Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in die Petrischalen gegeben und für zwei Tage bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Die mit adhärenenten BJA-B-Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden in neue Petrischalen überführt und mit 20 ml RPMI-1640-Medium, bestehend aus 50% frischem Medium und 50% konditioniertem Medium der laufenden Zellkultur überschichtet. Es wurden noch 200 µl eines 100-fach konzentrierten *Stocks* Penicillin/Streptomycin (Roche) zugegeben und die Deckgläschen vor der Mikroinjektion leicht an den Boden der Petrischale angedrückt.

2.2.3.3 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde mit einem an einen Mikromanipulator 5171 angeschlossenen FemtoJet express (Eppendorf AG) semi-automatisch durchgeführt. Die Betrachtung der Zellen erfolgte im Mikroskop Axiovert 100 (Zeiss). Mit dem FemtoJet express wurden Injektionsdruck, Injektionszeit und Kompensationsdruck kontrolliert. Wenn nicht anders angegeben, betrug der Injektionsdruck 60 hPa und die Injektionszeit 0,2 s. Der Kompensationsdruck lag konstant bei 30 hPa. Für die Injektionen wurden sterile Femtotips® (Eppendorf) als Kapillaren verwendet. Mikroinjiziert wurden Lösungen mit Endkonzentrationen von 5 mg/ml FITC-Dextran (Fluka) und Endkonzentrationen von 2 µM bis 20 µM ODN.

Die Lösungen wurden vor der Injektion mindestens 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert, um ein Verstopfen der Kapillare zu verhindern. Der Mikroinjektionsprozess ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

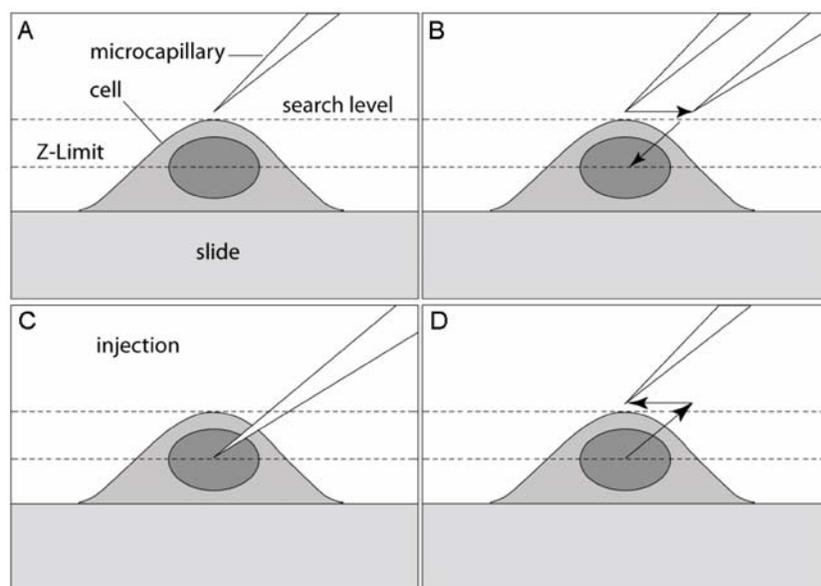


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Mikroinjektionsprozesses

A, Die Kapillare wurde manuell in den *Search Level* über der Zelloberfläche gebracht und die Injektionstiefe (*Z-Limit*) wurde eingestellt. Die Injektion selbst wurde dann im folgenden durch den FemtoJet express (Eppendorf) automatisch durchgeführt. **B**, Dabei fährt die Kapillare zunächst auf der *x*-Achse zurück. **C**, Dann durchsticht sie die Zelle in einem 45° Winkel in der eingestellten Tiefe und injiziert die Flüssigkeit mit dem eingestellten Injektionsdruck und der eingestellten Injektionszeit. **D**, Nach Abschluss der Injektion fährt die Kapillare in die Ausgangsposition zurück. Die Abbildung wurde übernommen von www.eppendorf.com.

2.2.3.4 Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit den Geräten Gene Pulser[®] II, Pulse-Controller plus und Capacitance Extender plus (BIORAD) durchgeführt. 2×10^6 BJA-B-Zellen wurden in einer Gene Pulser[®] Cuvette mit 2mm Elektrodenabstand in einem Volumen von 300 μ l PBS mit 5 mg/ml FITC-Dextran (Fluka) vorgelegt. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen ODN hinzugegeben. Die Elektroporation erfolgte mit 1 Puls bei 960 μ Farad und 100 V bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis gestellt.

Die zerstörten Zellen wurden als viskose Phase abgenommen. Die intakten Zellen wurden zweimal mit je 500 μ l PBS gewaschen und in eine Petrischale mit 10 ml RPMI 1640 Medium mit 10% FKS bzw. in eine 96-Well-Platte mit 300 μ l RPMI 1640 Medium mit 10% FKS überführt und für 24 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.4 Proliferationsassay (Inkubation der Zellen mit CFSE)

Die intrazelluläre Färbung mit CFSE wurde verwendet, um erkennen zu können, ob die verwendeten CpG-ODN einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen haben. CFSE (5-(und 6-) Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester; Molecular Probes, Eugene, Or) wurde für die Färbung von frisch isolierten, humanen PBMCs eingesetzt. Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester gehören zu den Amine-reaktiven Reagenzien und können passiv durch die Zellmembran in Zellen diffundieren. Diese Reagenzien sind farblos und nichtfluoreszierend bis ihre Acetat-Gruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten werden und sich in stark fluoreszierende Farbstoffe verwandeln. Durch Reaktion mit Amin-haltigen Resten intrazellulärer Proteine werden die Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb der Zellen zurückgehalten, so dass sie bei Zellproliferation gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden. Dadurch kommt es bei Zellteilung zu einer Abnahme der Fluoreszenz bei den Tochterzellen, die im Durchfluscytometer nachgewiesen werden kann (Lyons, 2000).

Es wurde auf Eis gearbeitet und das verwendete PBS wurde ebenfalls gekühlt und auf Eis gelagert. Zentrifugiert wurde bei einer Temperatur von 4°C. Die frisch isolierten PBMCs wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS mit einer Endkonzentration von 1 μ M CFSE aufgenommen. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei einer Temperatur von 37°C. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und L-Glutamine (Invitrogen), versetzt mit 10% FKS (Invitrogen), resuspendiert. Darauf folgte die Inkubation mit Oligonukleotiden (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Phosphorothioat-modifizierte ODN wurden direkt nach Aussaat der Zellen zugegeben. Die Inkubation mit unmodifizierten ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 24 Std. mit der Endkonzentration von 5 μ M zu jedem Zeitpunkt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurde ein Drittel des Mediums durch frisches Medium ersetzt, gefolgt von einer erneuten Gabe von wiederum 5 μ M unmodifizierter und modifizierter ODN. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 7 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit CD19-Antikörper (B-Zell-Marker) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

2.2.5 Präparation der Zellen für die Messung im Durchflusszytometer

Es wurde auf Eis gearbeitet und auch das verwendete PBS wurde auf Eis gelagert. Die Zentrifuge wurde bei einer Temperatur von 4°C verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1000 μ l PBS gespült und anschließend bei 4000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Schritt anschließend mit 500 μ l PBS wiederholt. Die Zellen wurden in 50 μ l PBS mit 1% BSA resuspendiert und die Proben mit 10 μ l CD54-Antikörper (BD) inkubiert. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit einem Isotyp-Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Dunkeln für ca. 30 min. Anschließend wurde erneut mit 500 μ l PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 μ l PBS mit 0,01% Paraformaldehyd resuspendiert und die Zellsuspension in Falcon[®]-5ml Polystyrene-Round-Bottom-Tubes (BD) überführt. Bis zur Messung im Durchflusszytometer wurden die Proben vor Licht geschützt und auf Eis gelagert.

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die Analyse der Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel mittels eines optischen Messsystems. Voraussetzung bei der Analyse von Zellen ist, dass sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Eine Zellsuspension wird angesaugt und im Flüssigkeitsstrom des Cytometers in eine Kapillare geleitet, die in der Messkammer einer von Trägerflüssigkeit laminar durchströmten Quarzküvette endet.

Der Zellstrom wird beim Verlassen der Kapillare von der Trägerflüssigkeit erfasst, auf das Küvettenzentrum verengt und stark beschleunigt. So wird gewährleistet, dass die Zellen einzeln und in ausreichendem Abstand zueinander am Messpunkt vorbeifließen (hydrodynamische Fokussierung).

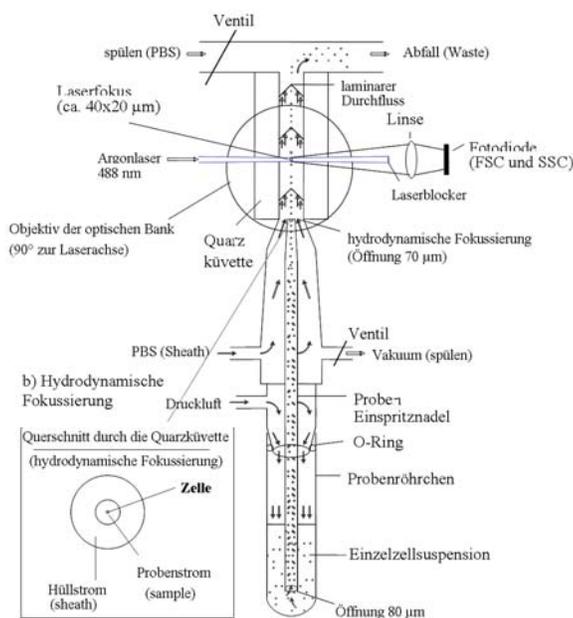


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Quarz-Küvetten-Einheit eines Durchflusscytometers

Gezeigt ist der schematische Aufbau des optischen Messsystems eines Durchflusscytometers. Die Abbildung wurde übernommen von www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de, wo weitere Erläuterungen zu finden sind.

Am Messpunkt trifft der fokussierte Laserstrahl auf die einzelnen Zellen. Das dadurch entstehende Vorwärtsstreulicht (0° - 10° zur Richtung des einfallenden Lichtstrahls) und Seitwärtsstreulicht (90° zur Richtung des einfallenden Lichtstrahls) sowie die Lichtemission der durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffe werden von Photodetektoren registriert und in elektrische Signale (Einheit: Volt) umgewandelt. Jeder gemessenen Signalintensität wird mittels eines Analog-Digitalwandler eine Klassenzahl zugewiesen, die Werte von 0 bis 1024 annehmen kann. Die Fluoreszenzsignale werden logarithmisch verstärkt und auf einer vier Dekaden (0,1 bis 1000) umfassenden logarithmischen Skala dargestellt. In Einparameter-Histogrammen kann die Häufigkeitsverteilung eines Parameters innerhalb einer Zellpopulation dargestellt werden (*Histogramm Plots*).

Bei Zweiparameter-Punktdiagrammen (*Dot Plots*) entspricht jeder Punkt einer Zelle mit ihren zwei Eigenschaften. Die Punktdichte spiegelt die Häufigkeitsverteilung der Eigenschaften wieder.

Das für diese Arbeit verwendete Durchflusscytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) besitzt einen Argonlaser, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Das an den Zellen entstehende Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) gibt Aufschluss über die Zellgröße, das Seitwärtstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) korreliert mit der Granularität der Zellen. Anhand ihrer charakteristischen Eigenschaften ließen sich so im FSC/SSC-Punktdiagramm die Lymphocyten identifizieren. Die Signalverstärkung der Streulichtsignale wurde so eingestellt, dass sich einerseits die Lymphocyten deutlich darstellen ließen und andererseits tote Zellen und Zellfragmente, die sehr geringe FSC-Werte aufweisen, mit Hilfe eines Akquisitionsfensters (*Gate*) ausgeschlossen werden konnten. Die bestimmten Akquisitionsfenster wurden für jede Zelllinie sowie für primäre B-Zellen zu Beginn der Versuche festgelegt und dann über alle folgenden Experimente konstant gehalten. Bandpassfilter ermöglichten bei Mehrfarbenanalyse die Differenzierung der von den angeregten Fluorochromen emittierten Fluoreszenz in den unterschiedlichen Farben: Der Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittierte grünes Licht mit einem Emissionsmaximum von 515 nm (Bandpassfilter 530 +/- 30 nm), der Farbstoff Phycoerythrin (PE) emittierte Licht im roten Spektralbereich mit einem Emissionsmaximum von 580 nm (Bandpassfilter 585 +/- 42 nm). Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzen durch Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Fluoreszenzspektren der Farbstoffe minimal überlappen. Diese Überlappung musste durch Kompensation korrigiert werden. Hierbei wurde rechnerisch der jeweils durch Überlappung entstandene Fluoreszenzanteil vom ursprünglichen Fluoreszenzsignal abgezogen. Hierzu wurden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt wurde, während die anderen Fluorochrome, gebunden an Isotypen-Antikörper (*mouse IgG₁, κ*), als Negativkontrolle dienten und so die Kompensation ermöglichten, da hier sichtbar wurde, wie stark das bestimmte Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlte.

In den hier gezeigten Experimenten wurden die Parameter der Signalverstärkung und der Kompensation für jede Zellart und jede Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen zu Anfang optimal eingestellt und dann über die gesamten Experimente konstant gehalten, so dass die einzelnen Versuche untereinander vergleichbar waren.

Wenn nicht anders angegeben, wurden pro Messung 10.000 Zellen gezählt und anschließend mit dem FACS Analyse Programm CellQuest pro (von BD Biosciences) ausgewertet.

2.2.7 Bestimmung der IFN-alpha-Sekretion von pDCs

Die benötigten pDCs wurden aus frischen PBMCs mit Hilfe des BDCA-4 Isolation-Kits (Miltenyi) nach Herstellerangaben isoliert. Die Menge an IFN-alpha-Sekretion der pDCs nach Stimulation mit verschiedenen ODN wurde mit Hilfe des Kits „human IFN-alpha Module Set“ (Bender MedSystems) nach Anleitung des Herstellers bestimmt und gegen den gemessenen Basalwert korrigiert. Die Bestimmung der IFN-alpha-Sekretion erfolgte in Dreifachbestimmung.

2.2.8 Manipulation der Zellen für Fluoreszenzmikroskopie

Zellen wurden vor der Behandlung mit fluoreszenzmarkierten ODN oder Markern für Zellorganellen auf verschiedenen Trägermaterialien ausgebracht. Bei Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten ODN wurden 200.000 BJA-B-Zellen in 8-Well Kammerdeckgläser (Nunc™) ausgebracht und über Nacht zum adhären bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium der mit adhären BJA-B-Zellen bewachsenen Kammern wurde abgenommen und durch 300 µl zellfreies RPMI 1640 Medium, bestehend aus 50% frischem Medium und 50% konditioniertem Medium der laufenden Zellkultur überschichtet und mit einer Konzentration von 3 µM Oligonukleotid inkubiert.

Bei Mikroinjektion mit fluoreszenzmarkierten ODN wurden BJA-B-Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in die Petrischalen mit Deckgläschen gegeben und für zwei Tage bei 37° C inkubiert. Die Mikroinjektion der Zellen mit einer Konzentration von 30 µM an fluoreszenzmarkierten ODN erfolgte wie unter 2.2.3.3 beschrieben.

Die Präparation der Zellen für Fluoreszenzmikroskopie bzw. die Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop fand jeweils 5 min nach Inkubation mit den ODN statt.

Nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkierten ODN wurde im Einzelfall noch eine Färbung der Lysosomen mit 5 μ M *Lysotracker blue* DND-22 (Molecular Probes) vorgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und entweder lebend betrachtet oder fixiert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wie unter 2.2.9 beschrieben.

2.2.9 Herstellung von Präparaten für Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fixierung der Zellen wurden diese zunächst fünf mal mit je 500 μ l PBS gewaschen. Anschließend fand die Fixierung für 15 min in PBS mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur statt. Die Zellen wurden erneut zwei mal mit je 500 μ l PBS gewaschen.

Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Inkubation in PBS mit 0,2% Triton-X 100 für 20 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden anschließend nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte in Blockierungspuffer (PBS mit 3% BSA und 1% FKS) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem fünfmaligen Waschen fand die Inkubation mit dem FITC-markierten TLR9-Antikörper (Imgenex) in Blockierungspuffer statt für 60 min bei Raumtemperatur. Der Antikörper hatte eine angegebene Konzentration von 0,5 mg/ml und wurde vor Gebrauch 1:100 verdünnt. Nach erneutem fünfmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde im Einzelfall noch eine Färbung des Zellkerns mit einer auf 12 μ g/ml verdünnten Lösung Hoechst 33342 (Sigma) vorgenommen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff dringt durch die Zellmembran in die Zelle ein und interkaliert in doppelsträngige DNA.

In einigen Fällen fand eine Einbettung der Zellen in Dako-Einbettmedium (DakoCytomation) statt. Ein Tropfen dieses Einbettmediums wurde vorsichtig auf den Objektträger gegeben und das Deckglas mit den Zellen luftblasenfrei aufgelegt. Zum Aushärten des Einbettmediums wurde das Präparat mindestens für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

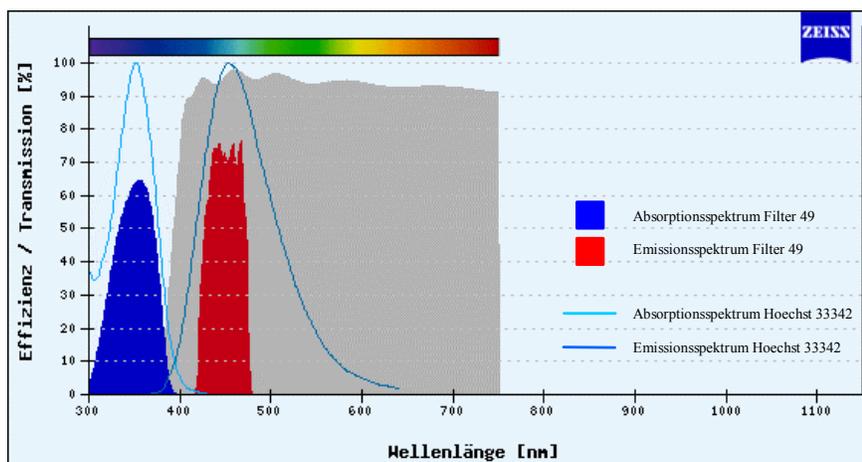
Zur Analyse der intrazellulären Verteilung von fluoreszenzmarkierten ODN nach Inkubation mit humanen B-lymphoiden Zellen wurden fluoreszenzmikroskopische Methoden eingesetzt.

Die Aufnahmen wurden an einem Axioskop (Zeiss) mit einem Öl-Emersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung gemacht. Das Mikroskop war ausgestattet mit Standardfiltersätzen für blaue, grüne und rote Fluoreszenz-Emissionsspektren (Tabelle 2.2). Mit einer angeschlossenen CCD-Digitalkamera (Zeiss) und mit Unterstützung der Software Axiovision (Version 3.2) wurden die Bilder digitalisiert.

Bezeichnung des Filters	Anregungsfilter (nm)	Strahlenteiler (nm)	Emissionsfilter (nm)
49 DAPI shift free Hoechst (blau)	G 365	FT 395	BP 445/50
38 HE eGFP shift free FITC (grün)	BP 470/40	FT 495	BP 525/50
43 HE Cy3 shift free Cy3 (rot)	BP 550/25	FT 570	BP 605/70

Tabelle 2.2 Verwendete Filtersätze im Fluoreszenzmikroskop „Axioskop 2“ (Zeiss, Jena)
Abkürzungen: BP, Bandpassfilter; LP, Langpassfilter; FT, Strahlenteiler

Die Spektren der verwendeten Filter und Fluoreszenzfarbstoffe sind in Abb. 2.3 gezeigt.



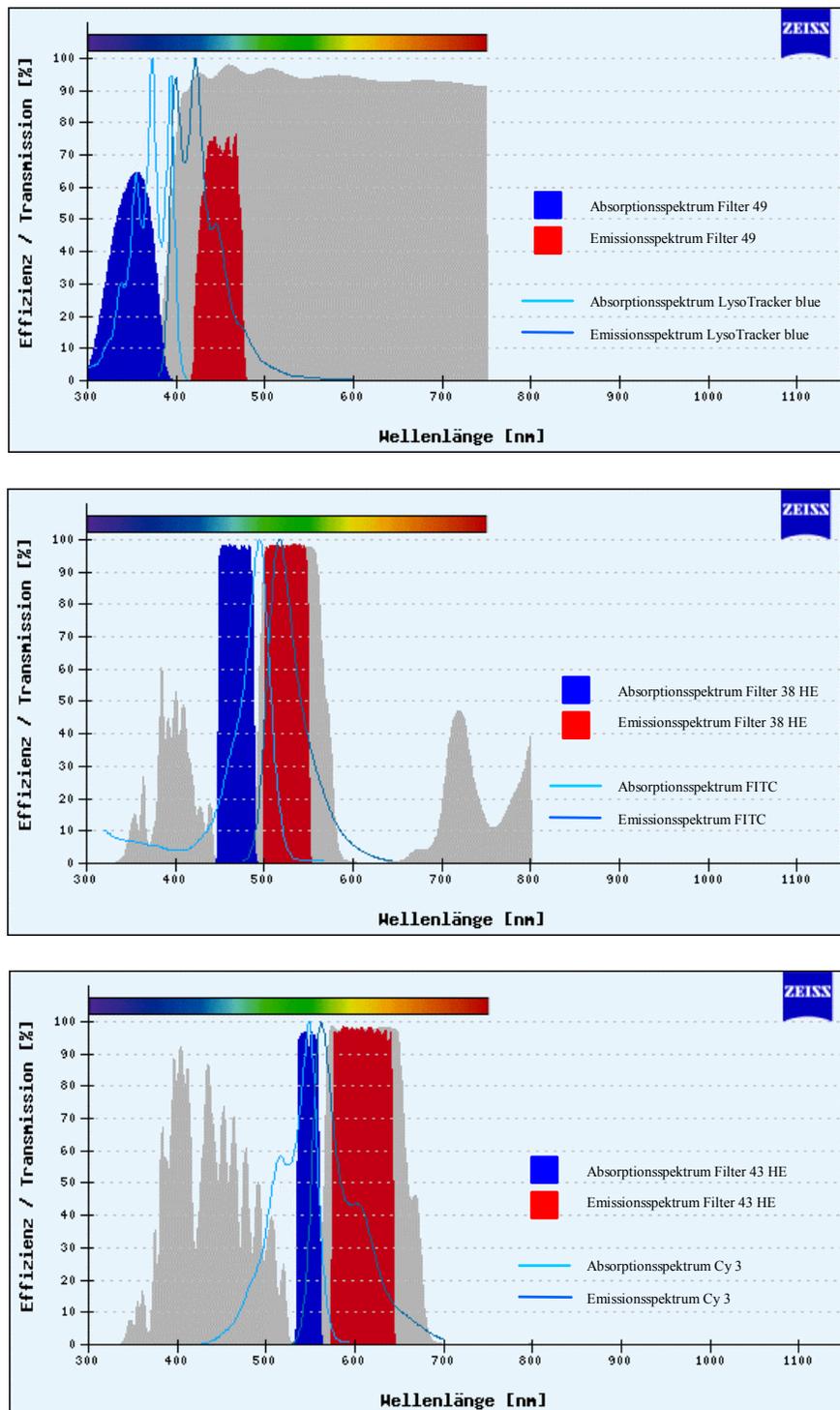


Abb. 2.3: Fluoreszenzspektren der verwendeten Filter und Fluoreszenzfarbstoffe
 Darstellung der Absorptionsspektren (blau) und Emissionsspektren (rot) sowie der Spektren der Strahlenteiler (grau) der eingesetzten Filter sowie der Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Die Abbildungen wurden übernommen von www.zeiss.de.

2.2.11. Quantifizierung von ODN in Zelllysaten mittels radioaktiver Hybridisierung

Der Hybridisierungsassay (Overhoff *et al.*, 2004) diente der Bestimmung der intrazellulären ODN-Menge, um quantitativ die spontane Aufnahme von ODN in Zellen zu ermitteln.

Es wurde auf Eis gearbeitet und auch das verwendete PBS wurde gekühlt und auf Eis gelagert. Die Zentrifuge wurde bei einer Temperatur von 4°C verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die im 96-Well-Format vorliegenden Zellen in 1,5 ml Reagiergefäße (Sarstedt) überführt. Zum Entfernen des Mediums wurden die Zellen bei 4000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und anschließend 5 x mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Herstellung der Zelllysate erfolgte eine Lyse der Zellen in 200 µl PBS, 1% NP-40 für 10 min. Den Ansätzen für Konzentrationsreihen (Standards) wurden anschließend verschiedene Konzentrationen Oligonukleotid zugesetzt. Alle Proben wurden im gleichen Volumen (200 µl) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) aufgenommen und die Nukleinsäuren 5 min unter starkem Schütteln extrahiert (das Phenol wurde zuvor durch wiederholtes Durchmischen mit 1 M Tris HCl auf einen pH-Wert von 8,8 äquilibriert). Die wässrige Phase wurde abgenommen, 2 x mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und die Nukleinsäuren 1 min unter starkem Schütteln extrahiert. Es folgte eine Ethanol-fällung der Nukleinsäuren, wobei 150 µl wässrige Phase abgenommen und mit 15 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2), 375 µl Ethanol und 1 µl Glycogen (20 µg/µl) 30 min bei -80°C gefällt wurden. Durch anschließende Zentrifugation bei 20000 x g für 15 min wurden die präzipitierten Nukleinsäuren sedimentiert und anschließend mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Die Nukleinsäuren wurden ca. 10 min bei RT getrocknet und in 30 µl Hybridisierungslösung (20mM Tris HCl pH 8 , 100mM NaCl) aufgenommen.

10 µl der Nukleinsäurepräparation in Hybridisierungslösung wurden mit einem Überschuss an radioaktiv-markiertem *Antisense*-Strang (120-200 fmol) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte im PCR-Block für 10 min bei 95°C (Denaturierung) und 60 min bei 37°C (Hybridisierung). Die Auftrennung von Einzelstrang (Sonde) und Doppelstrang (Hybridisierungsprodukt) erfolgte mit je 5 µl Probenpuffer durch ein 20%iges, natives PAA-Gel wie unter 2.2.1.2.3 beschrieben. Die Radioaktivität im Gel wurde durch Exposition für 15-20 min auf einem Storage Phosphor Screen (Amersham Pharmacia) und anschließendes Scannen im TyphoonTM Image Scanner (Amersham Pharmacia) detektiert und mit der

Software ImageQuant ausgewertet. Die gleichzeitige Analyse der mitgeführten Standards und der Proben ermöglichte die Bestimmung der absoluten Menge an ODN in den Proben. Dabei wurde automatisch auch der Verlust während der Extraktion der Nukleinsäuren berücksichtigt.

3 Ergebnisse

Das Sequenzmotiv 5'-TCGTGT-3' (TM6), das für eine verbesserte Aufnahme in Säugerzellen in cis selektioniert wurde, enthielt ein CpG-Motiv. Die Frage lag nahe, ob dieses Sequenzmotiv immunstimulatorisch aktiv ist und ob eine mögliche potente immunstimulatorische Aktivität auf eine verbesserte Aufnahme des Motivs in Zellen zurückzuführen ist. Da für die Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes ein minimaler Längenanspruch von 12 nt notwendig ist (Verthelyi *et al.*, 2001), die in den meisten Arbeiten eingesetzten Sequenzen jedoch eine Länge von 20 bis 24 nt haben, wurde hier ein Oligonukleotid verwendet, das viermal das Hexamermotiv enthielt (TM6₄). Analog hierzu wurden als Positiv- und Negativkontrollen auch 24mere eingesetzt.

Als Kontrollen für die zelluläre Aufnahme wurden die ODN ON ah2 und ON ah3 verwendet, die in der Selektion auf Aufnahme in BHK-21-Zellen keine verbesserte Aufnahme gezeigt hatten. Des Weiteren kamen zur Betrachtung der zellulären Aufnahme noch Derivate des ODN G3139 (ursprünglich entworfen als ein *Antisense*-ODN gegen *bcl-2* und gut charakterisiertes immunstimulatorisches ODN, (Jahrsdorfer *et al.*, 2002) mit TM6 als Transportmotiv am 3'-Ende zum Einsatz. Expression des Proteins *bcl-2* bewirkt eine Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapie-vermittelter Apoptose. Das *Antisense*-ODN G3139 befand sich bereits in klinischen Studien (Phase II und III). Seine Wirksamkeit ist jedoch vermutlich nicht auf einem *Antisense*-Effekt, sondern auf einen CpG-vermittelten, immunstimulatorischen Effekt zurückzuführen. So konnte gezeigt werden, dass das C^{Me}-Derivat der Sequenz seine Wirksamkeit einbüßte (Gekeler *et al.*, 2006). Diese Erkenntnisse über das ODN G3139 ließen es für diese Arbeit interessant erscheinen.

Als Positivkontrollen für den immunstimulatorischen Effekt wurden ODN 2006 und 2080-C₄ eingesetzt: ODN 2006 als Prototyp eines Klasse-B-ODN für Immunstimulation durch PTO-modifizierte ODN (Hartmann *et al.*, 2000b) und ODN 2080 (das am 5'-Ende das bislang wirksamste Sequenzmotiv für die Aktivierung humaner Zellen enthielt und durch einen *poly-C-tail* auf 24 nt ergänzt wurde) als Positivkontrolle für den Effekt durch unmodifizierte ODN (Hartmann *et al.*, 2000a;Krieg, 2002). Als Negativkontrollen für den immunstimulatorischen Effekt wurden NOV 2009-A₄ und verschiedene von TM6₄ abgeleitete ODN mit zerstörtem CpG-Motiv (TM6₄-C^{Me}, TM6₄-C/A^{del}) eingesetzt. Die Sequenzen der beschriebenen und weiterer nicht so häufig verwendeter ODN sind unter 2.1.9 aufgeführt.

Das in dieser Arbeit verwendete Modellsystem zur Untersuchung von immunstimulatorischer Aktivität verschiedener ODN war die B-Zelle. Zum Einsatz kamen sowohl die humane, B-lymphoide Zelllinie BJA-B, als auch primäre, humane B-Zellen als Bestandteil von frisch isolierten PBMCs.

Die Zelllinie BJA-B ist eine humane Burkitt-Lymphoma-Zelllinie (siehe 2.2.2.3) und bekannt durch CpG-Motive stimulierbar zu sein. Es handelt sich bei der Zellmorphologie um sphärische Zellen, die einzeln oder in kleinen Gruppen (engl: *cluster*) in Suspension vorkommen. In Kultur neigen die Zellen dieser Zelllinie jedoch unter bestimmten Bedingungen dazu, an den Flaschenboden zu adhären. Auf diese Besonderheit der Zelllinie soll unter 3.6 näher eingegangen werden.

PBMCs (engl: **p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells) gelten als Blutzellen mit rundlich geformten Nukleus (Lymphocyten und Monocyten) bestehend aus B-/T-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen. Physiologisch stellen diese Zellen kritische Bestandteile der Abwehr gegen Infektionen dar. Der Anteil der B-Zellen beträgt je nach *Donor* ca. 6%-12%. Im Kontext humaner PBMCs ist CpG-vermittelte Immunstimulation nicht nur direkt, sondern auch indirekt über DCs (engl: **d**endritic **c**ells) möglich (Hartmann *et al.*, 2003).

3.1 Untersuchung der Sequenz TM₆₄ auf verbesserte Aufnahme in BJA-B

Die Selektion von randomisierten Sequenzen auf verbesserte zelluläre Aufnahme wurde in BHK-21 Zellen, Nierenfibroblastenzellen aus Hamstern, durchgeführt. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob das so selektionierte Sequenzmotiv 5'-TCGTGT-3' auch in humanen B-lymphoiden Zellen zu einer verbesserten Aufnahme führt. Dazu wurde die zelluläre Aufnahme des ODN TM₆₄ mit zwei anderen Sequenzmotiven (ON ah2 und ON ah3) verglichen, die in der Selektion keine verbesserte Aufnahme gezeigt hatten. Hierzu wurde eine quantitative Analyse der intrazellulären ODN-Konzentration vorgenommen. Es wurden 100.000 BHK-21 Zellen pro *Well* einer 12-*Well*-Platte bzw. 200.000 BJA-B-Zellen pro *Well* einer 96-*Well*-Platte gemäß Kapitel 2.2.3.1 mit einer Endkonzentration von 1 µM der ODN für 44 Std. inkubiert. Im Anschluss daran wurden aus allen Proben Zelllysate hergestellt und die darin enthaltene ODN-Menge in einem Nukleaseschutz-Experiment (Overhoff *et al.*, 2004) gegen einen mitgeführten Standard quantifiziert (siehe 2.2.11).

Interessanterweise wurde bei der Zelllinie BHK-21 eine weit geringere absolute Aufnahme beobachtet als für die Zelllinie BJA-B (Abb. 3.1). Es war jedoch wichtig festzustellen, dass die relative Aufnahme innerhalb dieser Gruppe von drei ODN sehr ähnlich ist; was zeigt, dass die Selektion für sequenzabhängige, zellulärer Aufnahme, durchgeführt in BHK-21, auch relevant ist für BJA-B-Zellen.

Außer dem gleichen Muster der Aufnahme von ODN für beide Zelllinien wurde festgestellt, dass in beiden Fällen TM6₄ eine stärkere Aufnahme zeigte als die beiden Referenzoligonukleotide. Im Falle der B-lymphoiden Zelllinie BJA-B zeigte TM6₄ eine um den Faktor 3 verbesserte Aufnahme (Abb. 3.1).

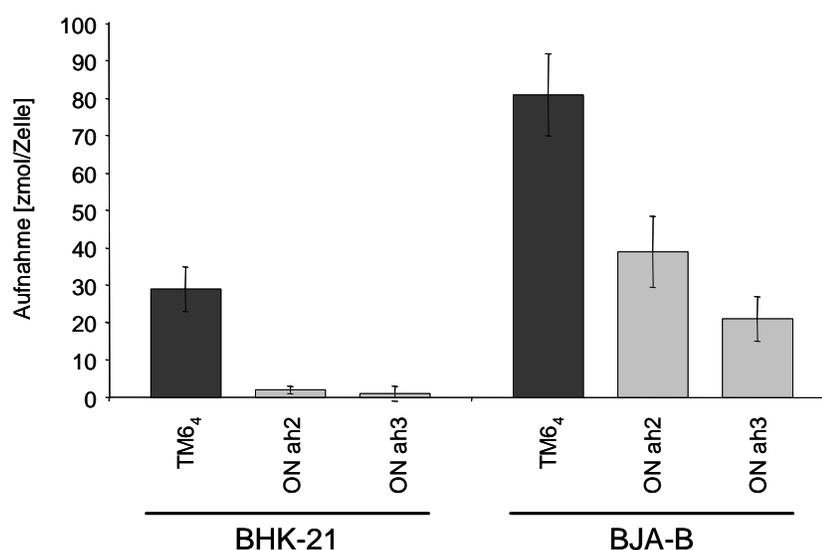


Abb. 3.1: Quantifizierung von intrazellulärer ODN-Menge nach Inkubation von BHK-21- und BJA-B-Zellen

100.000 BHK-21-Zellen bzw. 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 1 μ M der angegebenen ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und die ODN-Konzentration in den Zelllysaten bestimmt (siehe Kapitel 2.2.11). Angegeben ist die Menge an aufgenommenen ODN in Zweifachbestimmung in den jeweiligen Zelllinien. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

3.2 Untersuchung des Sequenzmotivs TM6₄ auf immunstimulatorische Potenz

Oligonukleotide, die ein CpG-Dinukleotid enthalten, induzieren die Expression einer Anzahl von Antigenen in humanen B-Zellen einschließlich CD80 und dem Adhäsionsmolekül CD54, auch bekannt als ICAM-1 (Jahrsdorfer *et al.*, 2002).

Die Anwesenheit eines CpG-Motivs in der für verbesserte Aufnahme selektierten Hexamersequenz führte zu der Vermutung, dass ein ODN mit diesem Sequenzmotiv immunstimulatorisch aktiv sein könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden BJA-B-Zellen mit einer Endkonzentration von 5 μM TM6₄ in Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. inkubiert und als Maß für den immunstimulatorischen Effekt die CD54-Expression auf den Zellen über Antikörperfärbung im Durchflusscytometer bestimmt (Kapitel 2.2.5 und 2.2.6). Das in Abbildung 3.2 gezeigte Diagramm stellt die Verteilung der Zellen gemäß der Intensitäten von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht dar. Der *Forward Scatter* ist ein Maß für die Größe und der *Sideward Scatter* ein Maß für die Granularität der Zellen.

Es wurde nur die CD54-Expression des über ein *Gate* selektierten Bereiches der intakten und nicht aggregierten Zellen berücksichtigt. Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente lag der Anteil an intakten Zellen bei über 85% aller analysierten Zellen.

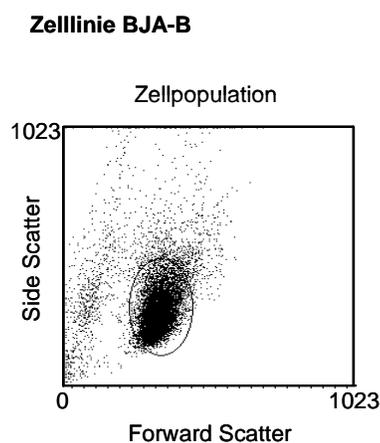


Abb. 3.2: Dotplot-Darstellung der für weitere Auswertungen verwendeten BJA-B-Subpopulation

Darstellung der BJA-B-Population im *Dotplot*-Diagramm. Der *Forward Scatter* zeigt die Größe und der *Sideward Scatter* die Granularität der Zellen. Die im *Gate* befindlichen Zellen wurden für die Analyse des Einflusses von ODN auf die CD54-Expression berücksichtigt

Es konnte gezeigt werden, dass TM6₄ in der Zelllinie BJA-B die CD54-Expression deutlich erhöht, was sich am deutlichsten bei einer Überlagerung (engl: *overlay*) von nicht stimulierten und stimulierten Zellen in *Histogrammplot*-Darstellung zeigt (Abb. 3.3 unten rechts). Der Mittelwert (engl: *mean value*) für die relative Fluoreszenz der Zellen, der für die Basalexpression von CD54 bei 110 relativen Einheiten lag, stieg durch die Stimulation mit TM6₄ auf einen Wert von im Mittel 410. Die Spezifität des CD54-Antikörpers wurde durch einen Isotyp-Antikörper kontrolliert und zeigte eine vernachlässigbar geringe Fluoreszenzintensität (unter 10 relativen Einheiten) für unspezifische Bindung (Abb. 3.3 oben links). Die Isotyp-Kontrolle wurde bei allen Experimenten mitgeführt.

Die Analyse der CD80-Expression unter diesen Versuchsbedingungen entsprach den Ergebnissen der Analyse von CD54. Allerdings konnte für CD80 insgesamt eine wesentlich geringere Expression auf den Zellen beobachtet werden. Der Mittelwert für die relative Fluoreszenz der Zellen lag für die Basalexpression von CD80 im Mittel bei 15 relativen Einheiten und stieg durch die Stimulation mit TM6₄ auf einen Wert von im Mittel 60 relativen Einheiten (Daten nicht gezeigt). Auch die Spezifität des CD80-Antikörpers wurde durch einen Isotyp-Antikörper kontrolliert.

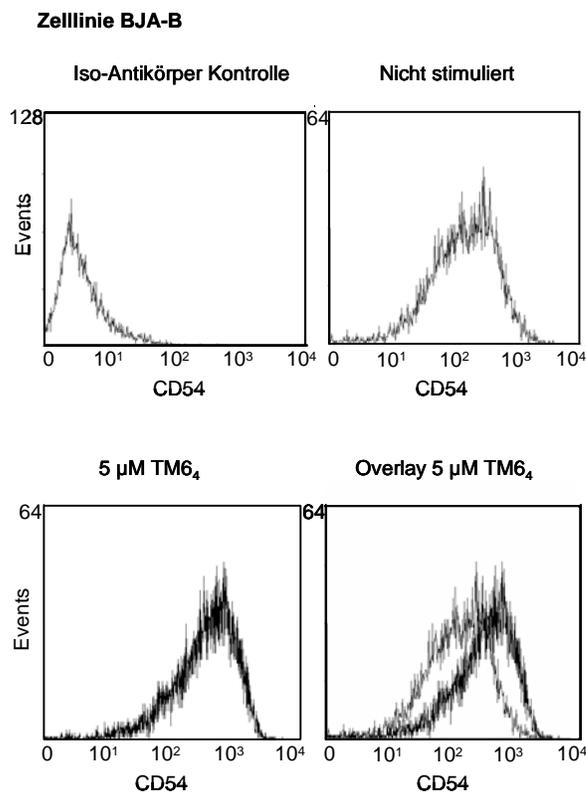


Abb. 3.3: ODN TM6₄ stimuliert CD54-Expression in BJA-B-Zellen

200.000 BJA-B-Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 5 µM des ODN TM6₄ inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die spezifische Färbung des Antikörpers wurde durch einen Isotyp-Antikörper kontrolliert (oben links). Gezeigt ist die Häufigkeit von Zellen mit gleicher Fluoreszenzintensität in *Histogrammplots*. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität durch Inkubation mit TM6₄ im Vergleich zu nichtstimulierten Zellen ist in einem *Overlay* gezeigt (unten rechts).

Der für die Zelllinie BJA-B gezeigte immunstimulatorische Effekt von TM6₄ konnte auch in humanen PBMCs bestätigt werden. Auch hier konnte eine deutliche Erhöhung der CD54-Expression der B-Zellen nach Stimulation beobachtet werden (Abb. 3.4 unten rechts). Bei der Betrachtung der CD54-Expression humaner PBMCs wurde nur die Population von intakten Lymphocyten dargestellt (Abb. 3.4 oben links). Für die Ermittlung der CD54-Expression wurden von dieser Population nur die CD19-positiven B-Zellen berücksichtigt.

Der Mittelwert für die Basalexpression von CD54 lag bei 35 relativen Einheiten und stieg durch die Stimulation mit TM6₄ auf einen Wert von im Mittel 120 relativen Einheiten. Auch in diesen Experimenten wurde die Spezifität der Antikörper gegen CD19 und CD54 jeweils durch einen Isotyp-Antikörper kontrolliert. Es zeigte sich auch hier eine vernachlässigbar geringe Fluoreszenzintensität für die unspezifische Bindung (Abb. 3.4 oben rechts).

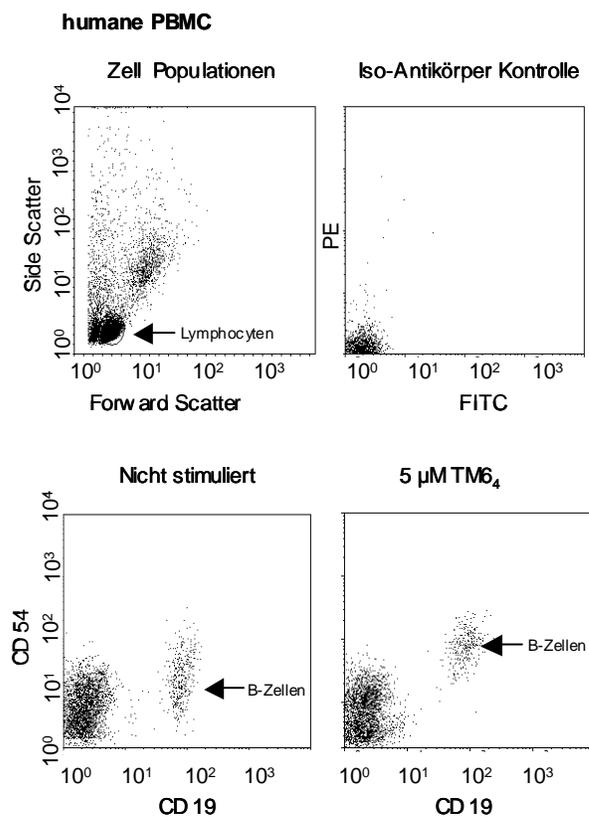


Abb. 3.4: ODN TM6₄ stimuliert CD54-Expression in primären B-Zellen als Bestandteil humaner PBMCs

200.000 PBMCs wurden mit einer Endkonzentration von 5 µM des ODN TM6₄ inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Es wurde nur die CD54-Expression der intakten Lymphocytenfraktion berücksichtigt (oben links). Die spezifische Färbung des Antikörpers wurde durch einen Isotyp-Antikörper kontrolliert (oben rechts). Gezeigt ist die relative Fluoreszenz in *Dotplot*-Diagrammen.

3.3 Charakterisierung der immunstimulatorischen Potenz von TM6₄

Ziel des zweiten Abschnitts der Arbeit war eine detaillierte Charakterisierung des von dem Sequenzmotiv TM6 ausgelösten immunstimulatorischen Effektes. Für diese Studien wurde weiterhin die CD54-Expression verwendet, um CpG-Stimulation in B-Zellen zu untersuchen. Zusätzlich wurden in den weiteren Experimenten Konzentrationsabhängigkeiten gemessen, um die immunstimulatorischen Effekte verschiedener ODN quantitativ vergleichen zu können. Arbeitsmodell waren erneut die humane Zelllinie BJA-B und primäre B-Zellen in humanen PBMCs.

3.3.1 Charakterisierung des Effektes von TM6₄ in der Zelllinie BJA-B

Zunächst wurde die Aktivierung der CD54-Expression von PTO-modifizierten und unmodifizierten ODN verglichen. Um die Spezifität des immunstimulatorischen Effektes bei PTOs zu beurteilen, wurden neben der Sequenz S-TM6₄ als Kontrollen die Sequenzen S-NOV 2009-A₄ (Negativkontrolle) und das Methyl-Cytosin-Derivat S-TM6₄-C^{ME} als weitere Kontrolle für die CpG-Spezifität eingesetzt (unterbrochene Linien in Abb. 3.5). Es ist evident, dass alle diese ODN zur Stimulation der CD54-Expression führten, die nicht von der Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids abhing. Konträr hierzu wurde bei der analogen Durchführung der Versuche mit unmodifizierten Deoxyribonukleotiden, zuzüglich der Positivkontrolle ODN 2080-C₄, eine klare Spezifität der CD54-Stimulation für die Anwesenheit eines unmodifizierten CpG-Motivs beobachtet (Abb. 3.5, durchgezogene Linie).

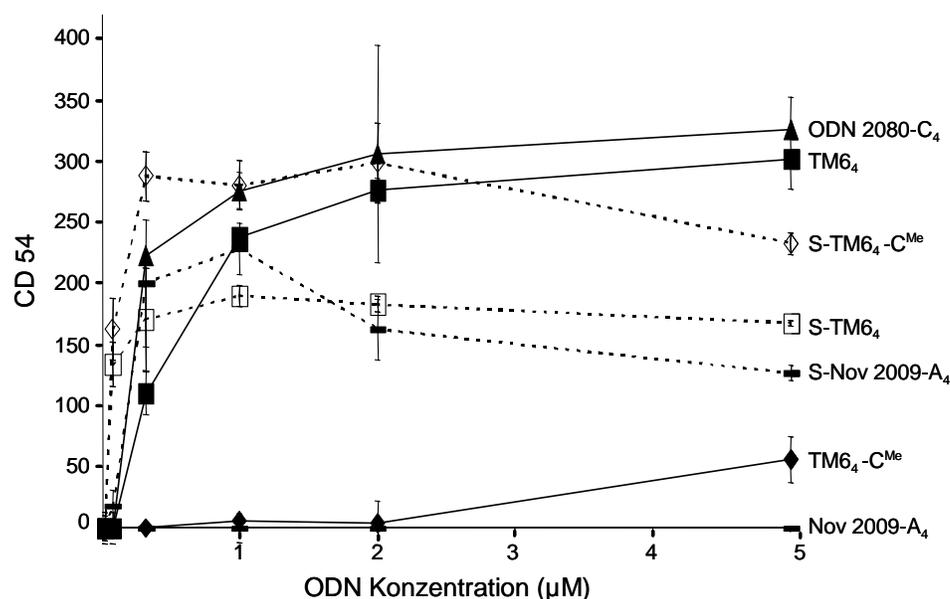


Abb. 3.5: Einfluss der PTO-Modifikation von ODN auf den immunstimulatorischen Effekt in BJA-B-Zellen

Konzentrationsabhängigkeit der CD54-Expression als eine Funktion der Sequenz von unmodifizierten oder PTO-modifizierten 24meren: ODN 2080-C₄ als Positivkontrolle, TM6₄ aus dieser Arbeit, ein C^{ME}pG Derivat von TM6₄ und NOV 2009-A₄ als Negativkontrollen. Um die Länge der ODN konstant zu halten, wurden ODN 2080 und NOV 2009 am 3'-Ende um vier Nukleotide verlängert. 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte bei PTOs als Einfachgabe nach Aussaat und bei unmodifizierten ODN in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5) Die Daten wurden mittels Durchfluscytometrie akquiriert. Die gezeigten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturexperiment eine Doppelbestimmung repräsentativ für mindestens drei durchgeführte Zellkulturexperimente.

Weiterhin wurde die Längenabhängigkeit des von dem Sequenzmotiv TM6 in BJA-B-Zellen ausgelösten Effektes mit einem Satz von PTO-modifizierten TM₆-Homologen untersucht. Eingesetzt wurden ein Monomer S-TM₆₁ (6mer), Dimer S-TM₆₂ (12mer), Trimer S-TM₆₃ (18mer) und so weiter. Während das 6mer bis zu einer Endkonzentration von 320 nM keinen Effekt auslöste, war eine Steigerung der CD54-Stimulation, vermittelt von dem 12mer und 18mer, zu beobachten. Alle ODN, die 18 Nukleotide lang, oder länger waren, zeigten maximale Stimulation. Weiterhin war eine Verlängerung der eingesetzten ODN invers korreliert zu der benötigten ODN-Konzentration für halb maximale Stimulation (Abb. 3.6).

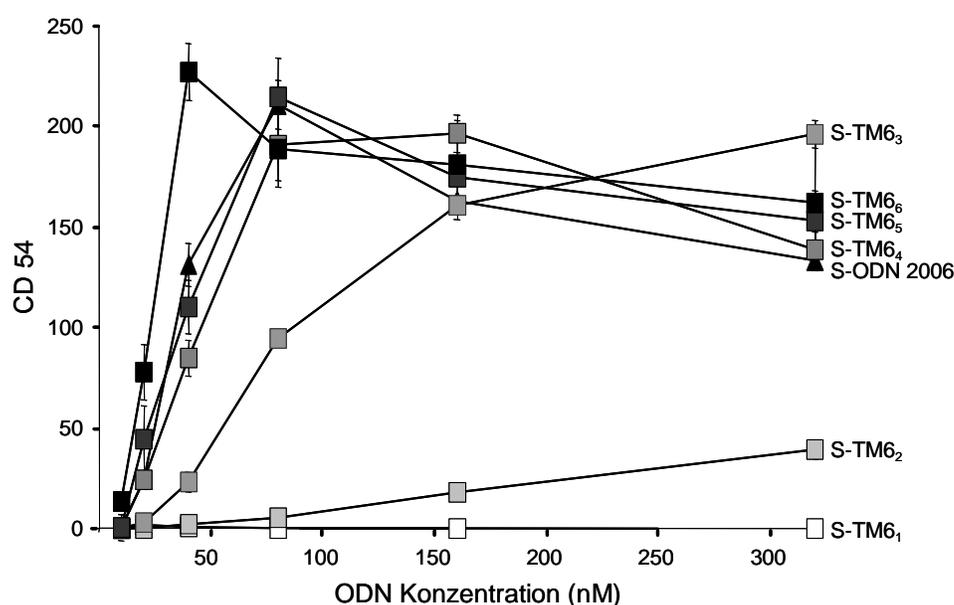


Abb. 3.6: Einfluss der Länge von ODN auf den immunstimulatorischen Effekt in BJA-B-Zellen

Konzentrationsabhängigkeit der CD54-Expression als eine Funktion der Länge von PTO-modifizierten Multimeren von S-TM₆: S-ODN 2006 als Positivkontrolle. 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe nach Aussaat der Zellen. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturexperiment in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Zellkulturexperimente.

Letztendlich wurde noch quantitativ die Effizienz von S-TM₆₄ und S-TM₆₆ versus der etablierten Positivkontrolle für PTO-modifizierte CpG-ODN, S-ODN 2006 und der etablierten Negativkontrolle S-NOV 2009 sowie zwei weiteren TM₆ Sequenzen mit zerstörten CpG-Motiven bestimmt.

In einem Fall wurde das Cytosin des CpG-Motivs ersetzt durch ein Adenosin, im anderen Fall wurde ein methyliertes Cytosin eingeführt. Dieser Vergleich zeigt klar eine starke CD54-Stimulation für PTO-modifizierte ODN in BJA-B-Zellen, die abhängig von der Sequenz der ODN ist, nicht aber von der Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids in der Sequenz. (Abb. 3.7).

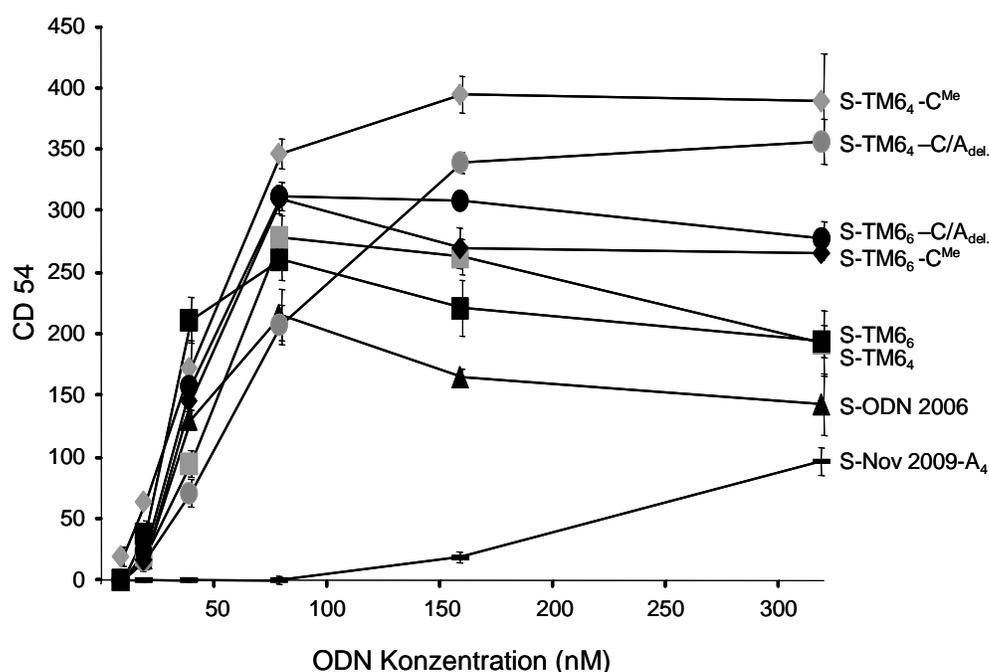


Abb. 3.7: Einfluss der Integrität des CpG-Dinukleotids auf den immunstimulatorischen Effekt in BJA-B-Zellen

Spezifität des Effektes auf die CD54-Expression für die Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids in der Sequenz, das entweder durch ein ApG-Dinukleotid oder ein C^{Me}pG ersetzt wurde für S-TM6₄ (24mer) und S-TM6₆ (36mer). 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe nach Aussaat der Zellen. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturerperiment eine Doppelbestimmung repräsentativ für vier unabhängige Zellkulturerperimente.

3.3.2 Charakterisierung des Effektes von TM6₄ in humanen PBMCs

Ziel des dritten Abschnitts der Arbeit war die Charakterisierung des von dem Sequenzmotiv TM6 ausgelösten immunstimulatorischen Effektes auf B-Zellen als Bestandteil von frisch isolierten, humanen PBMCs als naturnahem Modell.

In primären B-Zellen humaner PBMCs stimulierten alle getesteten PTO-modifizierten ODN schon bei geringen Konzentrationen mit halbmaximalen Effekten in der Größenordnung von 30 nM, wogegen die unmodifizierten ODN mit einem intakten CpG-Motiv eine konzentrationsabhängige CD54-Stimulation zeigten, die ihr maximales Niveau bei einer Endkonzentration von 5 μ M ODN erreichte. Das maximale CD54-Expressionsniveau war jedoch vergleichbar zu dem, was durch PTO-modifizierte ODN erreicht wurde. (Abb. 3.8). Es ist auffällig, dass die Negativkontrollen NOV 2009-A₄ und TM6-C^{Me} keine signifikante CD54-Stimulation verursachten, auch nicht bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen von 5 μ M. Dies war jedoch nicht der Fall für PTO-Derivate S-NOV 2009-A₄ und S-TM6-C^{Me} (Abb. 3.8).

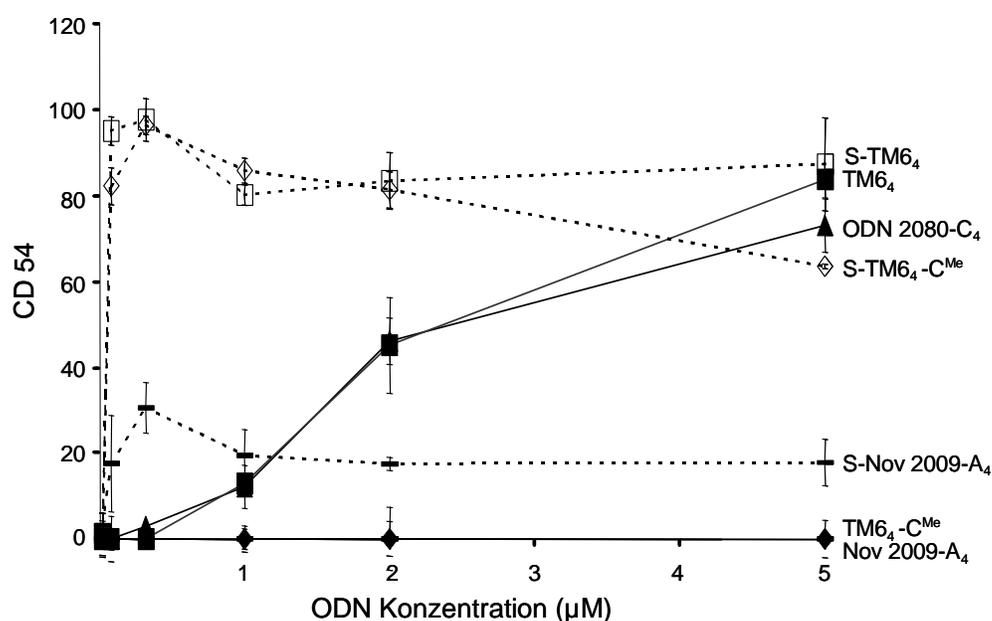


Abb. 3.8: Einfluss der PTO-Modifikation auf den immunstimulatorischen Effekt in PBMCs

Konzentrationsabhängigkeit der CD54-Expression als eine Funktion der Sequenz von unmodifizierten oder PTO-modifizierten 24meren: ODN 2080-C₄ als Positivkontrolle, TM6₄ aus dieser Arbeit, ein C^{Me}pG Derivat von TM6₄ und NOV 2009-A₄ als Negativkontrollen. Um die Länge der ODN konstant zu halten, wurden ODN 2080 und NOV 2009 am 3'-Ende um vier Nukleotide verlängert. 300.000 frisch isolierte PBMCs wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte bei PTOs als Einfachgabe nach Aussaat und bei unmodifizierten ODN in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19 (B-Zell-Marker) und CD54 inkubiert (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturexperiment in Doppelbestimmung repräsentativ für mindestens drei mit verschiedenen *Donoren* durchgeführte Experimente.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Effekte von TM6-enthaltenden 24meren auf die CD54-Expression von B-Zellen in frisch isolierten humanen PBMCs eine deutliche CpG-Spezifität für unmodifizierte Sequenzen zeigten.

Weiterhin war eine klare Längenabhängigkeit von TM6 Homologen zu beobachten. Es war bemerkenswert, dass TM6₄, ein 24mer, mit der selben Länge wie die Positivkontrolle für ein humanes immunostimulatorisches ODN (ODN 2080-C₄) bei hohen Konzentrationen potenter CD54-Expression stimulierte (Abb. 3.9).

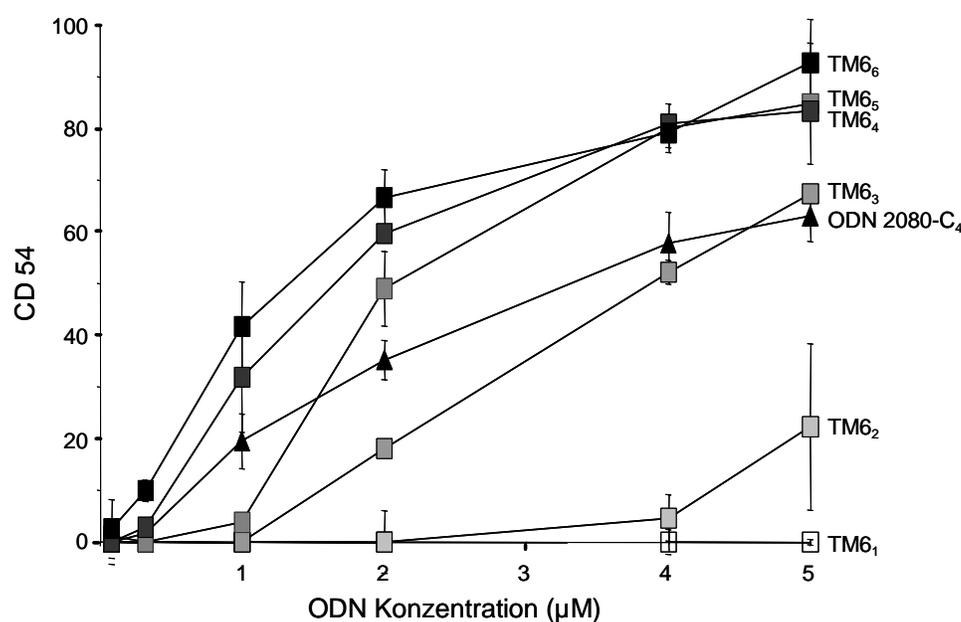


Abb. 3.9: Einfluss der Länge von ODN auf den immunstimulatorischen Effekt in PBMCs

Konzentrationsabhängigkeit der CD54-Expression als eine Funktion der Länge von unmodifizierten Multimeren von TM6: ODN 2080-C₄ als Positivkontrolle. 300.000 frisch isolierte PBMCs wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19 (B-Zell-Marker) und CD54 inkubiert (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturexperiment in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei mit verschiedenen *Donoren* durchgeführte Experimente.

In primären humanen B-Zellen ist die Spezifität der von TM6₄-vermittelten CD54-Stimulation für das CpG-Dinukleotid sehr hoch, da jede Art von Zerstörung (Substitution des Cytosins durch ein Adenosin oder Methylierung des Cytosins) den stimulatorischen Effekt aufhob (Abb. 3.10). Zum Vergleich mit einem typischen PTO wurde S-TM6₄ mitgeführt.

Wieder fiel auf, dass TM6₄ bei hohen Konzentrationen potenter CD54-Expression stimulierte als die Positivkontrolle ODN 2080-C₄.

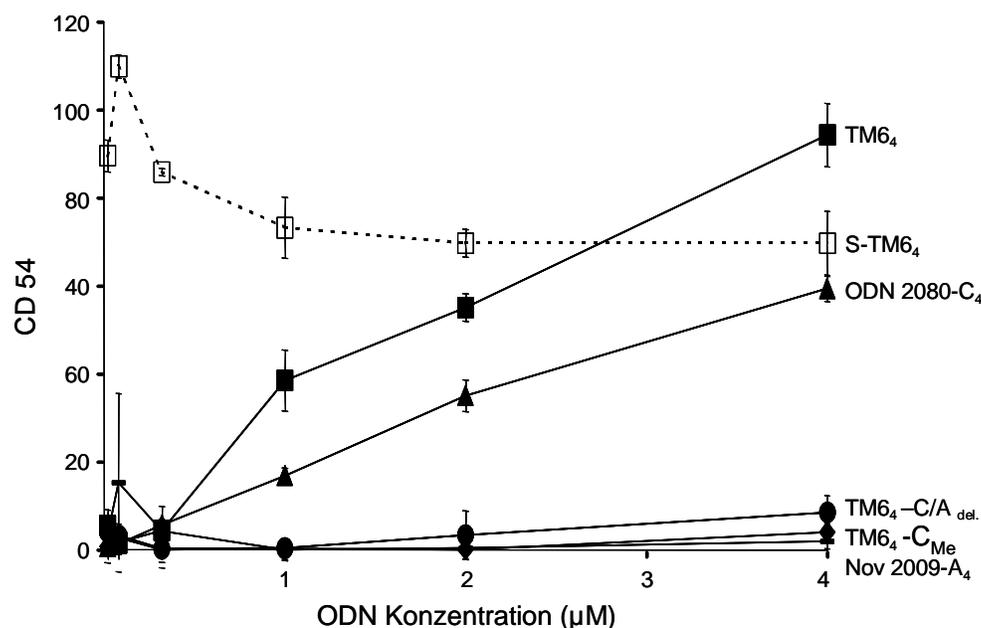


Abb. 3.10: Einfluss der Integrität des CpG-Dinukleotids auf den immunstimulatorischen Effekt in PBMCs

Spezifität des Effektes auf die CD54-Expression für die Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids in der Sequenz, das entweder durch ein ApG-Dinukleotid oder ein C^{Me}pG ersetzt wurde für TM6₄ (24mer). 300.000 frisch isolierte PBMCs wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte bei PTOs als Einfachgabe nach Aussaat und bei unmodifizierten ODN in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19 (B-Zell-Marker) und CD54 inkubiert (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturexperiment in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei mit verschiedenen *Donoren* durchgeführte Experimente.

Von unlängst veröffentlichten Studien kann eine Art von Positionseffekt für CpG-Sequenzmotive in einem gegebenen ODN abgeleitet werden. (Hartmann *et al.*, 2000a). Um dieses Phänomen im Zusammenhang mit dieser Arbeit zu untersuchen, in Hinsicht auf TM6₄-enthaltende ODN, wurden verschiedene Konstrukte entworfen, schematisch abgebildet in Abb. 3.11 A. Das Sequenzmotiv TM6₄ wurde am 5'Ende, in zentraler Position und am 3'Ende eines unmodifizierten 24mers platziert. Um den Einfluss von weiteren Anteilen der ODN zu verhindern, wurden die ODN durch das anfügen von Cytosinen auf eine Länge von 24 Nukleotiden gebracht. Cytosine scheinen nicht an der Vermittlung eines immunstimulatorischen Effektes beteiligt zu sein (Hartmann *et al.*, 2000a), wogegen bei

anderen Nukleotiden, beispielsweise Guanin-Resten, gezeigt werden konnte, dass sie in der Lage sind Immunstimulation zu vermitteln, im Falle der Poly-G-tails durch gesteigerte zelluläre Aufnahme (Lee *et al.*, 2000; Dalpke *et al.*, 2002; Bartz *et al.*, 2004).

In allen Fällen war ein signifikanter Verlust der immunstimulatorischen Effektivität verglichen mit der Tetramer-Sequenz TM6₄ zu beobachten. Dieser Effektivitätsverlust war jedoch am größten, wenn das Sequenzmotiv zentral oder am 3' Ende lokalisiert war, jedoch weniger stark bei einer Lokalisation am 5' Ende (Abb. 3.11 B).

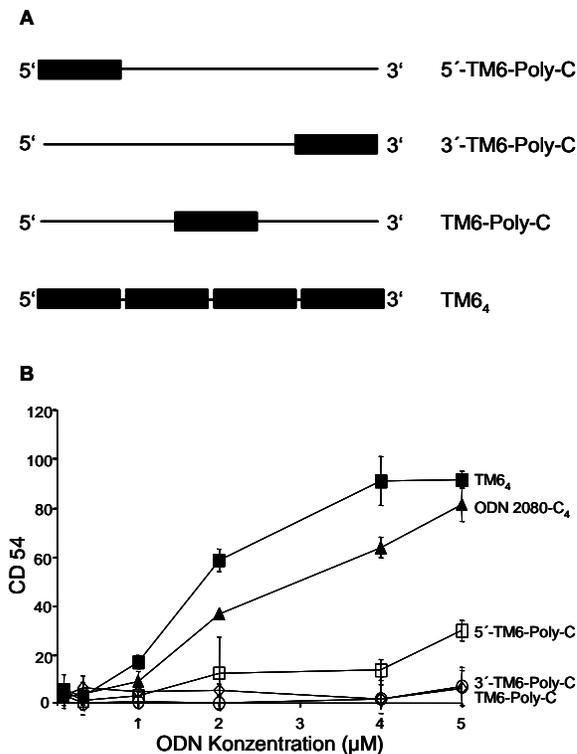


Abb. 3.11: Einfluss der Position des Sequenzmotivs TM6 auf den immunstimulatorischen Effekt in PBMCs

Positionseffekt von TM6 innerhalb der Sequenz eines 24mers. Das Hexamer-Motiv TM6 wurde entweder am 5'- oder 3'-Ende oder in zentraler Position innerhalb eines 24mers platziert. Als Kontrollen wurden TM6₄ and ODN 2080-C₄ eingesetzt. **A**, Schematische Darstellung der eingesetzten ODN **B**, 300.000 frisch isolierte PBMCs wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19 (B-Zell-Marker) und CD54 inkubiert (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturexperiment in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei mit verschiedenen *Donoren* durchgeführte Experimente.

In der Literatur wurde berichtet, dass das CpG-ODN ODN 2080, derzeit das als potenteste, immunstimulatorisch wirksame CpG-Motiv für das humane System beschrieben, in der Lage ist, eine verstärkte Proliferation von B-Zellen innerhalb humaner PBMCs zu verursachen (Hartmann *et al.*, 2000a). Es sollte überprüft werden, ob das Sequenzmotiv TM6 ebenfalls in der Lage ist einen ähnlichen Effekt auszulösen. Dazu wurden frisch isolierte PBMCs mit einer Konzentration von 5 μM der unmodifizierten und PTO-modifizierten Sequenz des ODN TM6₄, oder mit 5 μM ODN 2080-C₄ als Positivkontrolle und TM6₄-C^{Me} als Negativkontrolle inkubiert, um die Spezifität für das CpG-Motiv zu untersuchen.

Humane PBMCs wurden zunächst mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE inkubiert, dann wurden die ODN zugegeben, wie unter 2.2.4 beschrieben. Die CFSE-Fluoreszenz der CD19-positiven Lymphocytenfraktion wurde mittels Durchflusscytometrie gemessen (Abb. 3.12).

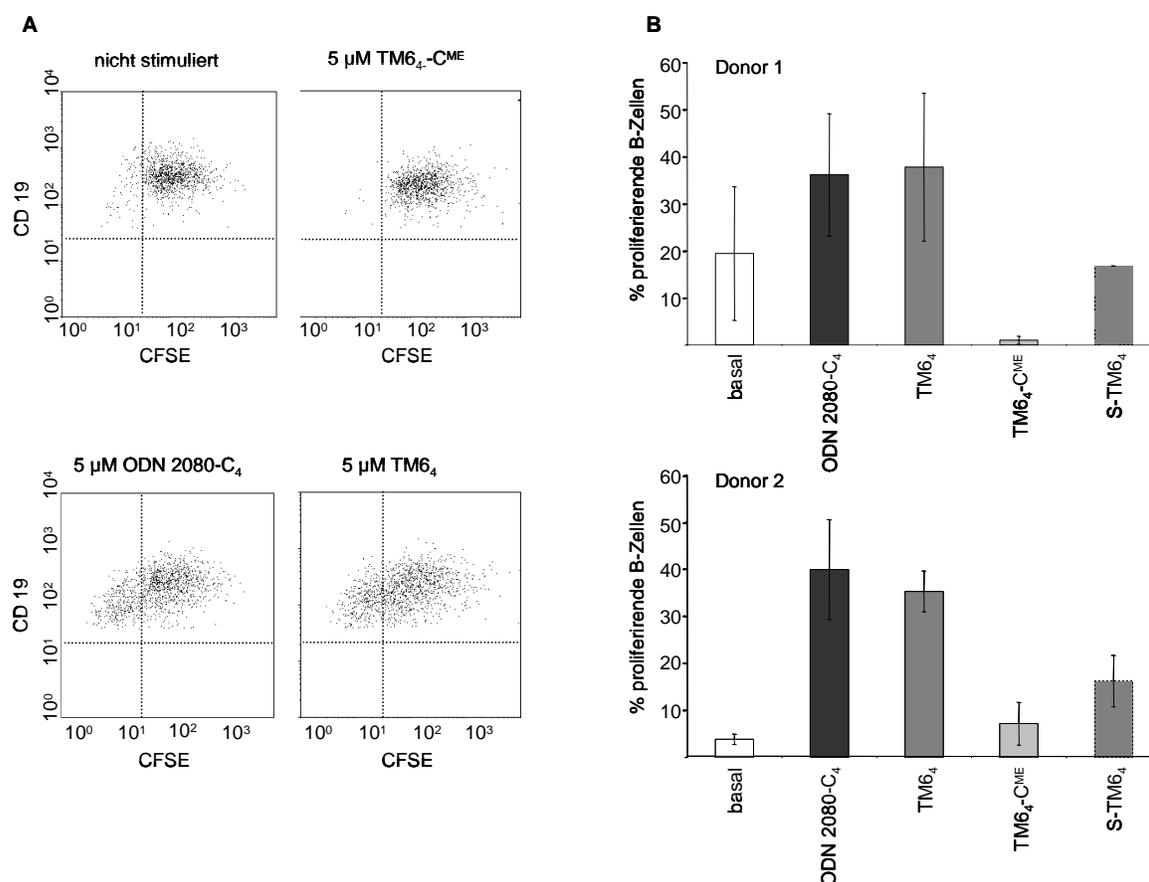


Abb. 3.12: TM6₄-induzierte Proliferation von humanen, primären B-Zellen

A, 300.000 frisch isolierte PBMCs wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE behandelt und anschließend mit einer Endkonzentration von 5 µM der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19 (B-Zell-Marker) inkubiert. Die Daten wurden mittels Durchflusscytometrie akquiriert. **B**, Auswertung der Daten für die CD19-positive Lymphocyten-Population der PBMCs in Prozent (siehe Kapitel 2.2.4). Die Werte zeigen den prozentualen Anteil an proliferierenden B-Zellen. Dargestellt sind zwei Zellkulturexperiment in Dreifachbestimmung durchgeführt mit PBMCs von zwei unterschiedlichen *Donoren*.

Dies Experiment zeigte, dass ODN 2080-C₄ und die unmodifizierte Sequenz TM6₄ vergleichbare Level an B-Zell-Proliferation induzierten, was sich darstellte durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität einiger Zellen, welche auf eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs auf die Tochterzellen bei stattfindender Zellteilung zurückzuführen ist (Abb. 3.12 A).

Interessanterweise zeigte das Thio-Derivat von TM6₄ (S-TM6₄) nur eine leichte Zunahme der proliferierenden B-Zellen (Abb. 3.12 B). Die Negativkontrolle TM6₄-C^{ME}, die ein methyliertes Cytosin in seinen CpG-Motiven enthielt, zeigte keinen Effekt auf die B-Zell-Proliferation. Es ist anzumerken, dass in allen Fällen, in denen verstärkte Zellproliferation beobachtet wurde, immer nur eine Subpopulation der CD19-positiven Lymphocyten-Fraktion eine Abnahme des Fluoreszenz-Signals zeigte. Eine quantitative Auswertung der Daten für den Effekt der ODN auf die B-Zell-Proliferation wurde mit Daten von zwei Experimenten in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die zwei unabhängigen Experimente wurden mit PBMCs zweier unterschiedlicher *Donoren* vorgenommen. Für diese Auswertung wurde der Anteil an B-Zellen quantifiziert, der sich nach Inkubation mit ODN linksseits der nicht mit ODN inkubierten Kontrollpopulation befand und als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl dargestellt. Nicht berücksichtigt wurden hierbei Zellen, die aufgrund starker CFSE-Färbung nach Teilung immer noch im Bereich der Population von Zellen mit durchschnittlichen CFSE-Gehalt lagen. Deshalb ist der angegebene prozentuale Wert für B-Zell-Proliferation eher ein zu gering eingeschätzter Anteil an Zellen im Vergleich zu der tatsächlich stattfindenden Proliferation. In beiden Fällen ergab sich eine verstärkte Proliferation bei Inkubation mit ODN 2080-C₄ and TM6₄, die bei ca. 40% der B-Zellen lag, die in verstärkte Proliferation übergingen. (Abb. 3.12 B). Im Falle des ersten *Donors* lag die Proliferation in der Anwesenheit von TM6₄-C^{Me} noch unter der basalen Proliferation, wogegen TM6₄-C^{Me} im Falle des zweiten *Donors* eine minimale Steigerung der Proliferation gegenüber nicht mit ODN inkubierten Zellen zeigte. Zusammenfassend war festzustellen, dass das basale Niveau von Zellproliferation zwar zwischen verschiedenen *Donoren* variieren kann, aber dass durch die Inkubation mit ODN 2080-C₄ and TM6₄ jedoch ähnliche prozentuale Anteile an B-Zellen mit gesteigerter Proliferation erreicht wurden.

3.3.3 Charakterisierung des Effektes von TM6₄ in humanen pDCs.

Es sollte noch eine Charakterisierung des immunstimulatorischen Effektes von TM6₄ in Bezug auf die Einteilung in eine der drei bisher beschriebenen Klassen von CpG-ODN (zusammengefasst in (Klinman, 2004) vorgenommen werden. Dazu wurde eine Bestimmung der IFN-alpha-Sekretion nach Inkubation von humanen pDCs mit verschiedenen ODN durchgeführt.

Hierbei wurden 40.000 pDCs in einem Volumen von 100 µl mit zwei verschiedenen Konzentrationen an ODN (3 µg/ml und 6 µg/ml) für 24 Std. inkubiert und anschließend die Konzentration von IFN-alpha im Überstand mittels ELISA bestimmt (siehe 2.2.7).

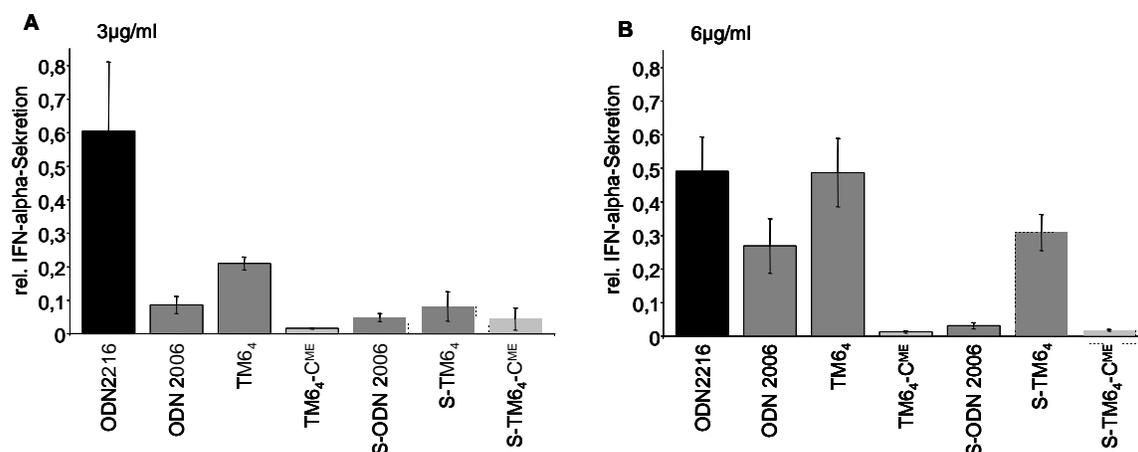


Abb. 3.13: IFN-alpha Sekretion von TM6₄-behandelten pDCs unterstützt Klasse B-Motiv

40.000 frisch isolierte pDCs wurden mit einer Endkonzentration von **A**, 3 µg/µl oder **B**, 6 µg/µl der angegebenen ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Nach 24 Std. wurde die Menge an IFN-alpha-Sekretion der pDCs durch Analyse der im Zellüberstand befindlichen Menge des Interferons mit Hilfe des Kits „human IFN-alpha Module Set“ (Bender MedSystems) bestimmt (siehe Kapitel 2.2.7) und gegen den gemessenen Basalwert korrigiert. Die Bestimmung der IFN-alpha-Sekretion erfolgte in Dreifachbestimmung. wurden die IFN-alpha-Sekretion der Zellen bestimmt. Dargestellt ist ein Zellkulturrexperiment in Dreifachbestimmung.

Als Positivkontrollen für den immunstimulatorischen Effekt wurden ODN 2216 und ODN 2006 eingesetzt: ODN 2216 als Prototyp eines Klasse-A-ODN, bekannt für die potente Induktion von IFN-alpha-Sekretion in pDCs und ODN 2006 als Prototyp eines Klasse-B-ODN. Als Negativkontrolle wurde das Derivat TM6₄-C^{Me} mit methyliertem CpG-Motiv eingesetzt. Die ODN kamen sowohl als unmodifizierte, als auch als PTO-modifizierte Sequenzen zum Einsatz. Die potenteste IFN-alpha-Sekretion wurde erwartungsgemäß durch das ODN 2216 erreicht (Abb.3.13 A). Das ODN TM6₄ zeigt im Vergleich die zeitpotenteste Induktion des Interferons, die bei dem Einsatz der höheren ODN Konzentration von 6 µg/ml das Niveau von ODN 2216 erreichte (Abb. 3.13 A und B). Das B-Klasse ODN 2006 führte hingegen zu der geringsten IFN-alpha-Produktion. Insgesamt wurde durch den Einsatz von unmodifizierten ODN eine höhere Induktion der IFN-alpha-Produktion der Zellen beobachtet als von den PTO-modifizierten Sequenzen (Abb. 3.13).

3.4 Charakterisierung der zellulären Aufnahme von TM6₄

Im vorangegangenen Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das für verbesserte Aufnahme selektionierte Hexamermotiv TM6 einen potenten immunstimulatorischen Effekt auf BJA-B-Zellen und B-Zellen in humanen PBMCs hat. Da nahe liegt, dass eine gesteigerte Aufnahme von CpG-ODN den durch sie ausgelösten immunstimulatorischen Effekt steigern kann (Dalpke *et al.*, 2002; Bartz *et al.*, 2004), wurde im Folgenden untersucht, ob der durch das Hexamer hervorgerufene immunstimulatorische Effekt auf die verbesserte Aufnahme des Sequenzmotivs zurückzuführen ist und ob eine direkte Korrelation zwischen dem erzielten Effekt und der zellulären Internalisierung besteht.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Aufnahme von ODN mit der Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids oder der chemischen Modifikation zusammenhängt. Dazu wurde quantitativ die Aufnahme der ODN TM6₄, TM6₄-C^{Me} und S-TM6₄ in Zellen untersucht. Als Modellsystem diente erneut die Zelllinie BJA-B. Die Charakterisierung des immunstimulatorischen Effektes der ODN ist in Abb. 3.5 gezeigt. Der Einfluss eines intakten CpG-Dinukleotids sollte durch den Vergleich der Aufnahme von TM6₄ und TM6₄-C^{Me}, bei dem Cytosin durch Methyl-Cytosin ersetzt sind, was zu einem Verlust der immunstimulatorischen Aktivität führt, gezeigt werden. Die Aufnahme wurde bei einer Konzentration der ODN von 5 µM gemessen, da bei dieser Konzentration der größte Unterschied in dem durch die ODN generierten immunstimulatorischen Effekt bestand (Abb. 3.5). Die Aufnahme wurde mittels eines radioaktivem *Hybridisierungssassays* anhand eines mitgeführten Standards von beispielsweise 100 fmol, 50 fmol und 10 fmol determiniert (siehe 2.2.11). Die Standardkurven der ausgewerteten Experimente wiesen eine lineare Beziehung zwischen eingesetzter Menge und Signal auf. Außerdem wurde in jedem Experiment eine Zellkontrolle mitgeführt, bei der den Zellen kein ODN zugegeben wurde, um mögliche Hybridisierungsprodukte mit genomischen Sequenzen der Zellen auszuschließen. Die Zellkontrolle wurde außerdem als Teil der Standardkurve in die Quantifizierung der aufgenommenen ODN-Menge mit einbezogen. Die Effizienz der Extraktion wurde anhand einer direkt hybridisierten Referenz-Menge (50 fmol in diesem Experiment) bestimmt und lag in allen Versuchen minimal bei 50%.

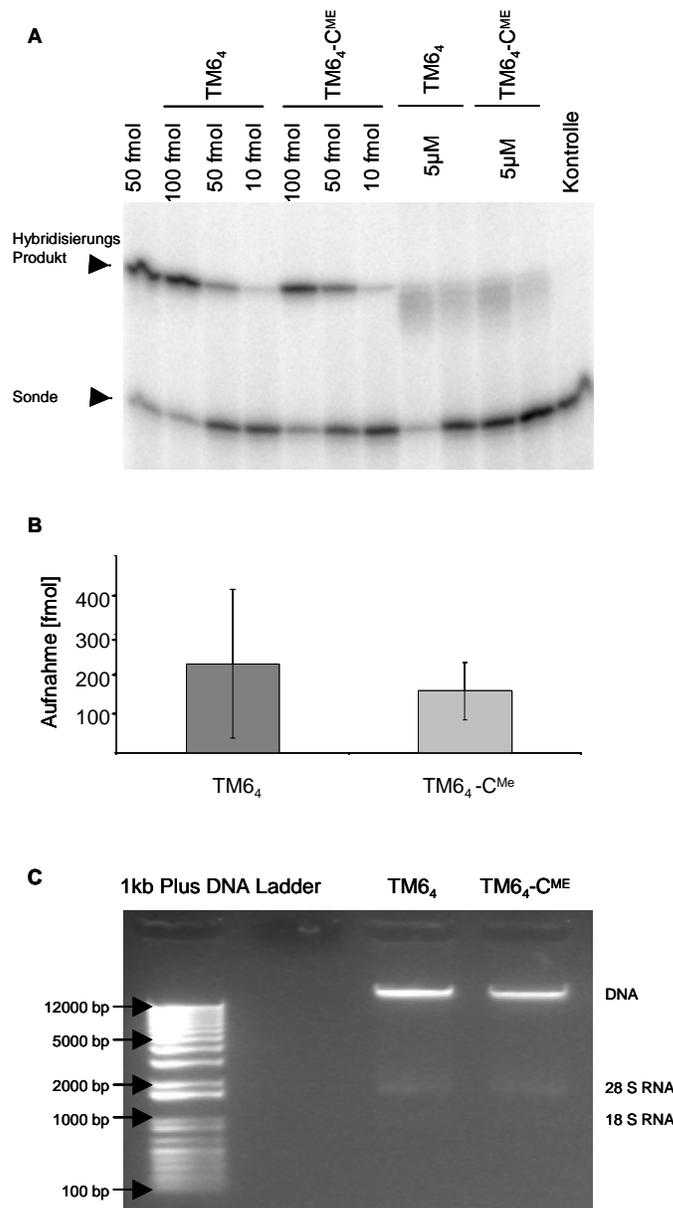


Abb. 3.14: Die Integrität des CpG-Dinukleotids hat keinen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme in BJA-B-Zellen

Untersuchung der Aufnahme in Abhängigkeit der Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids in der Sequenz, das durch ein C^{Me}pG ersetzt wurde für TM6₄. **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit der Endkonzentrationen von 5 μM der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nucleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). **B**, Auswertung der Daten: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für sechs Zellkulturexperimente in Doppelbestimmung. **C**, Qualitätskontrolle der Nucleinsäureextraktion auf einem Agarosegel: 2 μl der extrahierten Nucleinsäuren wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.1.2.1).

Die Integrität der extrahierten Nucleinsäuren wurden auf einem Agarosegel überprüft, um einen Einfluss von Degradation der Nucleinsäuren auf das Ergebnis des Experimentes zu überprüfen; beispielhaft gezeigt in Abb. 3.14 C. Zu sehen sind die extrahierten Nucleinsäuren, die sich bei einem pH-Wert des Phenols von 8,8 aus den sichtbaren Anteilen der Untereinheiten 28S und 18S ribosomaler RNA und aus einem Hauptanteil hochmolekularer DNA zusammensetzen.

Proben, bei denen sich Degradation der extrahierten Nukleinsäuren durch eine „Verbreiterung“ der Banden in den niedermolekularen Bereich zeigte, wurden für die weitere Auswertung nicht verwendet.

Des Weiteren wurde die Konzentration der extrahierten Nukleinsäuren mittels Spektralphotometrie bestimmt (siehe 2.2.1.1.2), um einen Einfluss von Unterschieden in der Extraktion auf das Ergebnis der nachfolgenden Hybridisierung auszuschließen (Daten nicht gezeigt). Abweichungen im Nukleinsäuregehalt waren in allen Experimenten geringer als 10%. Wie in Abbildung 3.14 B gezeigt, betrug die Menge an internalisierten ODN im Mittel ca. 200 fmol, was 6×10^5 Kopien/Zelle entspricht und es bestand kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme der zwei untersuchten ODN, obwohl sie zu sehr unterschiedlichen Effekten führten (Abb. 3.14 B und 3.5).

Um weiterhin den Einfluss einer Phosphorothioat-Modifikation des ODN-Rückrats auf die Aufnahme der ODN und eine Korrelation zwischen Internalisierung und ausgelöstem immunstimulatorischem Effekt zu untersuchen, wurde ein Vergleich der Aufnahme von ODN TM6₄ und dem modifizierten ODN S-TM6₄ angestellt.

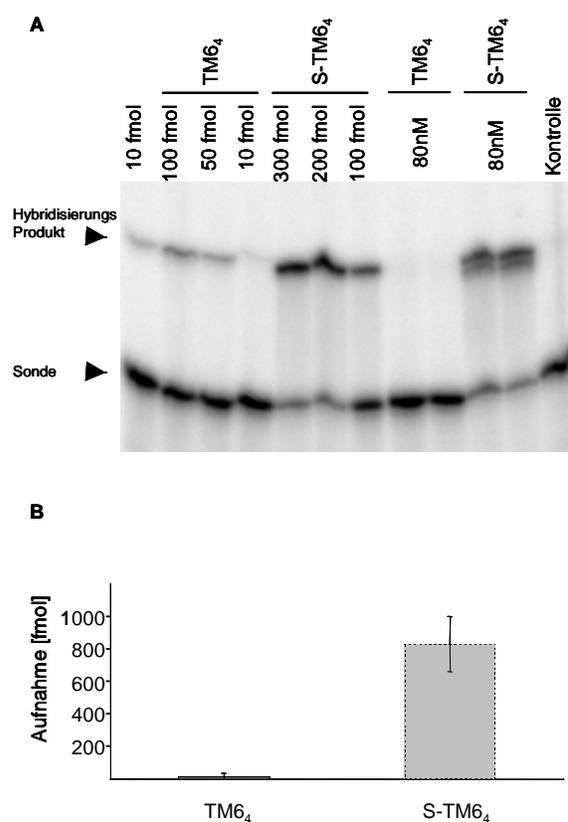


Abb. 3.15: Einfluss der PTO-Modifikation auf die zelluläre Aufnahme in BJA-B-Zellen bei 80 nM

Untersuchung der zellulären Aufnahme von ODN in Abhängigkeit einer Phosphorothioat-Modifikation des ODN-Rückrats, für TM6₄ (24mer). **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit den Endkonzentrationen von 80 nM der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). **B**, Auswertung der Daten: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei Zellkulturexperimente in Doppelbestimmung.

Es wurden wieder ODN Konzentrationen ausgewählt (80 nM und 5 μ M), bei denen der durch die beiden ODN ausgelöste Effekt den größten Unterschied aufwies (Abb. 3.5). Bei einer Endkonzentration von 80 nM war der durch das PTO-ODN ausgelöste Effekt 3,2-fach größer als der Effekt, der durch das unmodifizierte ODN hervorgerufen wurde.

Dahingegen war bei einer Endkonzentration von 5 μ M der durch das unmodifizierte ODN ausgelöste Effekt 1,5-fach größer als der Effekt, der durch das PTO-ODN hervorgerufen wurde. Wie in Abbildung 3.15 gezeigt, war die Aufnahme des PTO-ODN bei einer Konzentration von 80 nM deutlich effizienter als die der unmodifizierten Sequenz. So wurde 80-fach mehr S-TM₆₄ aufgenommen als TM₆₄.

Auch bei einer Inkubation mit einer Endkonzentration von 5 μ M der ODN war die Aufnahme des PTO-Derivates S-TM₆₄ 45-fach höher als die der unmodifizierten Sequenz (Abb. 3.16).

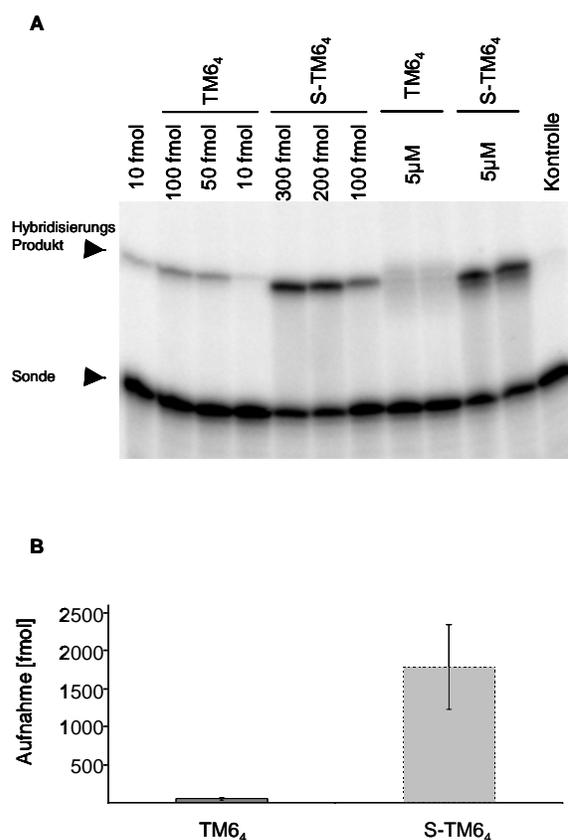


Abb. 3.16: Einfluss der PTO-Modifikation auf die zelluläre Aufnahme in BJA-B-Zellen bei 5 μ M

Untersuchung der zellulären Aufnahme von ODN in Abhängigkeit einer Phosphorothioat-Modifikation des ODN-Rückrats, für TM₆₄ (24mer). **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit den Endkonzentrationen von 5 μ M der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nucleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). **B**, Auswertung: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei Zellkulturexperimente in Doppelbestimmung.

Es konnte geschlussfolgert werden, dass die Aufnahme der ODN nicht direkt mit dem induzierten immunstimulatorischen Effekt korreliert ist, da die Aufnahme des PTO-ODN S-TM₆₄ in beiden Fällen weitaus höher war als die Aufnahme des unmodifizierten ODN (80-fach bei 80 nM und 45-fach bei 5 µM).

3.5 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen immunstimulatorischer Potenz und Aufnahme

Die vorangegangenen Experimente zur zellulären Aufnahme wurden mit zuvor erhobenen Daten für den immunstimulatorischen Effekt korreliert. Die in unabhängig durchgeführten Zellkulturexperimenten erhobenen Daten zeigten hohe Standardabweichungen zwischen den einzelnen Versuchstagen. Deshalb wurden im weiteren Experimente durchgeführt, bei denen gleichzeitig Immunstimulation und zelluläre Internalisierung untersucht wurden.

3.5.1 Konzentrations- und zeitabhängige Korrelation von Aufnahme und Effekt

Hier wurden konzentrations- und zeitabhängig die Korrelation zwischen Aufnahme und dem ausgelösten immunstimulatorischen Effekt untersucht. Die Sequenz TM₆₄ wurde als unmodifiziertes ODN, als Derivat, in dem das Cytosin der CpG-Dinukleotide durch Methylcytosin substituiert wurden, und als PTO-modifiziertes ODN S-TM₆₄ eingesetzt. Der durch diese ODN verursacht Effekt wurde wiederum über die CD54-Expression bestimmt wie in Abbildung 3.17 A gezeigt. TM₆₄ zeigte den maximalen Effekt bei einer Endkonzentrationen von 1 µM mit keinem weiteren Anstieg bis 5 µM. Das C^{Me}-substituierte ODN zeigte einen weit schwächeren Effekt, beruhend auf der Zerstörung des CpG-Dinukleotids. Das PTO-ODN erreichte die maximale Stimulation bei einer eingesetzten Endkonzentration von 80 nM. Die erreichte CD54-Expression wies jedoch ein niedrigeres Niveau auf als die der unmodifizierten Sequenz erreichte Stimulation.

Zum selben Zeitpunkt, zu dem die Daten für den immunstimulatorischen Effekt erhoben wurden, wurde auch ein Aufnahmeexperiment durchgeführt.

Durch die synchrone Inkubation der Zellen wurde erreicht, die gemessene Menge an internalisierten ODN direkt mit den für die Immunstimulation akquirierten Daten vergleichen zu können.

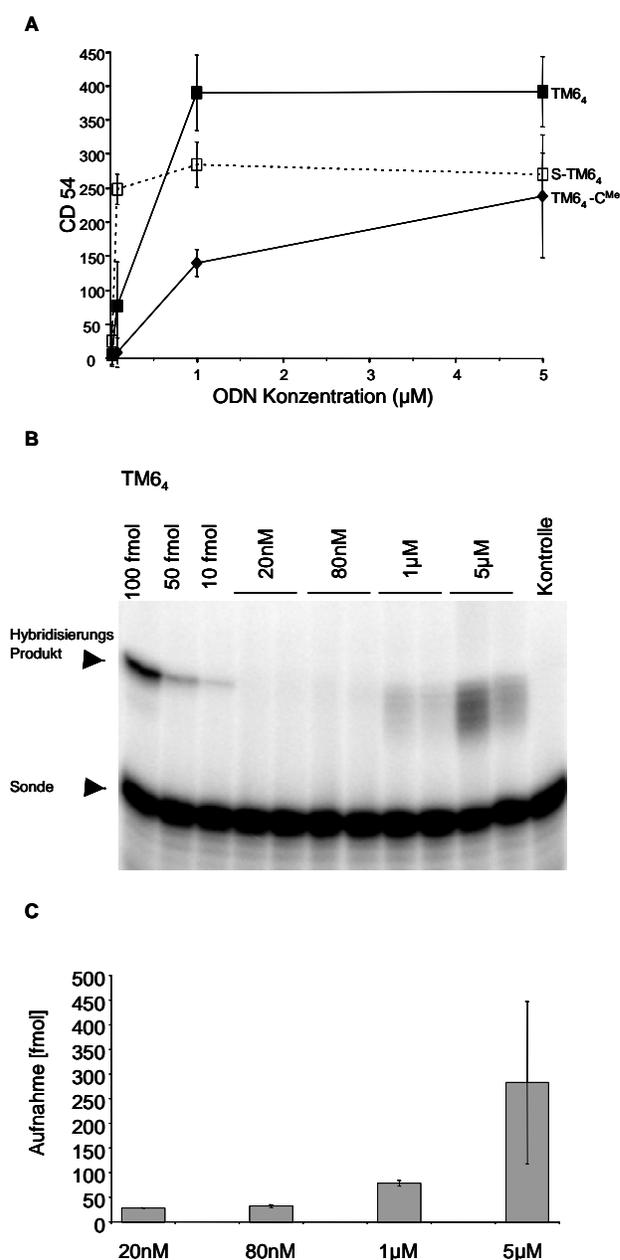


Abb. 3.17: Einfluss der extrazellulären Konzentration von ODN auf den immunstimulatorischen Effekt und auf die physikalische Aufnahme in BJA-B-Zellen

A, Konzentrationsabhängigkeit der CD54-Expression des ODN TM6₄ als unmodifizierte Sequenz, als Derivat, in der ein intaktes CpG-Dinukleotid durch ein C^{Me}pG ersetzt wurde und PTO-modifizierte Sequenz. 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte bei PTOs als Einfachgabe nach Aussaat und bei unmodifizierten ODN in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen die Mittelwerte von vier unabhängig durchgeführten Experimenten in Doppelbestimmung.

B, Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme des ODN TM6₄ als unmodifizierte Sequenz. 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). **C**, Auswertung: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen repräsentativ die Auswertung eines Zellkultur-Experimentes für vier in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

Im Falle der unmodifizierten Sequenz TM6₄ und der C^{Me}-substituierten Sequenz TM6₄-C^{Me} wurden vergleichbare Mengen an ODN über die verschiedenen Konzentrationen, mit denen die ODN inkubiert wurden, aufgenommen (Abb. 3.17 C und 3.18 B).

Die Aufnahme bei ODN Konzentrationen von 20 nM und 80 nM lag für beide ODN bei 15 fmol, was in etwa 1×10^5 Kopien/Zelle entspricht. Bei Endkonzentrationen von 1 μ M und 5 μ M zeigte die Aufnahme für TM6₄ and TM6₄^{Me} keine signifikanten Unterschiede, zeigte aber eine Steigerung analog zu den eingesetzten Konzentrationen. Die Aufnahme bei 1 μ M belief sich auf 50 fmol bis 100 fmol ($1,5 \times 10^4$ bis 3×10^4 Kopien/Zelle) und bei 5 μ M auf 200 fmol bis 480 fmol, was 6×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Kopien/Zelle entspricht (Abb. 3.17 C und 3.18 B). Eine gesteigerte Aufnahme des ODN TM6₄ zwischen den Konzentrationen von 1 μ M and 5 μ M führte nicht zu einer weiteren Steigerung der CD54-Expression (Abb. 3.17 A). Daraus wurde geschlossen, dass bei hohen Konzentrationen der Effekt gesättigt und keine weitere CD54-Expression mehr möglich ist.

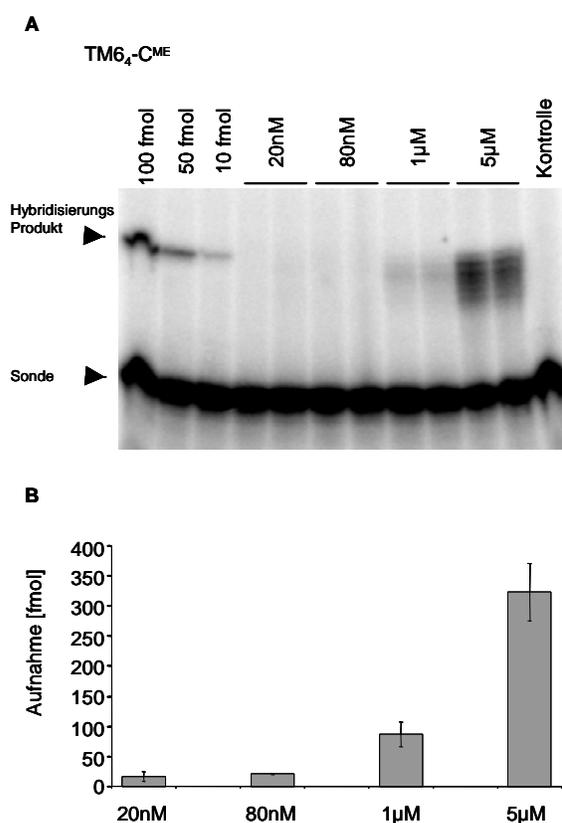


Abb. 3.18: Einfluss der extrazellulären Konzentration von TM6₄-C^{Me} auf die physikalische Aufnahme in BJA-B-Zellen

Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme des ODN TM6₄-C^{Me}. **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungsassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). **B**, Auswertung: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen repräsentativ die Auswertung eines Zellkulturexperimentes für vier in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

In Abbildung 3.19 ist die Aufnahme des PTO-modifizierten ODN S-TM6₄ gezeigt, das bei allen Konzentrationen eine weitaus höhere Aufnahme ergab, als die nicht PTO-modifizierten Sequenzen. Es wurde bei Inkubation mit einer Endkonzentration von 5 μ M eine maximale Aufnahme von 12000 fmol, was $3,5 \times 10^7$ Kopien/Zelle entspricht, erreicht.

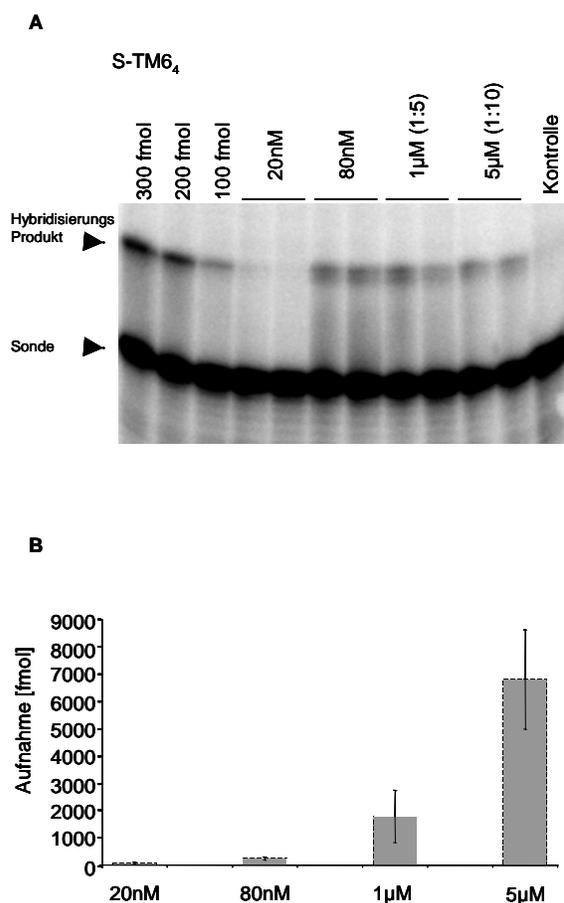


Abb. 3.19: Einfluss der extrazellulären Konzentration von S-TM6₄ auf die physikalische Aufnahme in BJA-B-Zellen

Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme des ODN TM6₄ als PTO-modifizierte Sequenz. **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe nach Aussaat der Zellen. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nucleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungsassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). Die extrahierten Nucleinsäuren der mit 1 µM ODN inkubierten Zellen wurden 1:5 verdünnt; die der mit 5 µM ODN inkubierten Zellen wurden 1:10 verdünnt. **B**, Auswertung der Daten: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen repräsentativ die Auswertung eines Zellkulturexperimentes für vier in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

Es wurde fortgefahren die zeitabhängige Korrelation von Aufnahme und induziertem immunstimulatorischen Effekt zu untersuchen mit den selben ODN, die zuvor für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit eingesetzt wurden. Für alle Experimente wurde eine Endkonzentration von 1 µM für die Inkubation mit dem ODN gewählt. Die Zeitabhängigkeit des immunstimulatorischen Effektes von ODN ist in Abbildung 3.20 A gezeigt. Die ODN TM6₄ und S-TM6₄ zeigten dasselbe Muster von CD54-Expression über die verschiedenen Zeitpunkte. Nach 25 Std. war kein weiterer Anstieg der CD54-Expression zu späteren Zeitpunkten zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Das C^{Me}-substituierte ODN TM6₄^{Me} zeigte ein signifikant schwächeren Anstieg der CD54-Expression über die Inkubationszeit.

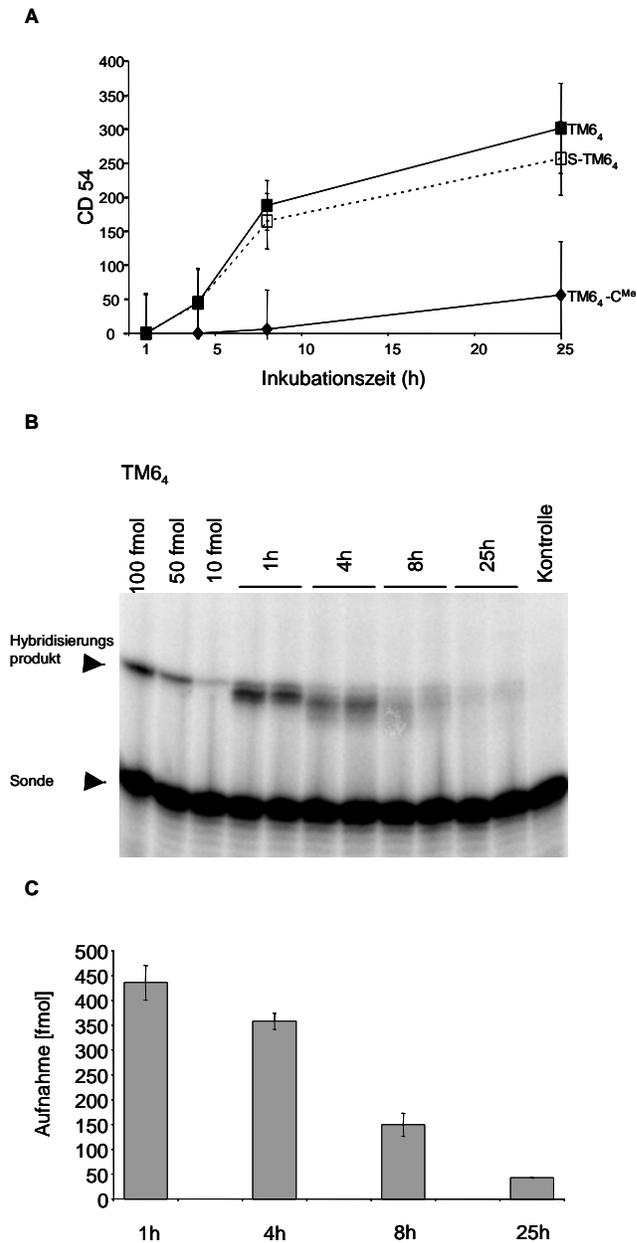


Abb. 3.20: Einfluss der Inkubationszeit von ODN auf den immunstimulatorischen Effekt und auf die physikalische Aufnahme in BJA-B-Zellen

Zeitabhängigkeit der CD54-Expression des ODN TM6₄ als unmodifizierte Sequenz, als Derivat, in der ein intaktes CpG-Dinukleotid durch ein C^{Me}pG ersetzt wurde und als PTO-modifizierte Sequenz. 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit einer Endkonzentrationen von 1 μM der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe für die angegebenen Zeiträume. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die gezeigten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen die Mittelwerte von vier unabhängig durchgeführten Experimenten in Doppelbestimmung.

Zeitabhängigkeit der Aufnahme des ODN TM6₄ als unmodifizierte Sequenz. **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit der Endkonzentrationen von 1 μM des ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe für die angegebenen Zeiträume. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). **B**, Auswertung der Daten: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen repräsentativ die Auswertung eines Zellkulturexperimentes für vier in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

Im Falle der nicht PTO-modifizierten ODN TM6₄ and TM6₄^{Me} konnte über die verschiedenen Inkubationszeiten für die Aufnahme der ODN keine Korrelation mit dem daraus resultierenden immunstimulatorischen Effekt festgestellt werden, da eine zeitabhängige Abnahme der nachgewiesenen ODN beobachtet wurde, die möglicherweise auf die Degradation der ODN in den Zellen zurückzuführen war (Abb. 3.20 C und 3.21 B).

Daher wurde beispielsweise nach einem Inkubationszeitraum von 25 Std. die niedrigste Konzentration an ODN in den Zellen nachgewiesen, wogegen jedoch nach 25 Std. der stärkste immunstimulatorische Effekt auf die Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 3.20 A).

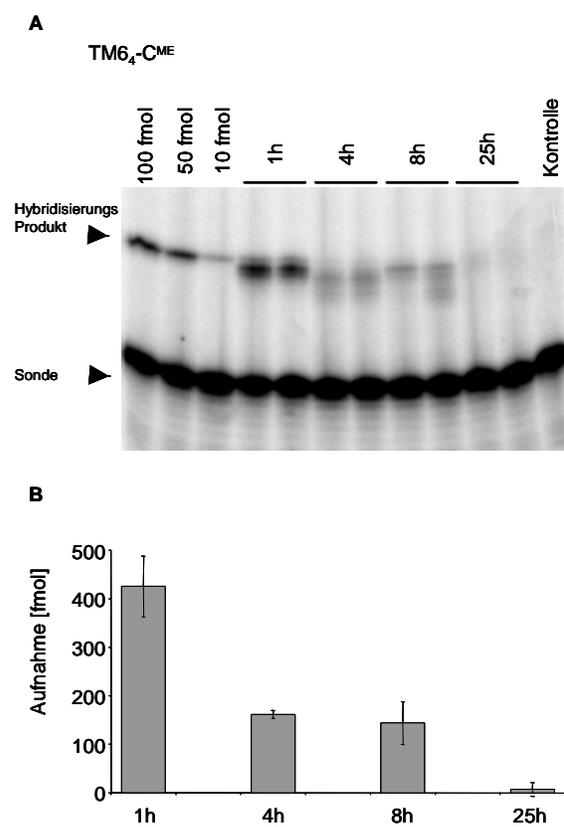


Abb. 3.21: Einfluss der Inkubationszeit mit TM6₄^{Me} auf die physikalische Aufnahme in BJA-B-Zellen

Zeitabhängigkeit der Aufnahme des ODN TM6₄ als Derivat, in der ein intaktes CpG-Dinukleotid durch ein C^{Me}pG ersetzt wurde. **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit den Endkonzentrationen von 1 μM des ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe für die angegebenen Zeiträume. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungsassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). **B**, Auswertung der Daten: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen repräsentativ die Auswertung eines Zellkultur-experimentes für vier in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

Die Aufnahme des durch seine Modifikation vor Nukleasen geschützten PTO-Derivates ODN S-TM6₄ war wiederum viel höher als die Aufnahme der nicht PTO-modifizierten ODN und zeigte außerdem keine zeitabhängige Abnahme der nachgewiesenen ODN-Konzentration innerhalb der Zellen. Die Menge an aufgenommenen ODN war vergleichbar für alle vier untersuchten Zeitpunkte und entsprach 4000 bis 6000 fmol, was 1×10^7 bis 2×10^7 Kopien/Zelle entspricht (Abb. 3.22 B). Dieselbe Menge an ODN wurde auch nach einer Inkubationszeit von einer Minute nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufnahme von PTO-modifizierten ODN sehr schnell abläuft, so dass anzunehmen ist, dass die Aufnahme nicht den *rate limiting step* für die Generation des immunstimulatorischen Effektes darstellt.

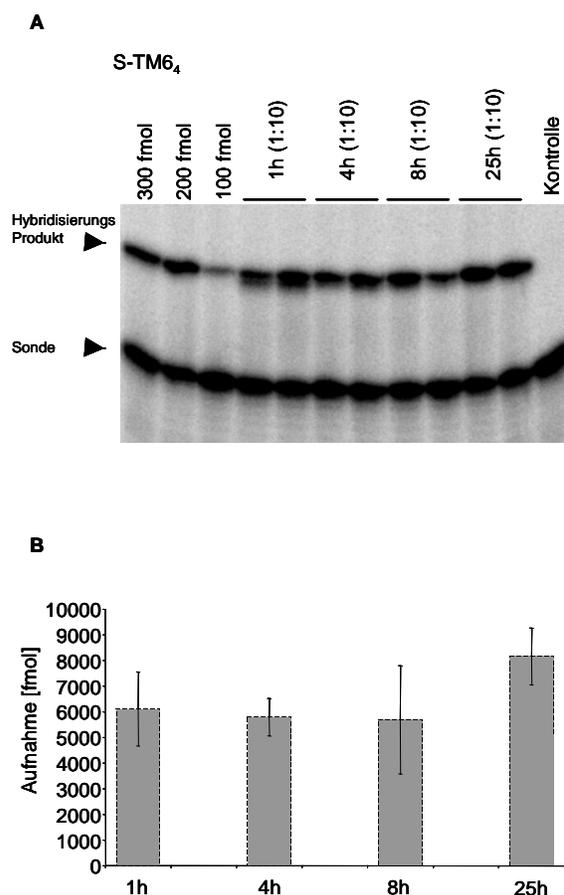


Abb. 3.22: Einfluss der Inkubationszeit mit S-TM₆ auf die physikalische Aufnahme in BJA-B-Zellen

Zeitabhängigkeit der Aufnahme des ODN TM₆ als PTO-modifizierte Sequenz. **A**, 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit den Endkonzentrationen von 1 μ M des ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe für die angegebenen Zeiträume. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). Die Proben für die Aufnahme von S-TM₆ zu verschiedenen Zeitpunkten wurden vor der Auftrennung auf einem PAA-Gel 1:10 verdünnt. **B**, Auswertung der Daten: die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen repräsentativ die Auswertung eines Zellkulturexperimentes für vier in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

3.5.2 Korrelation von Aufnahme und Effekt bei Nukleaseschutz

Überraschenderweise führte eine Koinkubation von immunstimulatorisch wirksamen CpG-ODN mit nicht wirksamen ODN zu einem verstärkten immunstimulatorischen Effekt. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Verstärkung des Effektes auf das als Koinkubator eingesetzten ODN zurückzuführen war, da diese in den eingesetzten Konzentrationen alleine keinen immunstimulatorischen Effekt verursachten (Daten nicht gezeigt).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise die Anwesenheit des Koinkubators die Aktivität von Nukleasen auf das wirksame CpG-ODN vermindert, so dass es durch die Anwesenheit von mehr CpG-ODN durch den Nukleaseschutz des non-CpG-ODN indirekt zu der Vermittlung eines potenteren Effektes kommt. Die gesteigerte CD54-Expression wäre demnach lediglich auf eine verlängerte biologische Halbwertszeit des aktiven CpG-ODN zurückzuführen.

Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde die Stabilität des immunstimulatorisch wirksamen CpG-ODN TM6₄ in Zellkulturmedium versetzt mit 10% FKS in der Anwesenheit und Abwesenheit eines nichtstimulatorischen ODN (NOV 2009-A₄) als Koinkubator bestimmt. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass der verbesserte immunstimulatorische Effekt tatsächlich auf einen durch die Anwesenheit des Koinkubators vermittelten Nukleaseschutz auf das wirksame CpG-ODN zurückzuführen war, da bei Koinkubation signifikant verminderte Degradation des wirksamen ODN TM6₄ beobachtet wurde (Abb. 23).

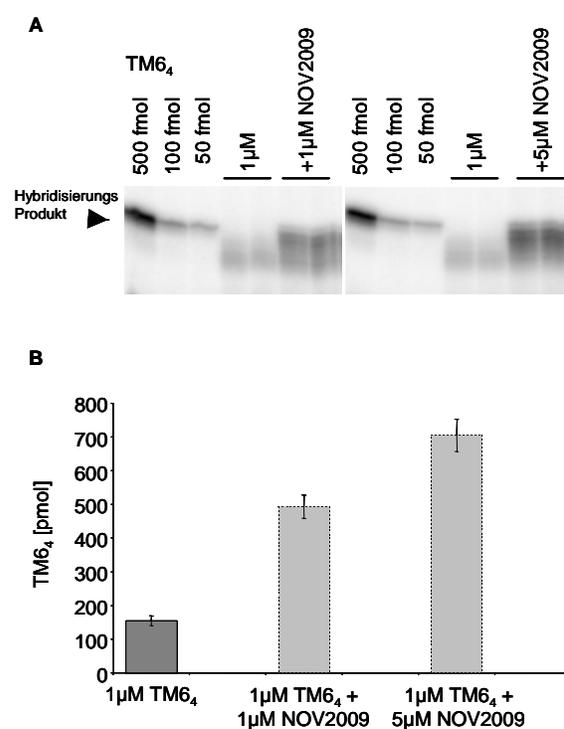


Abb. 3.23: Koinkubation von TM6₄ mit NOV 2009 erhöht die Stabilität von TM6₄ in Zellkulturmedium

Nukleasestabilität des ODN TM6₄. **A**, 1 μM TM6₄ wurde allein oder mit 1 μM bzw. 5 μM NOV 2009 in 200 μl Zellkulturmedium inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Nach 44 Std. wurden die Nucleinsäuren extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). Die Proben wurden vor der Auftrennung auf einem PAA-Gel 1:500 verdünnt **B**, Auswertung der Daten: die Bestimmung der Quantität des ODN TM6₄ wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert.

Es stellte sich die Frage, ob das Maß der größeren ODN-Menge durch den Nukleaseschutz des Koinkubators korreliert ist mit dem selben Maß an Erhöhung des immunstimulatorischen Effektes, der erzielt wird.

Wie in Abbildung 3.24 gezeigt, ist der immunstimulatorische Effekt von 80 nM TM6₄ mit Koinkubation von 3 μM NOV 2009-A₄ genauso groß wie der von 320 nM TM6₄ ohne Koinkubator verursachte Effekt. Dementsprechend führt eine Inkubation mit 80 nM TM6₄ und 3 μM NOV 2009-A₄ zu einer vergleichbaren Menge TM6₄ in den Zellen wie eine Inkubation mit 320 nM TM6₄ allein.

Diese Daten geben starke Evidenz, dass eine Korrelation zwischen der Menge an internalisiertem CpG-ODN in B-Zellen und dem induzierten immunstimulatorischen Effekt besteht.

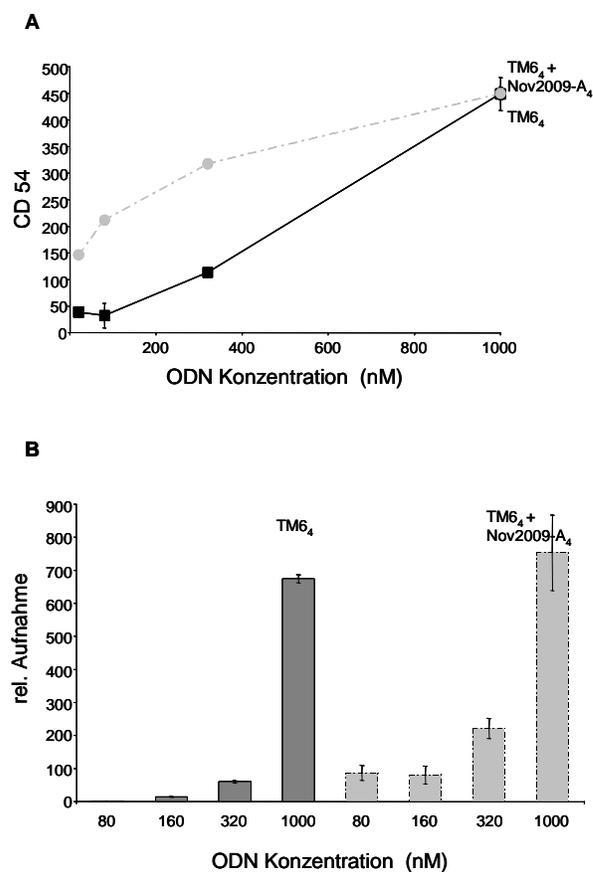


Abb. 3.24: Koinkubation mit NOV 2009 erhöht die intrazelluläre Konzentration und die CD54-Expression von TM6₄ in BJA-B-Zellen

200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen des ODN TM6₄ inkubiert und mit 3 μ M NOV 2009-A₄ koinkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet. **A**, Einfluss der Koinkubation mit NOV 2009-A₄ auf die CD54-Expression. Nach Ernte der Zellen wurde eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die gezeigten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkulturexperiment in Doppelbestimmung. **B**, Einfluss der Koinkubation mit NOV 2009-A₄ auf die intrazellulär nachzuweisende ODN-Menge. Nach der Ernte wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). Die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ein Zellkultur-Experiment in Doppelbestimmung.

Bei der Inkubation mit hohen Konzentrationen (1 μ M) von TM6₄ ist kein Unterschied mehr zwischen der Inkubation mit und ohne Koinkubator festzustellen, weder bei dem ausgelösten Effekt noch bei der Menge an intrazellulär nachgewiesenem TM6₄. Es ist also festzustellen, dass die Wirkung des Koinkubators auf intrazellulär nachgewiesene Menge an CpG-ODN und CD54-Expression nur in einem dynamischen Konzentrationsbereich (bis 320 nM) zu beobachten ist.

3.5.3 Einfluss des Sequenzmotives TM6₄ auf die ODN-Aufnahme

Das für verbesserte Aufnahme identifizierte Sequenzmotiv TM6₄ zeigte in dieser Arbeit einen potenten, immunstimulatorischen Effekt. Es sollte daher untersucht werden, ob diese immunstimulatorische Aktivität auf eine effizientere Aufnahme in Zellen zurückzuführen ist. Dazu wurden BJA-B-Zellen mit einer Endkonzentration von 1 µM TM6₄ und drei weiteren, aus der Selektion in BHK-21 stammenden Sequenzen (ON ah1, ON ah2 und ON ah3) inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Akquisition der Daten für CD54-Expression, ermittelt durch Durchflusszytometrie und für zelluläre Aufnahme, ermittelt über radioaktiven *Hybridisierungssassay* wieder simultan, um Aufnahme und Effekt der vier Sequenzen direkt vergleichen zu können.

Für die immunstimulatorische Aktivität der vier untersuchten ODN ergab sich ein Muster, in welchem TM6₄ eine um den Faktor 3,1 verstärkte CD54-Expression induzierte über dem Niveau basaler CD54-Expression (Abb. 25 A). Die anderen drei Sequenzen zeigten eine weit geringere immunstimulatorische Aktivität, obwohl eines von ihnen (ON ah2) dieselbe Anzahl an CpG-Dinukleotiden enthielt wie TM6₄. Die CD54-Expression des „Aufnahme-Motivs“ TM6₄ war beinahe dreifach (Faktor 2,8 für ON ah3) höher als die mittlere CD54-Stimulation der drei anderen Sequenzen. Im Aufnahme-Experiment wurde für die vier ODN ein vergleichbares Muster gefunden wie für die immunstimulatorische Aktivität (Abb. 25 B).

Dementsprechend konnte eine dreifach effizientere Aufnahme des ODN TM6₄ verglichen mit den drei anderen Sequenzen determiniert werden, übereinstimmend mit dem erhaltenen Faktor für verstärkte CD54-Expression. Diese Beobachtungen gaben eine starke Evidenz, dass der Faktor 3 an erhöhtem immunstimulatorischem Effekt induziert durch TM6₄ zurückzuführen ist auf denselben Faktor an effizienterer Internalisierung in die Zellen. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass in einem dynamischen Konzentrationsbereich die Aufnahme von ODN mit dem durch sie induzierten immunstimulatorischen Effekt korreliert ist.

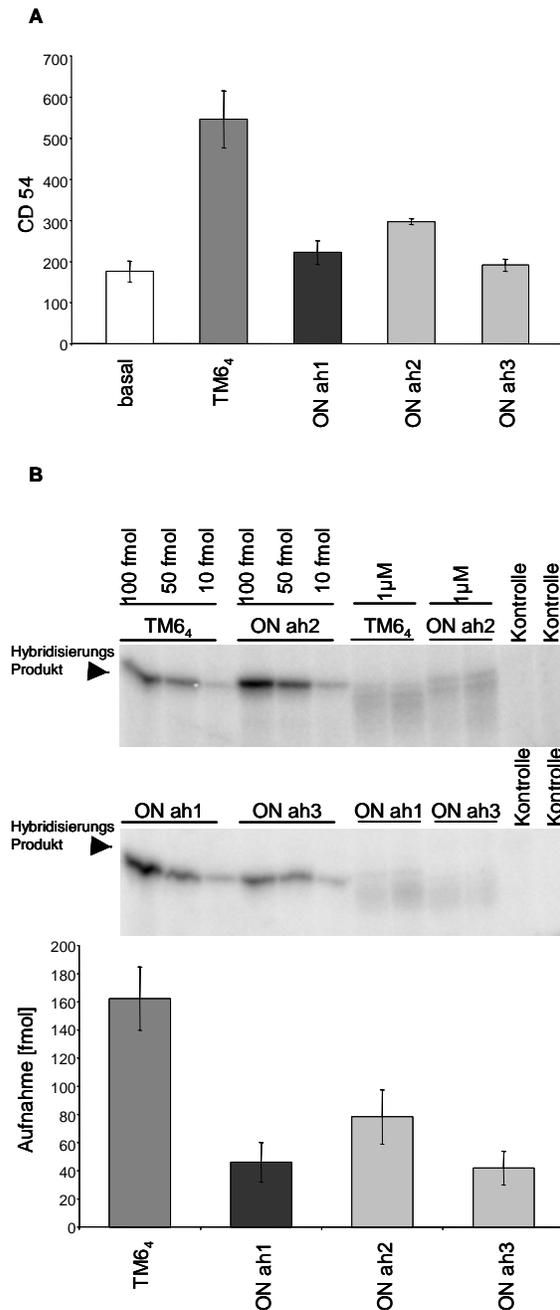


Abb. 3.25: Das ODN TM6₄ zeigt erhöhte zelluläre Aufnahme und CD54-Expression in BJA-B-Zellen

200.000 BJA-B-Zellen wurden mit der Endkonzentrationen von 1 μ M des ODN TM6₄ und drei weiteren aus der Selektion mit BHK-21-Zellen stammenden Sequenzmotiven inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifachgabe nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet. **A**, Abhängigkeit der CD54-Expression vom Sequenzmotiv. Nach Ernte der Zellen wurde eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5) Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die gezeigten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen die Auswertung eines Zellkultur-experimentes in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente. **B**, Abhängigkeit der intrazellulär nachzuweisenden ODN-Konzentration vom Sequenzmotiv. Nach der Ernte wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Die Nucleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungsassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). Die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen die Auswertung eines Zellkulturexperimentes in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurden die Aufnahme und immunstimulatorische Aktivität drei weiterer ODN G3139, G3139-157 and G3139-CH1 (Sequenzen siehe Tabelle 2.1) untersucht. Das ODN G3139, ursprünglich entworfen als ein *Antisense*-Oligonukleotid gegen *bcl-2*, ist ein gut charakterisiertes immunstimulatorisches ODN (Jahrsdorfer *et al.*, 2002).

Es wurden die voll PTO-modifizierte Sequenz von G3139 als Grundgerüst und zwei ODN mit einer 3'-angehängten, überwiegend unmodifizierten Sequenz von 10 Nukleotiden eingesetzt. Die Anhänge enthielten in einem Fall das Hexamer, identifiziert für verstärkte Aufnahme in Zellen (G3139-157) oder im anderen Fall eine Referenz-Sequenz (G3139-CH1). Es wurde im überwiegenden Teil der Sequenz (G3139) PTO-Modifikation eingesetzt, um einen potenten immunstimulatorischen Effekt, zurückzuführen auf die Rückrat-Modifikation, zu erreichen und den Einfluss der überwiegend unmodifizierten Sequenz des 10-Nukleotid-Anhangs auf die Immunstimulation zu minimieren.

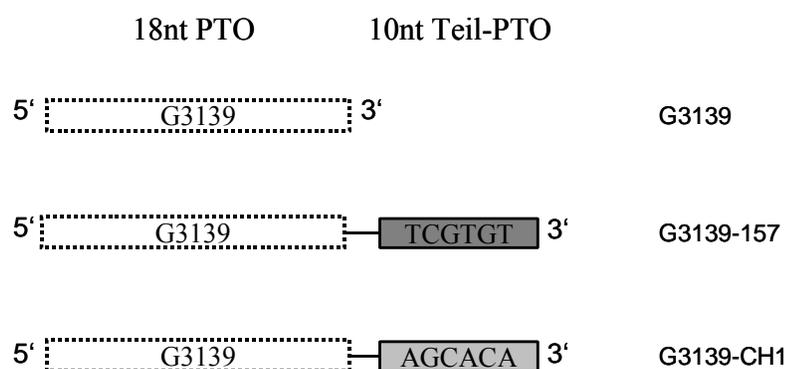


Abb. 3.26: Aufbau der entworfenen PTO-Chimeren

Schematische Darstellung der Struktur der eingesetzten ODN. Entwurf von Chimeren aus einem PTO-modifizierten Teil der Sequenz von G3139 (18 Nukleotide) und einem vorwiegend unmodifizierten Teil von 10 Nukleotiden Länge mit den Sequenzmotiven von Interesse: -157 als Positivkontrolle für ein Aufnahmemotiv und -CH1 als Negativkontrolle.

So sollte sichergestellt werden, dass ein möglicher Unterschied in der immunstimulatorischen Aktivität zwischen den ODN G3139-157 und G3139-CH1 der unterschiedlichen Aufnahme der beiden ODN zugerechnet werden könnte.

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen, führte die Verlängerung von G3139 um 10 Nukleotide in beiden Fällen zu einer verstärkten CD54-Expression verglichen mit G3139, jedoch zusätzlich zeigte G3139-157 eine signifikant höhere CD54-Expression als G3139-CH1 in einem dynamischen Konzentrationsbereich bis 320 nM. Es wurden daher die Konzentrationen 20 nM, 40 nM, 80 nM und 160 nM ausgewählt, um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen dem gesteigerten immunstimulatorischen Effekt und der zellulären Internalisierung von G3139-157, verglichen mit G3139-CH1, besteht.

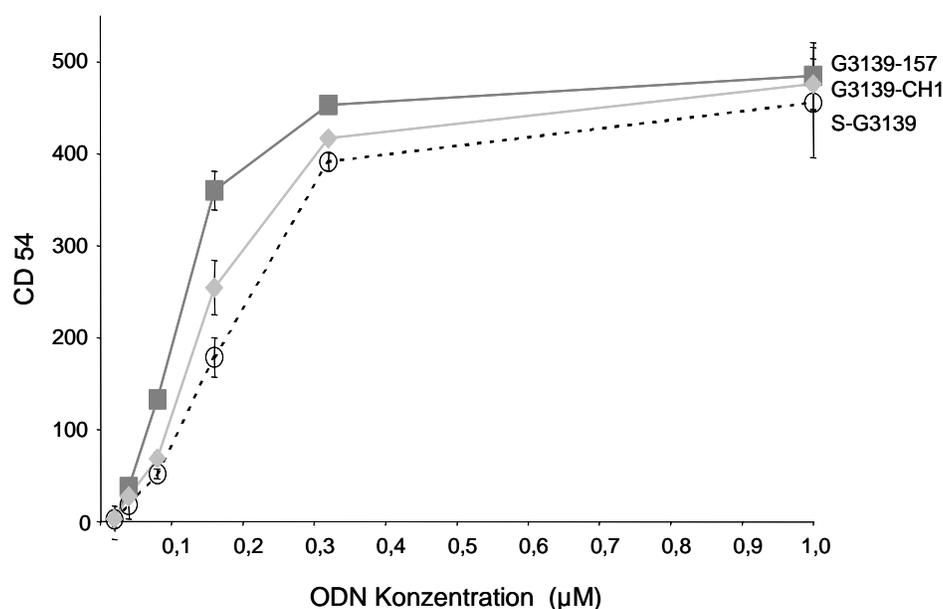


Abb. 3.27: Einfluss des Sequenzmotivs TM6 in Fusionskonstrukten auf die CD54-Expression in BJA-B-Zellen

Konzentrationsabhängigkeit der CD54-Expression als eine Funktion der Sequenz von Chimeren aus einem PTO-modifizierten Teil der Sequenz von G3139 und einem vorwiegend unmodifizierten Teil mit dem Sequenzmotiven von Interesse -157 als Positivkontrolle für ein Aufnahmemotiv und -CH1 als Negativkontrolle. 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe nach Aussaat der Zellen. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5) Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkultorexperiment eine Doppelbestimmung repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Zellkultorexperimente.

Es konnte über den untersuchten Konzentrationsbereich von 20 nM bis 160 nM eine konzentrationsabhängige Stimulation der CD54-Expression für beide ODN gezeigt werden (Abb. 3.28 A).

Analog dazu wurde auch eine Konzentrationsabhängigkeit der physikalischen Aufnahme für die intrazellulär nachgewiesenen ODN G3139-157 und G3139-CH1 gezeigt (Abb. 3.28 B). Beim Nachweis über die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde konnten bei beiden ODN Abbauprodukte beobachtet werden, die vermutlich durch Degradation der ODN innerhalb der Zellen während der 44-stündigen Inkubationszeit entstanden sind. Es wurden alle Abbauprodukte in die Quantifizierung mit einbezogen, da es sich auch hier um einst internalisierte ODN handelte.

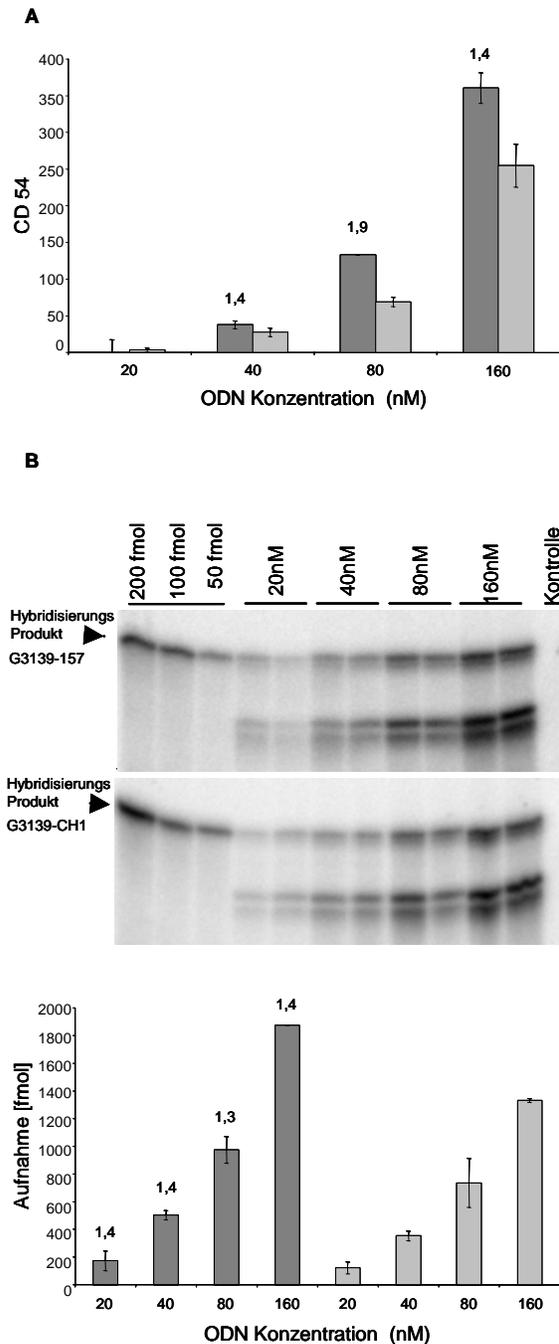


Abb. 3.28: Die Anwesenheit von TM6 in Fusionskonstrukten steigert CD54-Expression und physikalische Aufnahme

200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen von Chimeren aus einem PTO-modifizierten Teil der Sequenz von G3139 und einem vorwiegend unmodifizierten Teil mit dem Sequenzmotiven von Interesse: -157 (dunkle Balken) als Positivkontrolle für ein Aufnahmemotiv und -CH1 (helle Balken) als Negativkontrolle inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe nach Aussaat der Zellen. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet. **A**, Abhängigkeit der CD54-Expression vom Transportmotiv TM6. Nach Ernte der Zellen wurde eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen die Auswertung eines Zellkultur-Experimentes in Doppelbestimmung repräsentativ für drei in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente. **B**, Abhängigkeit der intrazellulär nachzuweisenden ODN-Menge vom Transportmotiv TM6. Nach der Ernte wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungsassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). Die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen die Auswertung eines Zellkulturexperimentes in Doppelbestimmung repräsentativ für drei in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

Zusammengenommen kann aus den in Abbildung 3.28 gezeigten Daten die Aussage abgeleitet werden, dass die Aufnahme von ODN G3139-157 in dem Konzentrationsbereich von 40 nM bis 160 nM ca. 1,5-fach höher ist, als die Aufnahme des ODN G3139-CH1 ohne „Aufnahme-Motiv“ und dass das Muster der Aufnahme der zwei verglichenen ODN streng korreliert ist mit dem ausgelösten immunstimulatorischen Effekt in BJA-B-Zellen.

Ein Einfluss des zusätzlichen CpG-Dinukleotids im 10-Nukleotid-Anhang von G3139-157 auf die Immunstimulation sollte durch ein weiteres Experiment ausgeschlossen werden. Hier wurde der immunstimulatorische Effekt und die Aufnahme von G3139-157 und einem weiteren ODN mit derselben Sequenz, in dem das Cytosin des zusätzlichen CpG-Dinukleotids durch ein Methylcytosin ausgetauscht wurde (G3139-157-C^{ME}), verglichen. Es bestand kein signifikanter Unterschied im immunstimulatorischen Effekt der beiden ODN mit intaktem oder Cytosin gegen Methylcytosin substituierten CpG-Dinukleotid (Abb.3.29). Durch dieses Experiment konnte so gezeigt werden, dass der Faktor 1,5 effizienterer CD54-Expression von G3139-157 *versus* G3139-CH1 allein auf die effizientere Aufnahme und nicht auf einen Einfluss des zusätzlichen CpG zurückzuführen ist.

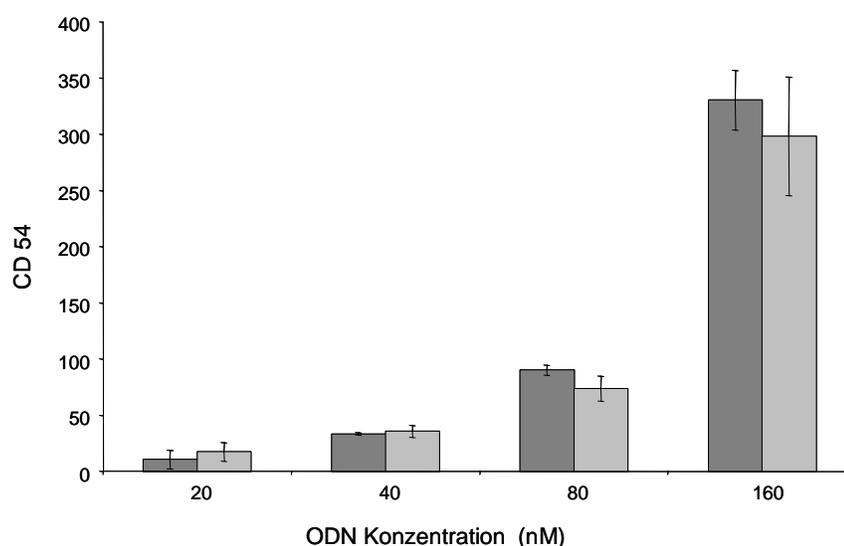


Abb. 3.29: Die Integrität des CpG-Dinukleotids hat keinen Einfluss auf die CD54-Expression durch PTO-Chimere

Spezifität des Effektes für die Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids in der Sequenz das durch ein C^{Me}pG ersetzt wurde: G3139-157 (dunkle Balken), G3139-157-C^{ME} (helle Balken). 200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe nach Aussaat der Zellen. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5) Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Die dargestellten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen ein Zellkultorexperiment eine Doppelbestimmung repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Zellkultorexperimente.

Die Aufnahme der ODN G3139-157 und G3139-157-C^{ME} zeigte keinen Unterschied bezüglich der internalisierten Menge der beiden ODN (Daten nicht gezeigt).

Zum Abschluss der Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von ODN und deren Korrelation mit dem immunstimulatorischen Effekt wurde das ODN TM6₄ dieser Studie mit dem bisher besten für das humane System beschriebenen CpG-ODN, dem ODN 2080 (Hartmann *et al.*, 2000a), verglichen. Um einen Einfluss der Länge der ODN auszuschließen, wurde das ODN 2080 um vier Cytosine auf die gleiche Länge von TM6₄ von 24 Nukleotiden verlängert (ODN 2080-C₄).

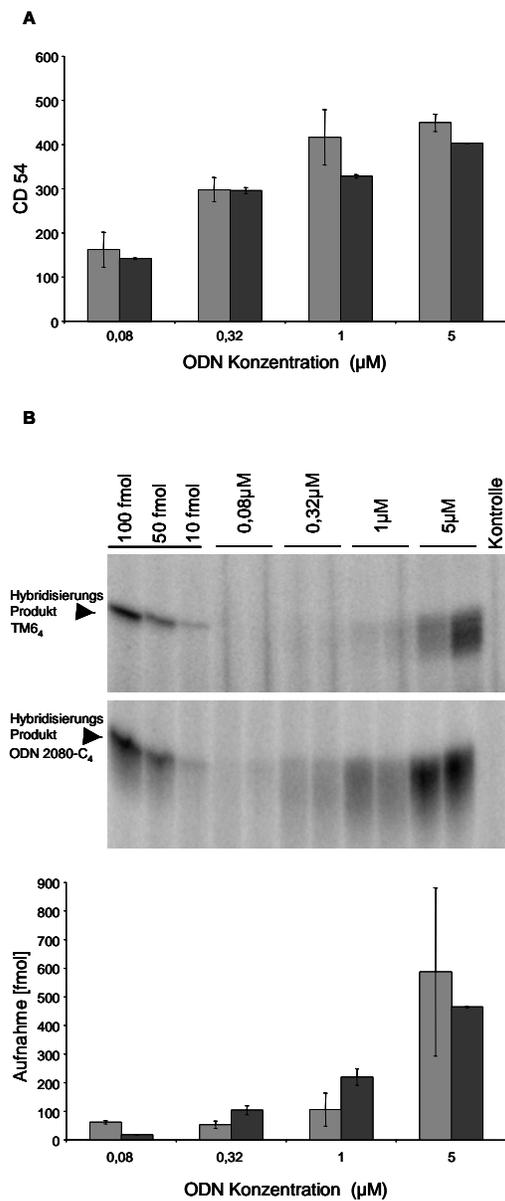


Abb. 3.30: Vergleich des immunstimulatorischen Effektes und der zellulärer Aufnahme von TM6₄ und ODN 2080-C₄ in BJA-B

200.000 BJA-B-Zellen wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN TM6₄ (helle Balken) und ODN2080-C₄ (dunkle Balken) inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte in einer Dreifache nach 0, 4 und 18 Std. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet. **A**, Abhängigkeit der CD54-Expression vom Sequenzmotiv. Nach Ernte der Zellen wurde eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5) Die Daten wurden mittels Durchflusscytometrie akquiriert. Die gezeigten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen die Auswertung eines Zellkulturexperimentes in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente. **B**, Abhängigkeit der intrazellulär nachzuweisenden ODN-Konzentration vom Sequenzmotiv. Nach der Ernte wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und der Nachweis durch einen radioaktiven *Hybridisierungssassay* durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.11). Die Aufnahme der ODN wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve determiniert. Die Daten zeigen die Auswertung eines Zellkulturexperimentes in Doppelbestimmung repräsentativ für zwei in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente.

Es konnte über den untersuchten Konzentrationsbereich von 80 nM bis 5 μ M eine konzentrationsabhängige Stimulation der CD54-Expression für beide ODN (Abb. 3.30 A) sowie auch eine konzentrationsabhängige Aufnahme für die ODN TM6₄ und ODN 2080-C₄ gezeigt werden (Abb. 3.30 B). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied weder in der immunstimulatorischen Potenz noch in der Menge an intrazellulär nachgewiesenen ODN zwischen den zwei untersuchten Sequenzen festgestellt werden (Abb. 3.30).

3.5.4 Zwischenfazit zur Bedeutung der zellulären Aufnahme für ODN für CpG-vermittelte Immunstimulation

Um eine Schlussfolgerung zu ziehen aus den durchgeführten Versuchen zur Korrelation der zellulären Aufnahme von CpG-ODN *versus* deren immunstimulatorischen Effekt können folgende Feststellungen abgeleitet werden:

Die Aufnahme von ODN in B-Zellen ist sequenzabhängig. Evidenz hierfür lieferten die Versuche zum Vergleich der Aufnahme und des Effektes von TM6₄ mit drei anderen Sequenzen (Abb. 3.25) und die Versuche mit G3139-Derivaten (Abb. 3.28).

Wenn ein ODN ein wirksames, intaktes CpG-Motiv besitzt, dann führt eine gesteigerte zelluläre Aufnahme zu einem gesteigerten immunstimulatorischen Effekt, wobei diese beiden Parameter streng korreliert sind (eine gesteigerte Aufnahme um den Faktor 1,5 führt auch zu einem um den Faktor 1,5 gesteigerten Effekt). Evidenz hierfür lieferten die Versuche zum Nukleaseschutz von TM6₄ durch Koinkubation mit unwirksamen ODN (Abb. 3.24) und die Versuche mit G3139 Derivaten (Abb. 3.28). Dies gilt jedoch nur in einem dynamischen Konzentrationsbereich, in dem sich der immunstimulatorische Effekt nicht in der Sättigung befindet.

Diese Korrelation von Aufnahme und ausgelöstem immunstimulatorischem Effekt trifft jedoch nicht zu beim Vergleich von ODN gleicher Sequenz mit intaktem und zerstörtem CpG-Motiv. Da hier eine vergleichbare Aufnahme trotz prägnant unterschiedlichem Effekt beobachtet wurde (Abb. 3.14), ist auszuschließen, dass die Aufnahme die entscheidende Hürde für die Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes ist. Auch bei der Betrachtung PTO-modifizierter ODN trifft diese Korrelation von Aufnahme und ausgelöstem immunstimulatorischem Effekt nicht zu (Abb. 3.15 und 3.16).

3.6 Abhängigkeit des immunstimulatorischen Effektes von der intrazellulären Lokalisation des ODN

In der Literatur ist für die Wirkungsweise von CpG-ODN beschrieben, dass sie durch Clathrin-vermittelte Endocytose aufgenommen werden (He *et al.*, 2003). Im endosomalen/lysosomalen Kompartiment findet dann die Wechselwirkung mit dem TLR9-Rezeptor und die Auslösung der Signalkaskade für die Generierung eines immunstimulatorischen Effektes statt (Latz *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen wurden bisher jedoch ausschließlich in DCs und makrophagoiden Zellen gemacht. Um diese Hypothese auch für B-Zellen zu überprüfen, sollten CpG-ODN in BJA-B-Zellen mikroinjiziert werden. Durch die Anwendung der Mikroinjektion sollten CpG-ODN intrazellulär appliziert werden, ohne dass sie sich in vesikulären Strukturen befinden. Diese so applizierten, frei im Zellkern oder Cytoplasma befindlichen ODN sollten laut bestehender Hypothese nicht in der Lage sein, einen immunstimulatorischen Effekt auszulösen.

Zunächst war es notwendig, die BJA-B-Suspensionszellen für die Mikroinjektion zu fixieren. Dazu wurde sich der Tatsache bedient, dass ein geringer Prozentsatz der Zellen dieser Zelllinie in Kultur die Angewohnheit besitzt zu adhären.

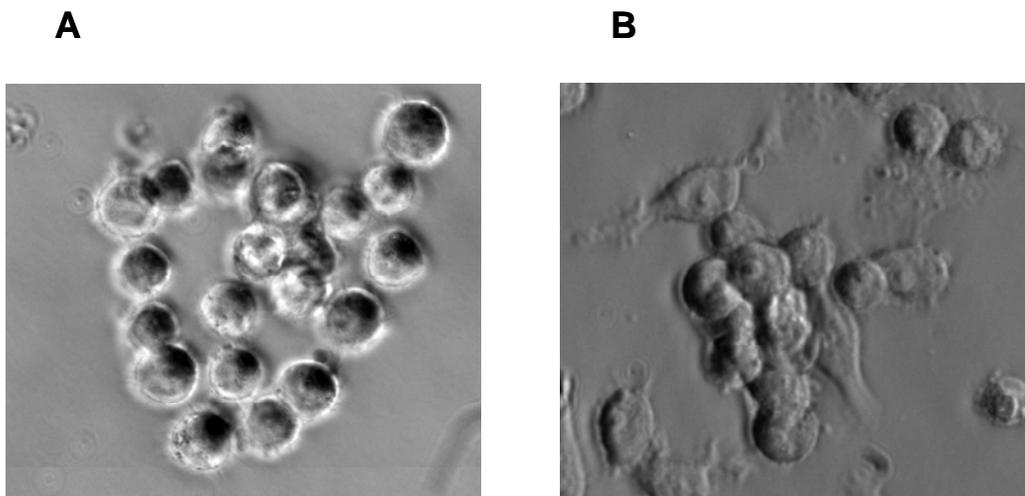


Abb. 3.31: Morphologie von Zellen der Zelllinie BJA-B
Darstellung der Zellen im Phasenkontrast (Fluoreszenzmikroskop Axionvert 200M) A, Gezeigt ist die überwiegende Morphologie der Zelllinie als sphärische Suspensionszellen, vorkommend als Einzelzellen oder im Cluster B, und durch hohe Zelldichte begünstigte Morphologie als adhärenente Zellen.

Bei der Zelllinie BJA-B handelt es sich um wenig differenzierte, B-lymphoide Zellen, die noch das Potenzial zu einer Umdifferenzierung zu Zellen besitzen, die morphologisch einen makrophagoiden Eindruck machen (Georg Sczakiel, persönliche Mitteilung; Abb. 3.31 B). Die Anzahl an adhärenen Zellen im Vergleich zu Suspensionszellen konnte zugunsten der adhärenen Zellen beeinflusst werden, indem die Zelldichte (Anzahl der Zellen pro ml) in der Kultur gesteigert wurde.

Es musste jedoch zuerst untersucht werden, ob es sich bei den adhärenen Zellen noch um typische B-Zellen handelte und ob sich die Zellen nach wie vor in der Generierung eines immunstimulatorischen Effektes unter CpG-Stimulation wie herkömmliche B-Zellen der Zelllinie verhielten. Zu diesem Zweck wurden sowohl Suspensionszellen als auch durch Trypsinbehandlung oder Abschaben abgelöste, adhärenente Zellen der selben Kultur mit verschiedenen Konzentrationen an CpG-ODN inkubiert und als Maß für den immunstimulatorischen Effekt die CD54-Expression und die CD80-Expression im Durchflusscytometer bestimmt. Außerdem wurde das Expressionsmuster der basalen Expression verschiedener, auf B-Zellen vorkommender Oberflächenmoleküle von Suspensionszellen und adhärenen Zellen verglichen.

Das Muster der basalen Expression von sieben verschiedenen Oberflächenmolekülen war bei Suspensionszellen und vormals adhärenen Zellen der Zelllinie BJA-B einheitlich (3.32 A), was die Schlussfolgerung zuließ, dass es sich trotz der abweichenden Morphologie bei den adhärenen Zellen immer noch um typische B-Zellen handelte.

Es wurde jedoch beobachtet, dass Zellen mit adhäreneter Morphologie bei einigen Konzentrationen ein leicht abweichendes Muster der CpG-stimulierten CD54- und CD80-Expression zeigten. Dabei waren die Unterschiede bei der gemessenen CD54-Expression größer, als bei der CD80-Expression. Zellen beider Morphologie zeigten jedoch weiterhin streng CpG-spezifische Immunstimulation. So blieb die Negativkontrolle mit durch C/A-Austausch zerstörtem CpG-Motiv (TM₆₄-C/A^{del}) bis zu Konzentrationen von 80 nM (Abb. 3.32 B) bzw. bis zu Konzentrationen von 1 µM (3.32 C) immunstimulatorisch unwirksam. Das leicht abweichende immunstimulatorische Verhalten von vormals adhärenen BJA-B-Zellen könnte zudem durch die Behandlung mit Trypsin oder die mechanische Beeinflussung durch das Abschaben der Zellen zu erklären sein.

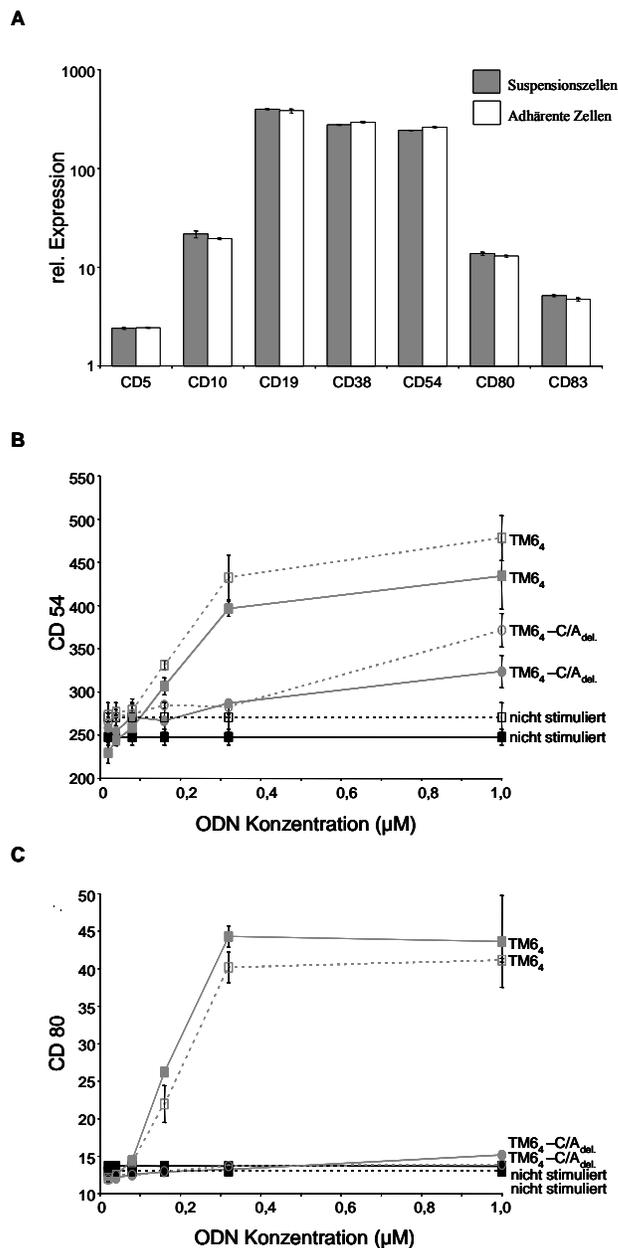


Abb. 3.32: Expression verschiedener Oberflächenmoleküle bei suspensions- und adhärenen BJA-B-Zellen

A, Spezifität der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle für die Morphologie der Zellen der Zelllinie BJA-B. 200.000 unbehandelte BJA-B-Zellen Morphologie: Suspensionszellen (dunkle Balken) oder Morphologie: adhären Zellen (helle Balken) wurden nach 44 Std. geerntet und eine Antikörperfärbung durchgeführt. Die Daten wurden mittels Durchfluscytometrie akquiriert. Die Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der Expression der angezeigten Oberflächen-moleküle. Die Daten zeigen jeweils ein Zellkulturerperiment in Doppelbestimmung.

B, C, Konzentrationsabhängigkeit der immunstimulatorischen Effekte für die Morphologie der Zellen der Zelllinie BJA-B. 200.000 BJA-B-Zellen Morphologie: Suspensionszellen (durchgezogene Linien) oder Morphologie: adhären Zellen (durchbrochene Linien) wurden mit verschiedenen Endkonzentrationen der ODN inkubiert (Sequenzen siehe Tabelle 2.1). Die Applikation der ODN erfolgte als Einfachgabe nach Aussaat der Zellen. Nach 44 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54- bzw. CD80-Antikörperfärbung durchgeführt.

3.6.1 Untersuchung des Effektes nach cytoplasmatischer Applikation von ODN

Zur Etablierung einer Kontrolle für eine erfolgreiche Mikroinjektion wurde FITC-Dextran (Fluka) in einer Endkonzentration von 5 mg/ml mikroinjiziert (siehe 2.2.3.3). Anhand der grünen Fluoreszenz konnten die erfolgreich mikroinjizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden.

Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen wurde direkt nach Mikroinjektion und 24 Std. nach Mikroinjektion durch Auszählen determiniert und zu der Anzahl an mikroinjizierten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Direkt nach Injektion fluoreszierten 170 von 300 injizierten Zellen. 24 Std. nach Injektion waren es noch 30 fluoreszierende Zellen.

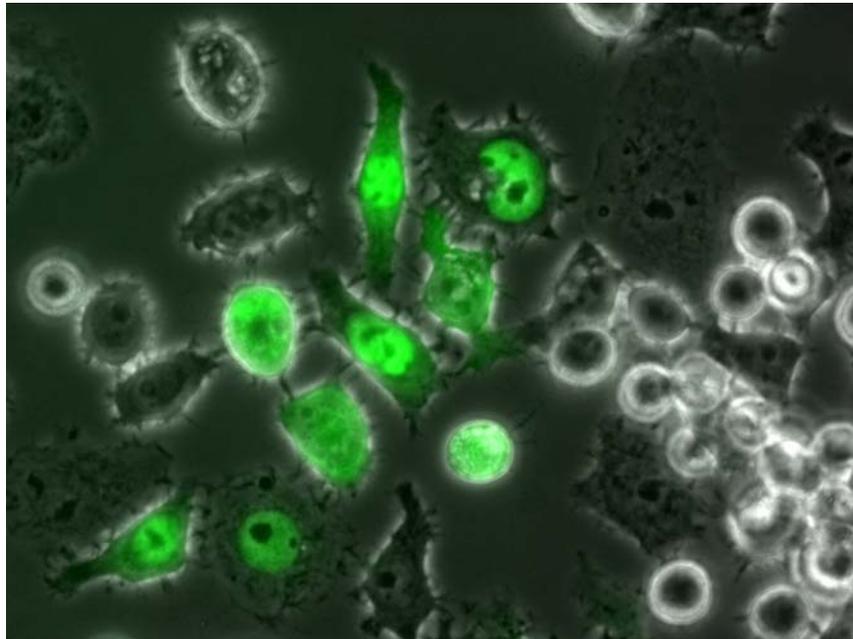


Abb. 3.33: Mikroinjektion von FITC-Dextran in adhärenente BJA-B-Zellen
Darstellung der Zellen in einer Überlagerung von Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahme in 40-facher Vergrößerung (Fluoreszenzmikroskop Axionvert 200M). Gezeigt sind BJA-B-Zellen, die mit 5mg/ml FITC-Dextran bei einem Injektionsdruck von 60 hPa und einer Injektionszeit von 0,2 s mikroinjiziert wurden.

Um die Einstellungen für die durchflusscytometrischen Messungen vorzunehmen wurde eine größere Anzahl an FITC-Dextran fluoreszierenden Zellen benötigt. Zu diesem Zweck wurden BJA-B-Zellen mit einer Konzentration von 5mg/ml FITC-Dextran analog zu der späteren Konzentration bei Mikroinjektion elektroporiert (siehe 2.2.3.4). 24 Std. nach der Elektroporation wurden die Zellen gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen und nicht fluoreszierenden Zellen wurde durch Auszählen bestimmt. Es fluoreszierten 68% der elektroporierten Zellen.

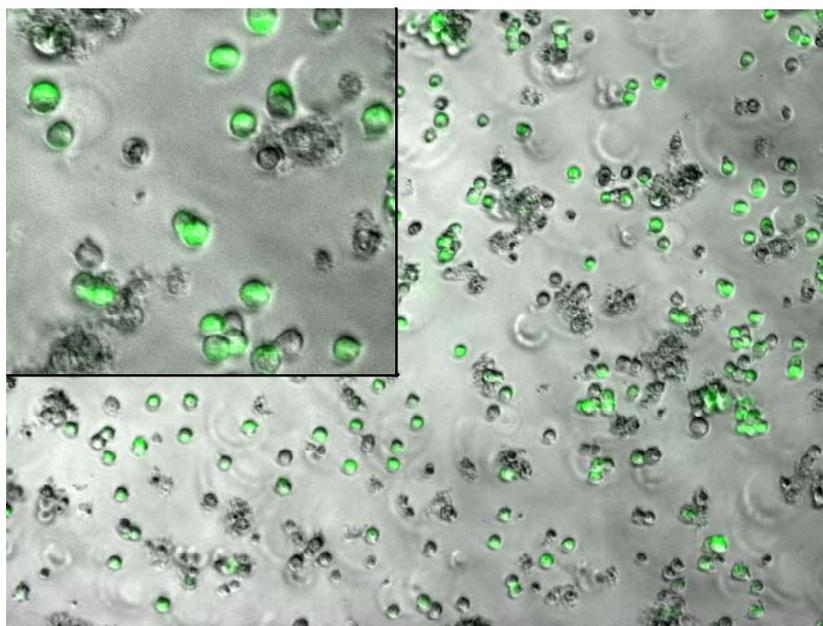


Abb. 3.34: Elektroporation von BJA-B-Zellen mit FITC-Dextran
Darstellung der Zellen in einer Überlagerung von Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahme in 10-facher Vergrößerung (Fluoreszenzmikroskop Axionvert 200M). Gezeigt sind BJA-B-Zellen 24 Std. nach Elektroporation, die mit 2×10^7 Zellen in $200 \mu\text{l}$ PBS in einer Küvette mit 4mm Elektrodenabstand (Bio-RAD) durchgeführt wurde mit 1Puls bei $960 \mu\text{Farad}$ und 200 V bei Raumtemperatur.

Die FITC-Dextran-positiven Zellen wurden zusammen mit CD54-PE-Antikörper gefärbten Zellen eingesetzt, um die Kompensation der Fluoreszenzfarbstoffe am Durchflusscytometer vorzunehmen. Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt von 20.000 FITC-Dextran-positiven Zellen bis 2 FITC-Dextran-positiven Zellen in einer Gesamtzellzahl von 100000 Zellen, um die Nachweisgrenze für die Anzahl an FITC-Dextran-positiven Zellen im Durchflusscytometer zu determinieren. Die Nachweisgrenze lag bei 2 FITC-Dextran-positiven Zellen (0,02%). In der Negativkontrolle ohne fluoreszierende Zellen konnten keine falsch positiven Ereignisse gemessen werden bis zu einer Anzahl von 1.000.000 gemessenen Ereignissen (engl: *events*).

Nach diesen Vorversuchen sollten BJA-B-Zellen mit verschiedenen CpG-ODN und 5 mg/ml FITC-Dextran als Kontrolle für erfolgreiche Mikroinjektion komikroinjiziert werden. In den Versuchen zur zeitabhängigen Aufnahme von CpG-ODN (Abb. 3.20) konnte gezeigt werden, dass sich bei einfacher Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ TM₆₄ nach einer Stunde die maximale Menge von im Mittel 200 fmol des Oligonukleotids in 200.000 BJA-B-Zellen befand, was 1 amol pro Zelle entspricht.

Es sollte nun die gleiche Konzentration des Oligonukleotids mikroinjiziert werden, um intrazellulär einen Konzentrationsbereich des ODN zu erreichen, bei dem ein immunstimulatorischer Effekt zu erwarten wäre. Wenn man von einem durchschnittlichen Injektionsvolumen von 100 fl ausgeht, ergibt sich hieraus eine Konzentration von 10 μM für die zu mikroinjizierende ODN Lösung. Es wurden daher BJA-B-Zellen mit den Konzentrationen von 2 μM , 10 μM und 20 μM verschiedener CpG-ODN und 5 mg/ml FITC-Dextran als Kontrolle komikroinjiziert (siehe 2.2.3.3). Als Positivkontrollen wurden 200.000 BJA-B-Zellen mit einer Endkonzentration von 1 μM der ODN für 25 Std. inkubiert. Bei der Antikörperfärbung der mikroinjizierten Zellen wurden jeweils 200.000 Zellen der laufenden Kultur zugesetzt, um eine angemessene Zellzahl für die Durchführung des Protokolls zu erhalten. Es wurden jeweils 200.000 Zellen im Durchfluscytometer gemessen und die CD54-Expression als relative Fluoreszenz bestimmt. Die Mittelwerte für die CD54-Expression der Zellen aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten sind in Tabelle 3.1 gezeigt.

Behandlung der Zellen	Anzahl FD positiver Zellen	rel. CD54-Expression aller Zellen	rel. CD54-Expression der FD positiven Zellen
Unbehandelt	-	126	-
		174	
Inkubation 1 μM TM6 ₄	-	550	-
		518	
		665	
		716	
Inkubation 1 μM TM6 ₄ -C/A ^{del}	-	226	-
		236	
		349	
		311	
Mikroinjektion 5mg/ml FD und 2 μM TM6 ₄	24	98	264
	38	95	201
Mikroinjektion 5mg/ml FD und 2 μM TM6 ₄ -C/A ^{del}	30	107	107
	32	97	86
Mikroinjektion 5mg/ml FD und 10 μM TM6 ₄	8	94	332
	14	98	321
Mikroinjektion 5mg/ml FD und 10 μM TM6 ₄ -C/A ^{del}	20	102	103
	27	109	62

Tabelle 3.1. Daten der Mikroinjektionsexperimente von BJA-B-Zellen mit FITC-Dextran und CpG-ODN

Abkürzungen: FD, FITC-Dextran; MW, Mittelwert

In den Kontrollen mit inkubierten Zellen konnten keine FITC-Dextran-positiven Ereignisse detektiert werden (Tabelle 3.1 und Abb. 3.35 A). Bei der Mikroinjektion von 200 Zellen konnten zwischen 8 und 38 FITC-Dextran-positive Zellen detektiert werden.

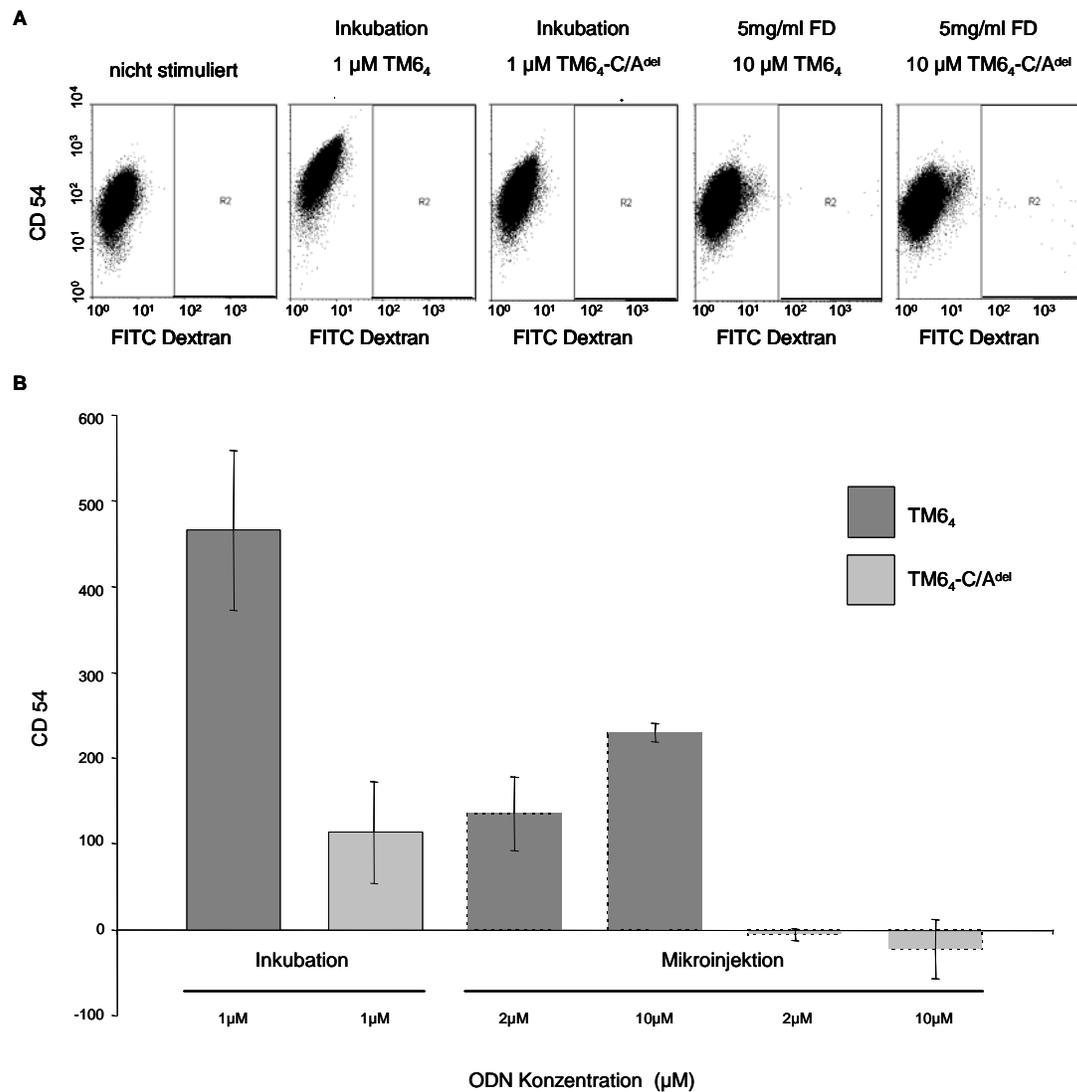


Abb. 3.35: Mikroinjektion von ODN induziert CpG-abhängig CD54-Expression in BJA-B-Zellen

200 BJA-B-Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 5 mg/ml FITC-Dextran und 10 µM der ODN TM6₄ (dunkle Balken) oder TM6₄C/A^{del}. (helle Balken) bei einem Injektionsdruck von 60 hPa und einer Injektionszeit von 0,2 s mikroinjiziert. Als Positivkontrollen wurden 200.000 BJA-B-Zellen mit einer Endkonzentration von 1 µM der ODN inkubiert. Nach 25 Std. Inkubation wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Es wurde nur die CD54-Expression der intakten Lymphocytenfaktion (*Gate* R1 siehe Abb. 3.2) berücksichtigt. Bei den mikroinjizierten Proben wurde nur die CD54-Expression der FITC-Dextran positiven Zellen im *Gate* R2 berücksichtigt. **A**, Gezeigt ist die relative Fluoreszenz in *Dotplots*. Abkürzungen: FD, FITC-Dextran **B**, Die gezeigten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die Daten zeigen die Auswertung je eines Experimentes in Doppelbestimmung.

Bei den für die Mikroinjektion inkubierten Zellen kam es zu einer deutlich erniedrigten basalen CD54-Expression (Tabelle 3.1), die möglicherweise auf die unterschiedliche Kultivierung der Zellen in Petrischalen oder auf den Zusatz von Antibiotika zurückzuführen ist. Bei der Auswertung der Versuche wurde im folgenden deshalb immer auf die individuell gemessene basale CD54-Expression der nicht FITC-Dextran-positiven Zellen normiert. In den Experimenten führte die Mikroinjektion von CpG-ODN zu einer deutlichen Erhöhung der CD54-Expression. Die Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes war bei den Konzentrationen von 2 μM und 10 μM der ODN streng abhängig von der Anwesenheit eines CpG-Motivs in der Sequenz (Abb.35 B). Ein Einfluss des koinjizierten FITC-Dextrans konnte ausgeschlossen werden, da eine alleinige Mikroinjektion dieser Substanz mit der Konzentration von 5 mg/ml nicht zu einer Erhöhung der CD54-Expression über basale Expression führte (Daten nicht gezeigt). Die Mikroinjektion von 20 μM der ODN führte bei beiden ODN zu einer deutlichen Erhöhung der CD54-Expression (Daten nicht gezeigt).

Zur Validierung der durch Mikroinjektionsexperimente erhaltenen Ergebnisse wurden des weiteren mittels Elektroporation ODN in Zellen eingebracht. Mit der Methode der Elektroporation werden kleinste Öffnungen in der Zellmembran erzeugt, so dass extrazelluläre Konzentrationen von Stoffen wie Nukleinsäuren in die Zelle gelangen. Die Membranen von Organellen wie beispielsweise Endosomen oder Lysosomen werden durch diese Methode jedoch nicht beschädigt. Die ODN sollten sich also auch nach Elektroporation nicht in Vesikeln, sondern frei im Cytoplasma in der Zelle befinden. So sollte der Theorie nach auch bei dieser Methode keine Wechselwirkung zwischen CpG-ODN und dem TLR9-Rezeptor im endosomalen/lysosomalen Kompartiment zustande kommen und so auch kein immunstimulatorischer Effekt ausgelöst werden. Zu diesem Zweck wurden BJA-B-Zellen mit einer Konzentration von 5mg/ml FITC-Dextran und den Endkonzentrationen von 1 μM und 5 μM elektroporiert (siehe 2.2.3.4). Die Zellen wurden direkt nach der Elektroporation gründlich gewaschen und im Durchfluscytometer analysiert. Auch bei den elektroporierten Zellen kam es zu einer deutlich erniedrigten basalen CD54-Expression, die in diesem Falle möglicherweise auf die Elektroporationsbehandlung, auf die unterschiedliche Zellzahl bei Inkubation (2×10^5 Zellen) und Elektroporation (2×10^6 Zellen) oder auf den Zusatz von Antibiotika zurückzuführen ist. Bei der Auswertung der Versuche wurde im folgenden deshalb auf die jeweilig ermittelte basale CD54-Expression für in Medium inkubierte Zellen bzw. allein mit FITC-Dextran elektroporierte Zellen normiert.

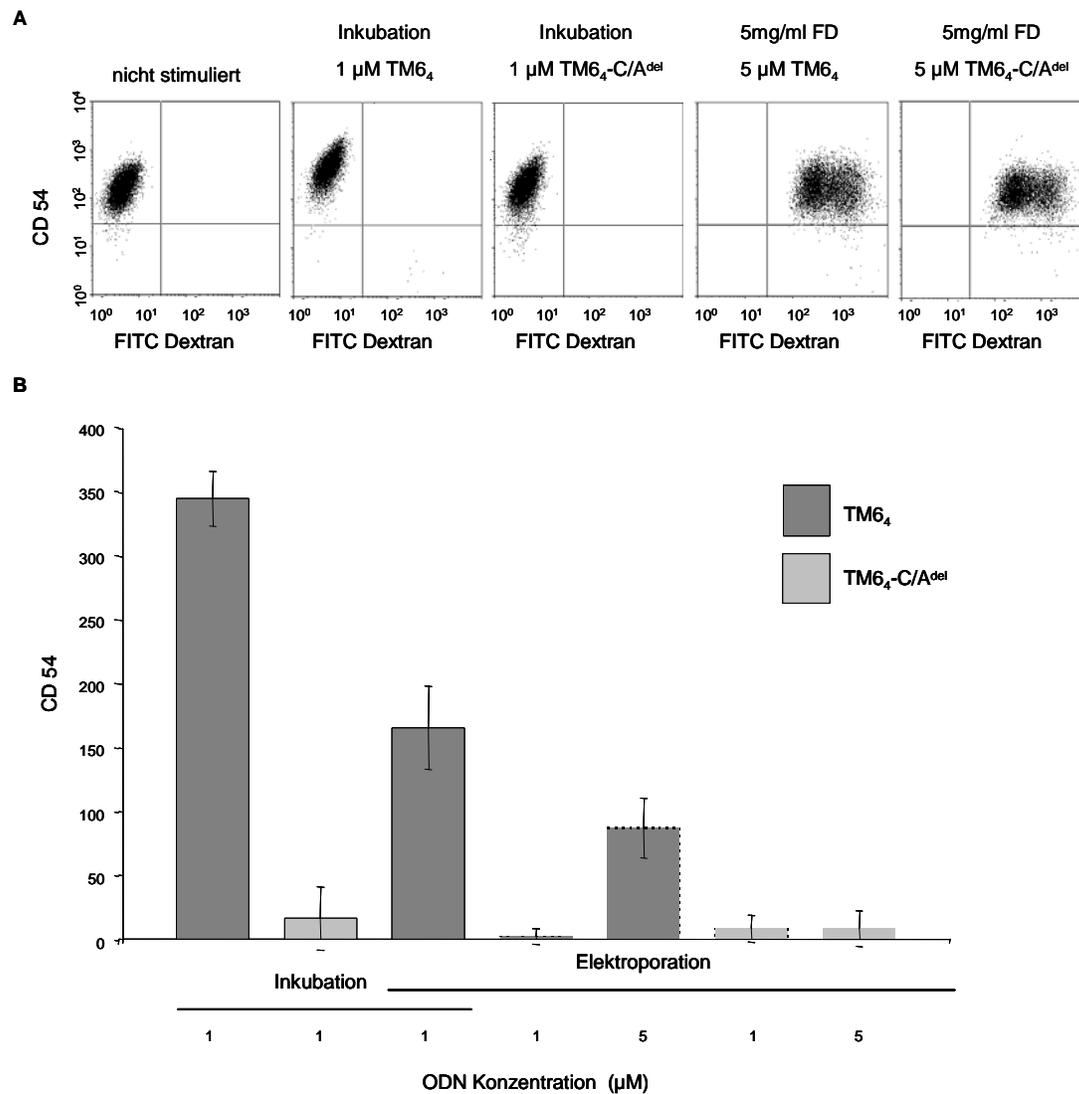


Abb. 3.36: Applikation durch Elektroporation von ODN induziert CpG-abhängig CD54-Expression in BJA-B-Zellen
 2×10^6 BJA-B-Zellen wurden in 300 µl PBS in einer Küvette mit 2mm Elektrodenabstand (Bio-RAD) mit der Endkonzentration von 5 mg/ml FITC Dextran und 1 µM bzw. 5 µM der ODN TM₆₄ (dunkle Balken) bzw. TM₆₄-C/A^{del} (helle Balken) mit 1 Puls bei 960 µFarad und 100 V elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und in 300 µl RPMI Medium mit 10% FKS inkubiert. Als Positivkontrolle wurden 200.000 BJA-B-Zellen mit einer Endkonzentration von 1 µM der ODN inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 2×10^7 BJA-B-Zellen mit der Konzentration von 5 mg/ml FITC Dextran elektroporiert. Als Stimulationssontrolle wurden 2×10^6 BJA-B-Zellen mit 5mg/ml FITC Dextran elektroporiert und anschließend mit 1 µM TM₆₄ inkubiert. Nach 25 Std. wurden die Zellen geerntet und eine CD54-Antikörperfärbung durchgeführt (s. Kapitel 2.2.5). Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie akquiriert. Es wurde nur die CD54-Expression der intakten Lymphocytenfraktion (*Gate* R1 siehe Abb. 3.2) berücksichtigt. **A**, Gezeigt ist die relative Fluoreszenz in *Dotplots*. Abkürzungen: FD, FITC-Dextran **B**, Die gezeigten Werte zeigen den mittleren Stimulations-Index der CD54-Expression zwischen ODN-stimulierten Zellen und der Medium-Kontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei Zellkultur-Experimente in Doppelbestimmung.

Mit 5 mg/ml FITC-Dextran elektroporierte Zellen, die anschließend mit 1 μM TM6₄ inkubiert wurden, zeigten ein Stimulationsniveau, das halb so groß war wie das der ohne vorherige Elektroporationsbehandlung mit 1 μM TM6₄ inkubierten Zellen, weshalb davon auszugehen ist, dass die bei elektroporierten Zellen maximal zu erreichende Stimulation deutlich unter der nichtbehandelter Zellen liegt (Abb. 3.36 B).

In den Experimenten führte die Applikation von CpG ODN durch Elektroporation zu einer Erhöhung der CD54-Expression bei einer Konzentration von 5 μM TM6₄. Der Effekt konnte allerdings nur in Anwesenheit eines CpG-Motivs in der Sequenz beobachtet werden. Die Negativkontrolle TM6₄-C/A^{del} blieb auch bei einer Konzentration von 5 μM inaktiv (Abb. 3.36 B). Ein Einfluss der kurzen Inkubationszeit der Zellen mit den ODN während der Zeitdauer der Elektroporation konnte ausgeschlossen werden, da eine mitgeführte Kontrolle, die für genau diesen Zeitraum mit 5 μM TM6₄ inkubiert und anschließend gewaschen und wie den anderen Zellen behandelt wurde, keine Erhöhung der CD54-Expression über basale Expression zeigte.

3.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation

Diese Ergebnisse führten zu der Fragestellung, wie es zu der Auslösung eines Effektes durch frei im Cytoplasma vorliegende CpG-ODN kommt. Zur näheren Untersuchung dieser Beobachtung wurden im folgenden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vorgenommen, um qualitativ Unterschiede bei der intrazellulären Lokalisation von CpG-ODN nach Inkubation bzw. Mikroinjektion von BJA-B-Zellen zu dokumentieren. Es wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3-markierte ODN (IBA) eingesetzt sowie der *Lysotracker blue* (Molecular Probes) zur Anfärbung der Lysosomen und ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-markierter Antikörper gegen den TLR9-Rezeptor (Imgenex). Die allein mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Substanzen behandelten Zellen wiesen bei der Betrachtung in den Kanälen für die jeweilig anderen Fluoreszenzen lediglich eine geringe Autofluoreszenz auf, die rechnerisch bei der Darstellung der Abbildungen mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen berücksichtigt wurde.

3.6.2.1 Intrazelluläre Lokalisation von ODN in Bezug auf lysosomale Kompartimente

Zunächst wurden BJA-B-Zellen mit fluoreszenzmarkierten ODN inkubiert oder mikroinjiziert (2.2.3) und gleichzeitig eine Färbung der Lysosomen mit dem *Lysotracker* vorgenommen. Die Zellen wurden anschließend als Lebendpräparate unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

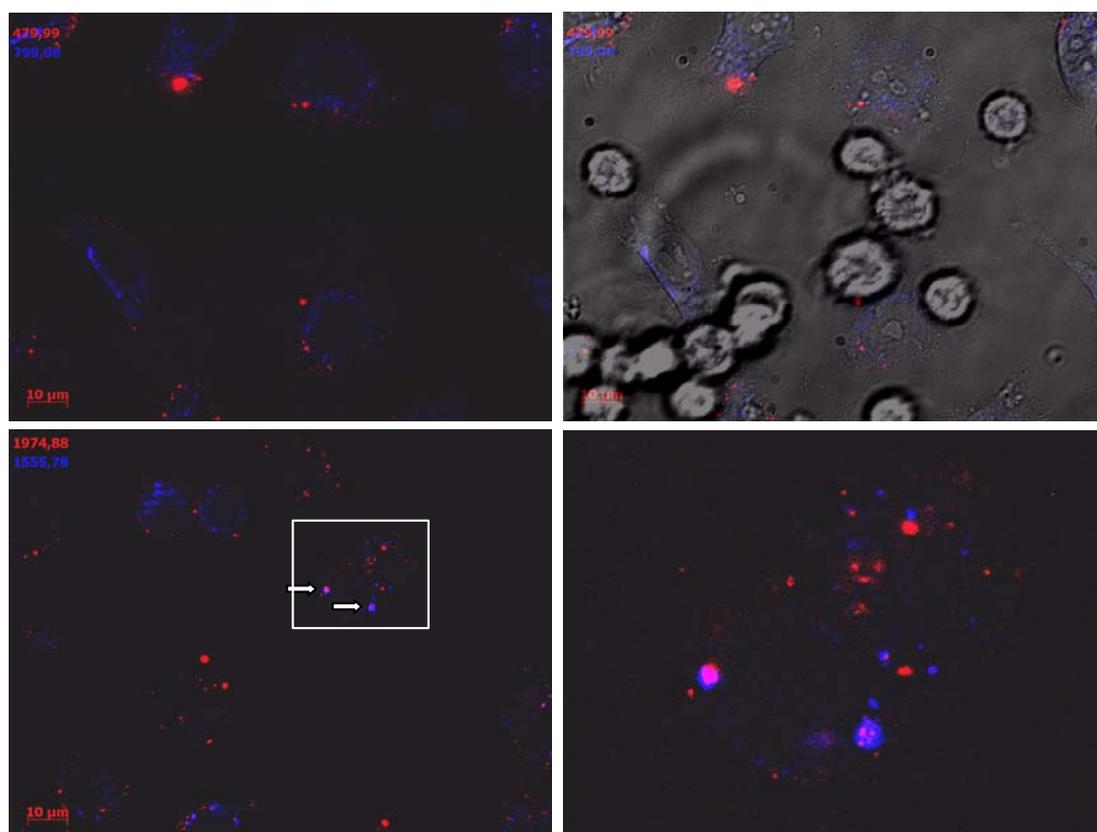


Abb. 3.37: TM₆₄ zeigt nach 5 min. Inkubation überwiegend keine Kolo-kalisation mit lysosomalen Kompartimenten

2×10^5 BJA-B-Zellen wurden 24 Std. vor Inkubation in 300 μ l Vollmedium in 8-Well Kammerdeckgläser (NuncTM) ausgebracht. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentrationen von 3 μ M des Cy3-markierten ODN TM₆₄ (rote Fluoreszenz) und einer Endkonzentration von 5 μ M des *Lysotracker blue* (blaue Fluoreszenz) für 5min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen einen optischen Schnitt durch die Präparate. In den Abbildungen ist jeweils die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen in der jeweiligen Farbe angegeben. Inkubation der Zellen mit *Lysotracker* und Cy3-markiertem ODN TM₆₄: Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme (oben rechts) und vergrößerte Darstellung (unten rechts).

Die Aufnahmen, bei denen eine Inkubation der Zellen mit den ODN stattfand, wurden als optischer Schnitt durch die Zelle aufgenommen, wobei nur Fluoreszenzen in einer Ebene berücksichtigt wurden und überstrahlende Fluoreszenzen aus darüber oder darunter liegenden Ebenen rechnerisch abgezogen wurden.

Daher waren die Vesikel als klar abgegrenzte Kompartimente erkennbar (Abb. 3.37). Es konnte überwiegend keine Kollokalisierung der Vesikel mit Cy3-Fluoreszenz mit den durch den *Lysotracker blue* angefärbten Vesikeln beobachtet werden. Die kollokalisierenden Bereiche beider Fluoreszenzen zeigen sich als violette Färbung und sind in der Abbildung durch Pfeile markiert (Abb. 3.37 unten links; Vergrößerte Darstellung: unten rechts).

Es sollte ausgeschlossen werden, dass niedrige pH-Werte zwischen pH 5,0 und pH 6,5, wie sie in Lysosomen vorkommen, einen Einfluss auf die Anregbarkeit oder die Emission des Cy3-Fluorophors haben. Daher wurden bei pH-Werten von 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 und physiologischem pH 7,4 die Absorptionsspektren im Spektrophotometer (Nanodrop) gemessen und die Emissionsspektren der Cy3-Fluoreszenz im Spektralfluorometer (FluoroMax) bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Absorptionsspektren des Cy3-Labels unbeeinflusst waren vom pH-Wert. Die aufgenommenen Emissionsspektren zeigten, dass die Fluoreszenzintensität bei niedrigeren pH-Werten zunahm. Ein Einfluss des pH-Wertes auf die Emission des Fluorophors konnte deshalb als Grund für eine nicht zu beobachtende Kollokalisierung des *Lysotracker*s und Cy3-markierten ODN ausgeschlossen werden. (Abb. 3.38).

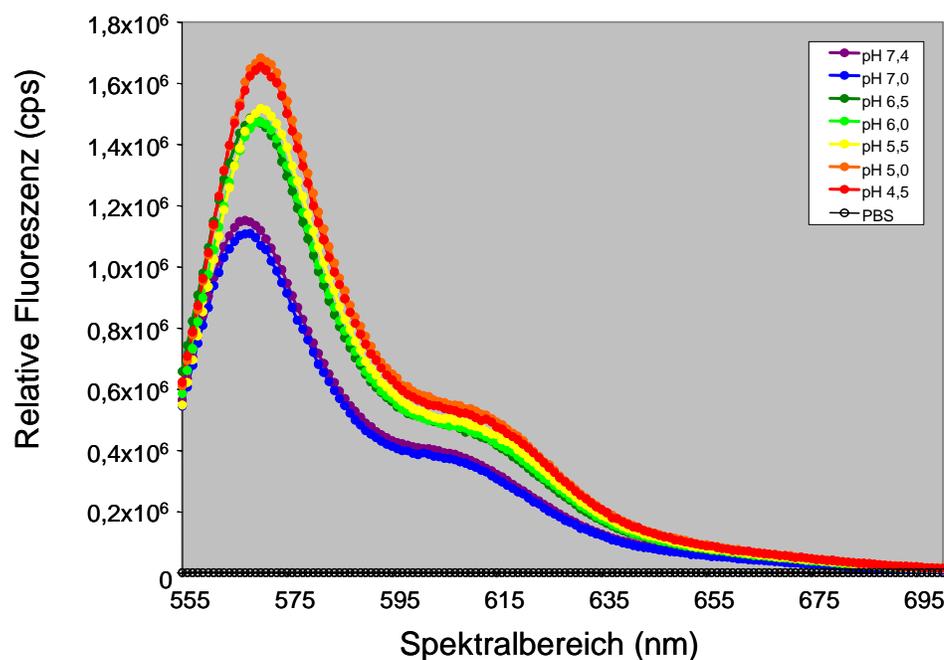


Abb. 3.38: Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Fluoreszenzintensität des Cy3-Fluorophors

100 μ M Cy3-markiertes ODN TM₆₄ wurde jeweils 1:10 in PBS mit verschiedenen pH-Werten verdünnt. Bei einer Anregungswellenlänge von 551 nm wurden die Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 555 nm bis 700 nm im Spektralfluorometer (FluoroMax) aufgezeichnet.

Da beobachtet wurde, dass Vesikel, die fluoreszenzmarkierte si-RNA enthalten, innerhalb der Zelle einer sehr schnellen Bewegung unterworfen sind (Marita Overhoff, mündliche Mitteilung), ergab sich die Frage, ob diese Bewegung der Grund dafür sein könnte, dass sich keine Kolo-kalisation der Vesikel darstellen lässt. Hintergrund ist, dass die zwei Fluoreszenzen im roten Spektralbereich für Cy3-markierte CpG-ODN und im blauen Spektralbereich für den *Lysotracker blue* am Mikroskop zeitversetzt aufgenommen werden und so bei rascher Bewegung der Vesikel keine Kolo-kalisation in der Darstellung zu Stande kommt. Daher wurde die intrazelluläre Lokalisation der fluoreszenzmarkierten ODN nach 5 minütiger Inkubation mit BJA-B-Zellen zeitaufgelöst über einen Bereich von einer bis zehn Sekunden untersucht. Wie in Abb. 3.39 gezeigt, konnte jedoch keine rapide Bewegung der Vesikel in einem für die Aufnahme zweier Fluoreszenzen relevanten Zeitraum festgestellt werden (Abb. 3.39 B).

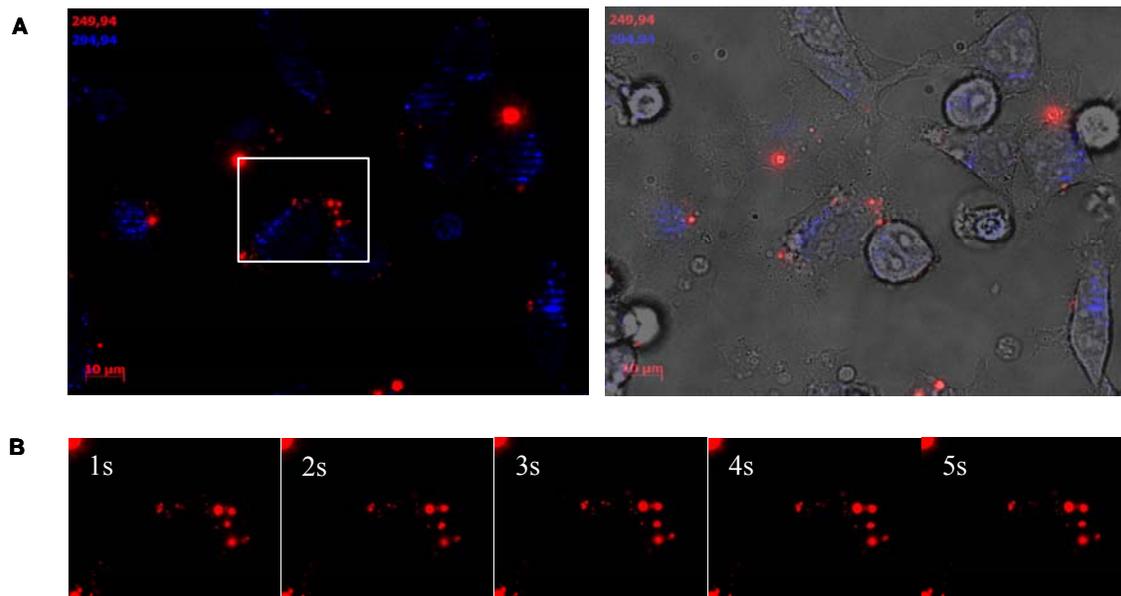


Abb. 3.39: Vesikel mit Cy3-markierten ODN unterliegen intrazellulär keiner schnellen Bewegung

2×10^5 BJA-B-Zellen wurden 24 Std. vor Inkubation in $300 \mu\text{l}$ Vollmedium in 8-Well Kammerdeckgläser (NuncTM) ausgebracht. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentrationen von $3 \mu\text{M}$ des Cy3-markierten ODN TM6₄ (rote Fluoreszenz) und einer Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ des *Lysotracker blue* (blaue Fluoreszenz) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen einen optischen Schnitt durch die Präparate. In den Abbildungen ist jeweils die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen in der jeweiligen Farbe angegeben. **A**, Inkubation der Zellen mit *Lysotracker* und Cy3-markiertem ODN TM6₄ (links) und Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme (rechts). **B**, Zeitabhängige Darstellung der Cy3 Fluoreszenz in Vergrößerung des eingezeichneten Bildausschnittes in Aufnahmeintervallen von 1s bis 5s.

Im weiteren wurde die Internalisierung von ODN verschiedener Sequenzen nach einer Aufnahmezeit von 5 min untersucht.

Die Menge an internalisierten ODN sowie die intrazelluläre Lokalisation unterschied sich nicht zwischen den verschiedenen eingesetzten ODN TM6₄, TM6₄-C/A_{del}, ODN 2080-C₄ und NOV 2009-A₄ (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die Anwesenheit eines intakten CpG-Motivs in der Sequenz keine Rolle für die internalisierte Menge an ODN sowie für deren intrazelluläre Lokalisation spielt.

Im weiteren wurde die Internalisierung von ODN verschiedener Sequenzen nach einer Aufnahmezeit von 12 Std. bzw. 24 Std. untersucht. Dabei kam es nach 12 Std. zu einem teilweisen Verlust der Adhärenz der Zellen, die die Darstellung der Zellen erschwerte. Zu beobachten war jedoch eine verstärkte Kolokalisation der Fluoreszenzen des *Lysotracker*s und der internalisierten ODN (Abb. 3.40)

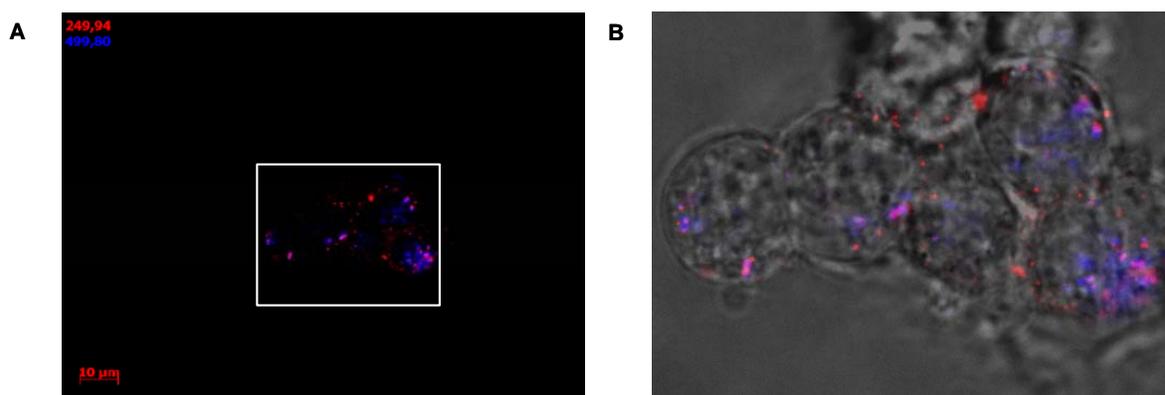


Abb. 3.40: TM6₄ zeigt nach 12 Std. Inkubation vermehrt Kolokalisation mit lysosomalen Kompartimenten

2x10⁵ BJA-B-Zellen wurden 24 Std. vor Inkubation in 300 µl Vollmedium in 8-Well Kammerdeckgläser (NuncTM) ausgebracht. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentrationen von 3 µM des Cy3-markierten ODN TM6₄ (rote Fluoreszenz) und einer Endkonzentration von 5 µM des *Lysotracker blue* (blaue Fluoreszenz) für 12 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen einen optischen Schnitt durch die Präparate. In den Abbildungen ist jeweils die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen in der jeweiligen Farbe angegeben. **A**, Überlagerung der Fluoreszenzen **B**, Vergrößerte Darstellung und Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme

Die Menge an internalisierten ODN sowie die intrazelluläre Lokalisation unterschied sich wiederum nicht zwischen ODN verschiedener Sequenzen TM6₄, TM6₄-C/A_{del}, ODN 2080-C₄ und NOV 2009-A₄ (Daten nicht gezeigt).

Nach 24 Std. Inkubationszeit konnten keine adhärennten Zellen mehr dargestellt werden.

Im folgenden wurde qualitativ die intrazellulären Lokalisation von CpG-ODN nach Mikroinjektion von BJA-B-Zellen untersucht.

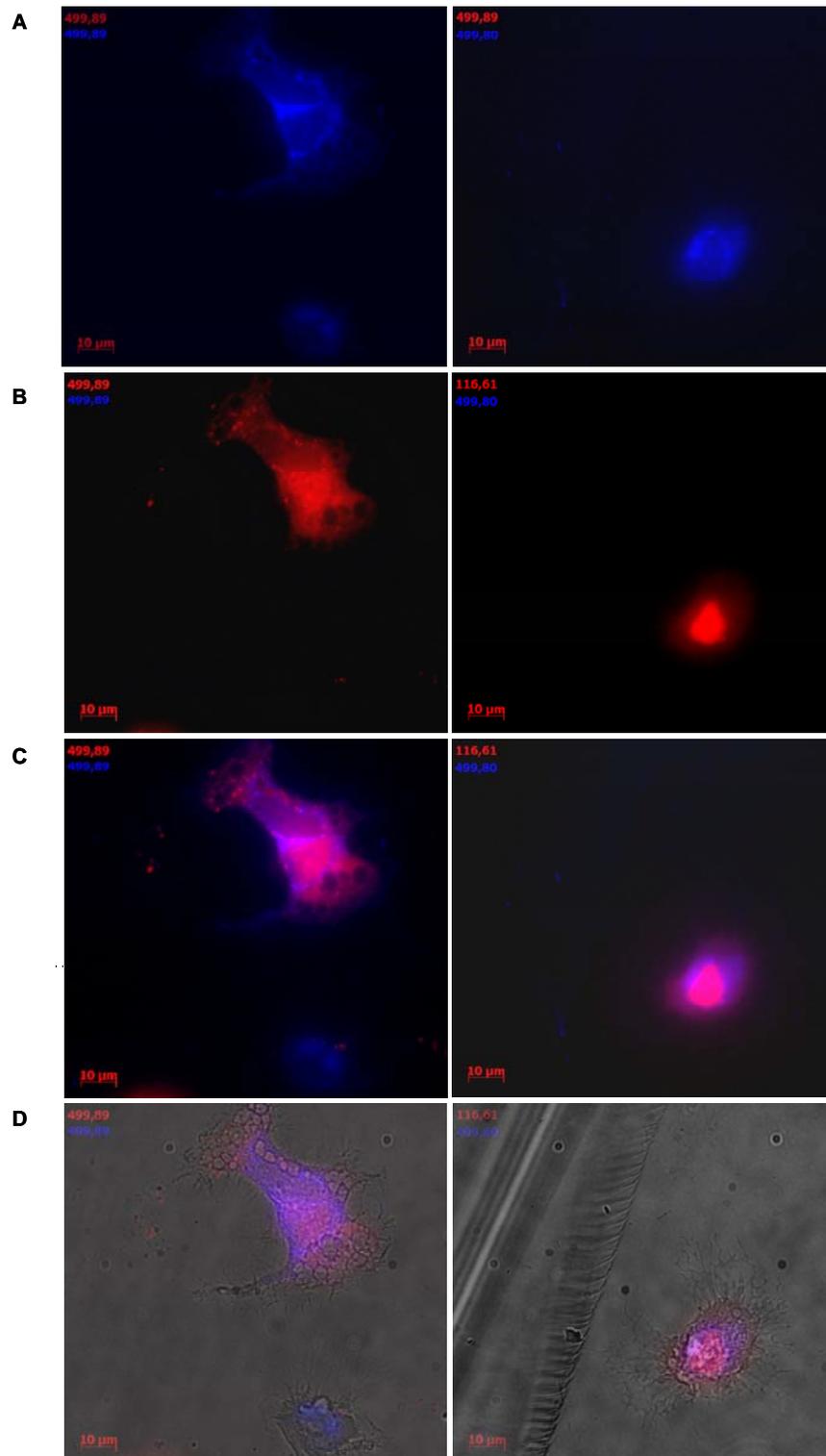


Abb. 3.41: Analyse der Kolokalisation von TM6₄ mit lysosomalen Kompartimenten nach Mikroinjektion

BJA-B-Zellen (1×10^6 Zelle/ml) wurden 48 Std. vor Inkubation in 10 ml Vollmedium in die Petrischalen mit Deckgläschen Ø12 mm ausgebracht. Die Zellen wurden mikroinjiziert mit einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ Cy3-markierten ODN TM6₄ (rote Fluoreszenz) und inkubiert mit einer Endkonzentration von des *Lysotracker blue* (blaue Fluoreszenz) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen, auf einen Objektträger gelegt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen die konventionelle Fluoreszenz der Präparate. In den Abbildungen ist jeweils die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen in der jeweiligen Farbe angegeben. **A**, Fluoreszenz des *Lysotracker blue* (blau) **B**, Fluoreszenz des Cy3-markierten ODN TM6₄ (rot) **C**, Überlagerung der Fluoreszenzen (violett) **D**, Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme.

Bei der Mikroinjektion wurden wie bei den vorangegangenen Versuchen Konzentrationen gewählt, die der gleichen Konzentration des Oligonukleotids entsprachen, die durch Inkubation mit 3 μM ODN in die Zellen gelangte. Es wurde errechnet, dass bei einem angenommenen Injektionsvolumen von 100 fl eine Konzentration von 30 μM mikroinjiziert werden musste. Da die Aufnahmen aufgrund der diffusen und damit schwachen Fluoreszenz des Cy3-markierten CpG-ODN innerhalb der Präparate nur als Abbildung der konventionellen Fluoreszenz und nicht als optischer Schnitt dargestellt werden konnten, sind die Fluoreszenzen eher diffus und weniger abgegrenzt darstellbar. Es ist jedoch eindeutig erkennbar, dass die höchste Fluoreszenzintensität für die Cy3-markierten CpG-ODN sich bei allen Zellen im Nukleus zeigte. Außerdem konnte eine diffus verteilte Fluoreszenz über das gesamte Cytoplasma beobachtet werden (Abb. 3.41 B). Es war jedoch auch zu sehen, dass nach Mikroinjektion von CpG-ODN auch vesikuläre Strukturen innerhalb einiger Zellen auftraten (Abb. 41 B links). Analog zu den Inkubationsexperimenten zeigte sich jedoch auch bei Mikroinjektion keine eindeutige Überlagerung mit den durch den *Lysotracker* angefärbten Bereichen (Abb. 3.41 C/D).

3.6.2.2 Intrazelluläre Lokalisation von ODN in Bezug auf den TLR9-Rezeptor

Im weiteren sind die Ergebnisse der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Cy3-markierten ODN nach Inkubation und Mikroinjektion in Bezug auf einen FITC-markierten TLR9-spezifischen Antikörper dargestellt. BJA-B-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten ODN inkubiert oder mikroinjiziert wie in 2.2.8 beschrieben. Es folgte eine Fixierung, Permeabilisierung und Antikörperfärbung der Zellen wie in 2.2.9 beschrieben. Die Zellen wurden anschließend als fixierte Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (2.2.10). Die Aufnahmen der Experimente, bei denen Inkubation der Zellen mit den ODN stattfand, wurden wieder als optischer Schnitt durch die Zelle aufgenommen. Der TLR9-Antikörper färbte Bereiche im Cytoplasma der Zellen an, am stärksten perinukleäre Bereiche. CpG-ODN beladene Vesikel zeigten sich ebenfalls im Cytoplasma der Zelle (Abb. 42 oben rechts). In großen Bereichen konnte eine Kolo-kalisation der beiden Fluoreszenzfarbstoffe um den mit Hoechst 33342 blau angefärbten Zellkern beobachtet werden, die sich als gelbe Fluoreszenz darstellte und in der Abbildung durch Pfeile markiert ist (Abb. 3.42).

Die Kolokalisation entsprach hierbei jedoch keiner kompletten Überlagerung, da auch nur rot oder nur grün gefärbte Bereiche zu sehen waren, wie in der Vergrößerung in Abb. 3.42 unten rechts gezeigt.

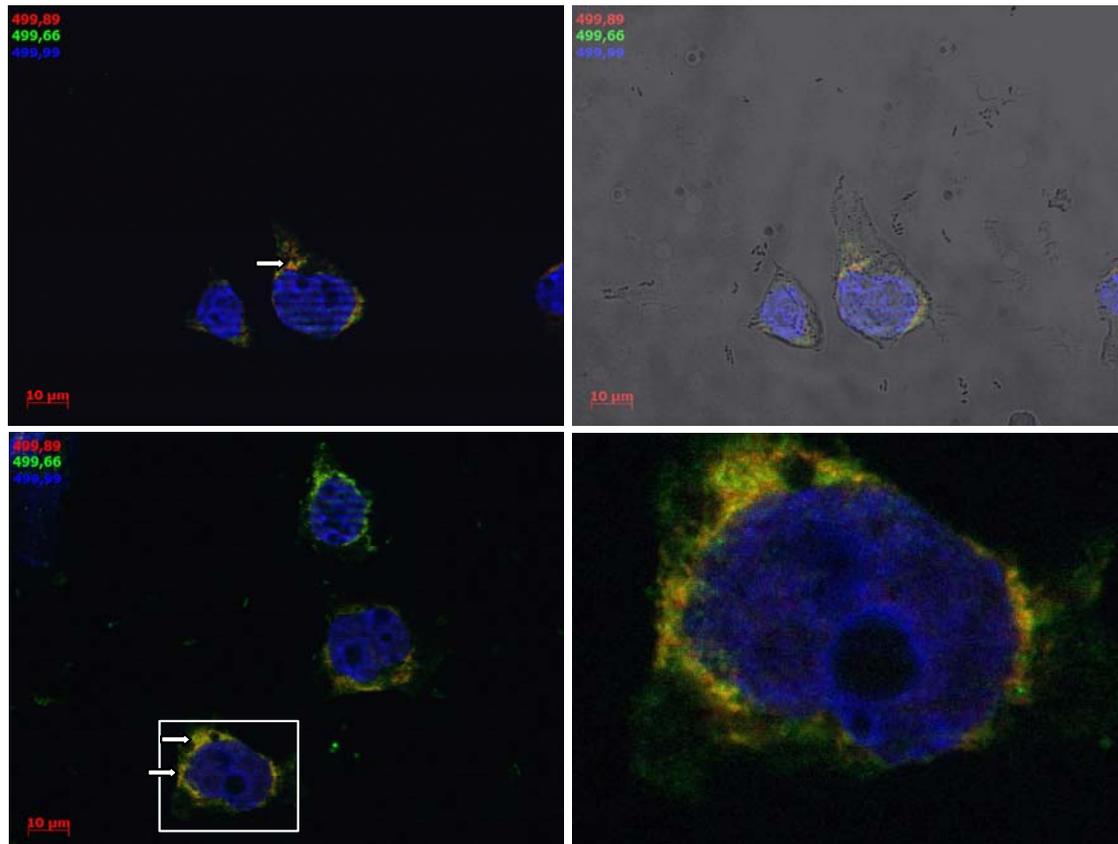


Abb. 3.42: TM6₄ zeigt nach 5 min. Inkubation überwiegend Kolokalisation mit dem TLR9-Rezeptor

2×10^5 BJA-B-Zellen wurden 24 Std. vor Inkubation in 300 µl Vollmedium in 8-Well Kammerdeckgläser (Nunc™) ausgebracht. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentrationen von 3 µM des Cy3-markierten ODN TM6₄ (rote Fluoreszenz) inkubiert und anschließend nach Fixierung einer Färbung mit FITC-markiertem Antikörper (grüne Fluoreszenz) sowie einer Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blaue Fluoreszenz) unterzogen (siehe 2.2.9) Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen einen optischen Schnitt durch die Präparate. In den Abbildungen ist jeweils die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen in der jeweiligen Farbe angegeben. Inkubation der Zellen mit Cy3-markierten TM6₄ und Färbung mit TLR9-Antikörper: Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme (oben rechts) und vergrößerte Darstellung (unten rechts).

Um zu überprüfen, ob die aufgenommene Fluoreszenz wirklich von internalisierten ODN stammt, wurden im Abstand von 1 µm Schnittaufnahmen durch eine Zelle gemacht (Abb. 3.43).

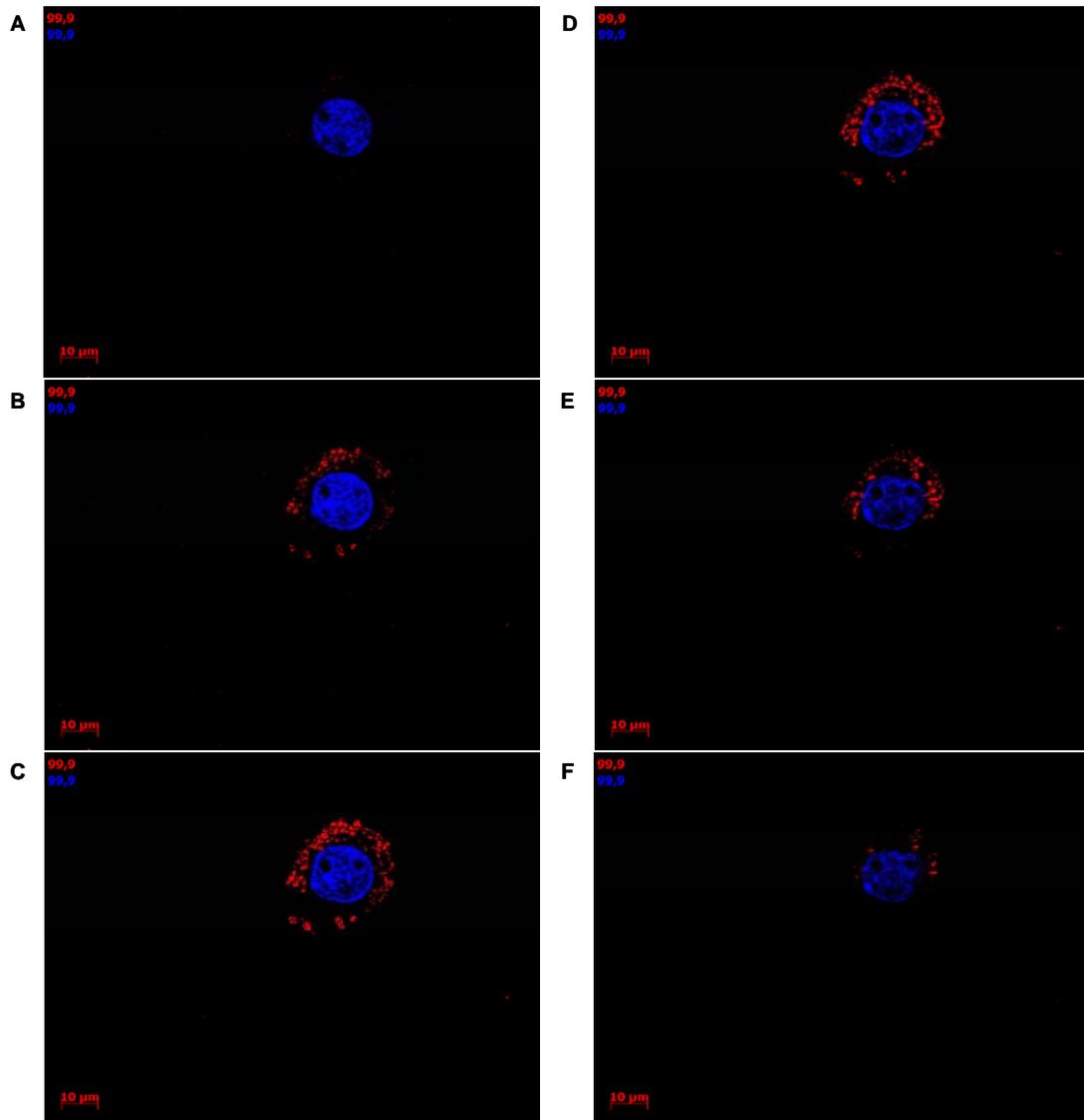


Abb. 3.43: Nachweis der intrazellulären Lokalisation von TM6₄ in BJA-B-Zellen mittels Schnittaufnahmen

2×10^5 BJA-B-Zellen wurden 24 Std. vor Inkubation in 300 µl Vollmedium in 8-Well Kammerdeckgläser (Nunc™) ausgebracht. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentrationen von 3 µM der Cy3-markierten ODN TM6₄ für 5 min inkubiert und anschließend nach Fixierung einer Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blaue Fluoreszenz) unterzogen (siehe 2.2.9). Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen optischen Schnitte durch die Präparate im Abstand von 1 µm (A-F). In den Abbildungen ist jeweils die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen in der jeweiligen Farbe angegeben.

Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich die Cy3-Fluoreszenz des ODN TM6₄ nach Inkubation mit BJA-B-Zellen innerhalb der Schnittfläche des Nukleus und somit innerhalb des Zellvolumens befindet (Abb. 3.43 B-F).

Es folgte wieder eine Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von CpG-ODN nach Mikroinjektion von BJA-B-Zellen.

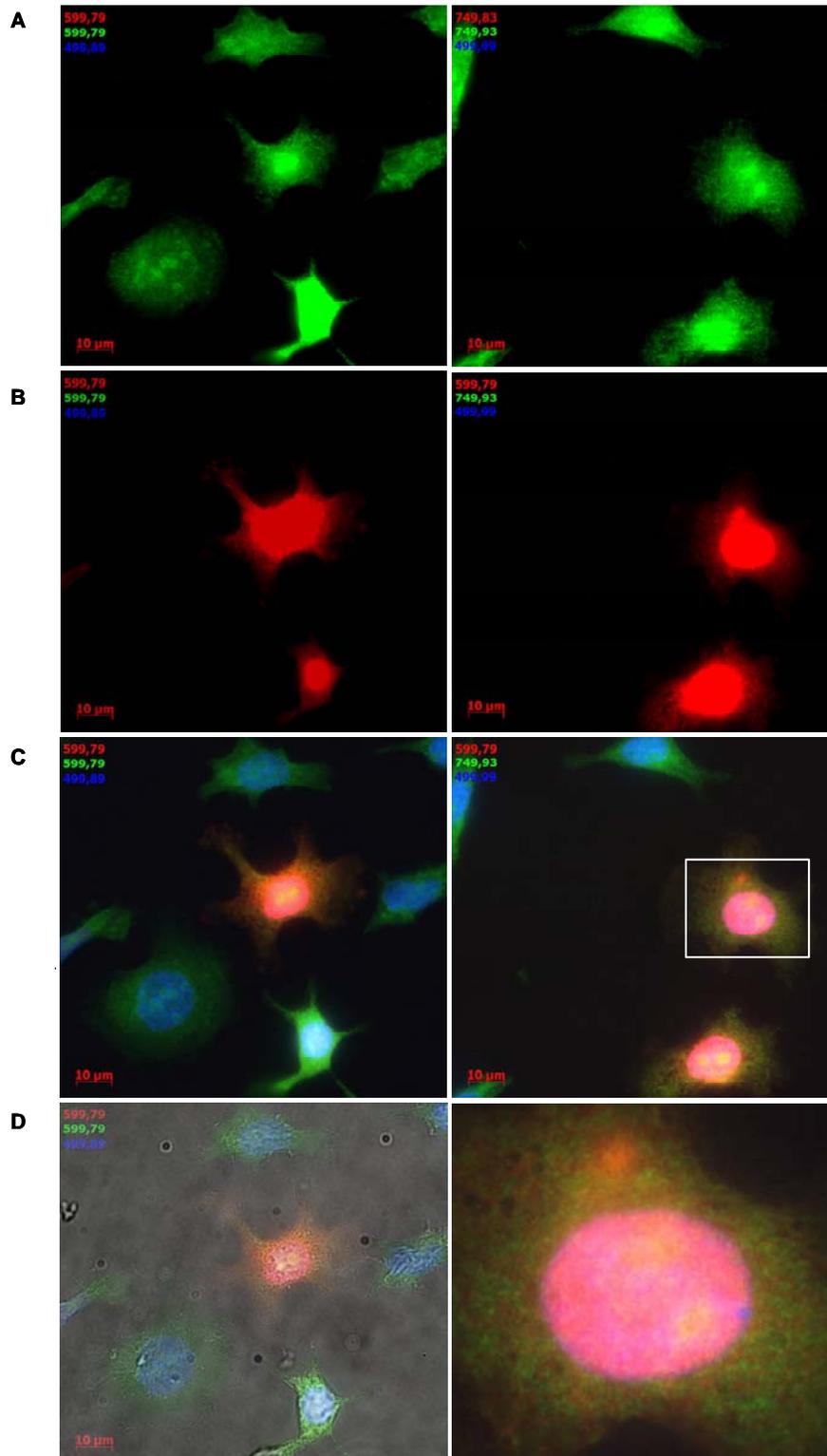


Abb. 3.44: TM6₄ zeigt nach Mikroinjektion überwiegend Kolokalisation mit dem TLR9-Rezeptor

BJA-B-Zellen (1×10^6 Zelle/ml) wurden 48 Std. vor Inkubation in 10 ml Vollmedium in die Petrischalen mit Deckgläschen $\varnothing 12$ mm ausgebracht. Die Zellen wurden mikroinjiziert mit einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ Cy3-markierten ODN TM6₄ (rote Fluoreszenz) inkuviert und anschließend nach Fixierung einer Färbung mit einem FITC-markiertem Antikörper (grüne Fluoreszenz) sowie einer Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blaue Fluoreszenz) unterzogen (siehe 2.2.9). Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und mit Dako-Einbettmedium auf einem Objektträger eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen die konventionelle Fluoreszenz der Präparate. Die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen ist in der jeweiligen Farbe angegeben. **A**, Fluoreszenz des TLR9-Antikörpers (grün) **B**, Fluoreszenz des Cy3-markierten ODN TM6₄ (rot) **C**, Überlagerung der Fluoreszenzen (gelb) **D**, Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme / vergrößerte Darstellung.

Auch bei diesem Mikroinjektionsexperiment konnten die Aufnahmen aufgrund der schwachen Fluoreszenz der mikroinjizierten Cy3-markierten CpG-ODN nur als Abbildung der konventionellen Fluoreszenz und nicht als optischer Schnitt dargestellt werden. Die höchste Fluoreszenzintensität für die Cy3-markierten CpG-ODN konnte jedoch wieder eindeutig im Zellkern beobachtet werden neben einer weit schwächeren, diffusen, cytoplasmatischen Fluoreszenz (Abb. 3.44 B). Der TLR9-Antikörper färbte auch hier wieder cytoplasmatische Bereiche an (Abb. 3.44 A). Allerdings ist in diesen Aufnahmen keine Aussparung des Zellkerns zu sehen, was dadurch erklärt werden kann, dass es sich um eine Darstellung der konventionellen Fluoreszenz handelt und auch die cytoplasmatischen Bereiche oberhalb und unterhalb des Zellkerns berücksichtigt werden. Eine verstärkte Fluoreszenz des FITC-markierten TLR9-Antikörpers im Zellkern trat markanter Weise nur bei Zellen auf, die mikroinjiziert wurden (Vergleich Abb. 3.44 A mit 3.44 B). In den Abbildungen 3.44 C/D ist erkennbar, dass es auch hier nur zu einer teilweisen Kolo-kalisation der Fluoreszenzfarbstoffe kommt (Abb. 3.44 D Vergrößerung).

Bei den Versuchen, in denen fluoreszenzmarkierte CpG-ODN in die Zellen mikroinjiziert wurden, konnte die Cy3-Fluoreszenz immer hauptsächlich im Nukleus der Zelle beobachtet werden, obwohl während der Mikroinjektion versucht wurde, nach Möglichkeit nur in das Cytoplasma zu injizieren. Deshalb stellte sich die Frage, ob bei den analysierten Zellen es doch ungewollter Weise zu einer Injektion in den Zellkern kam oder ob die Oligonukleotide durch einen aktiven Transport in den Zellkern verbracht werden. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden adhären-te BJA-B Zellen erneut mit Cy3-markierten CpG-ODN sowie mit FITC-markiertem Dextran mikroinjiziert. Da das Dextran mit einem Molekulargewicht von 150 kDa zu groß ist, um die Kernmembran zu passieren, sollte der durch die Injektion betroffene Bereich der Zelle durch die FITC-Fluoreszenz bestimmt und mit dem Bereich der Cy3-Fluoreszenz verglichen werden können.

Wie in Abb. 3.45 gezeigt, konnte bei einigen Zellen in das Cytoplasma der Zelle injiziert werden, wodurch dieses eine gleichmäßige grüne Fluoreszenz des FITC-Dextrans aufwies (Abb. 3.45 A). Die rote Fluoreszenz der Cy3-markierten CpG-ODN konnte hingegen wieder fast ausschließlich im Zellkern detektiert werden (Abb. 3.45 B). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass auch die Cy3-markierten ODN ursprünglich in das Cytoplasma mikroinjiziert wurden und im folgenden durch einen Transportmechanismus der Zelle in den Zellkern gelangt sind und dort zurückgehalten wurden.

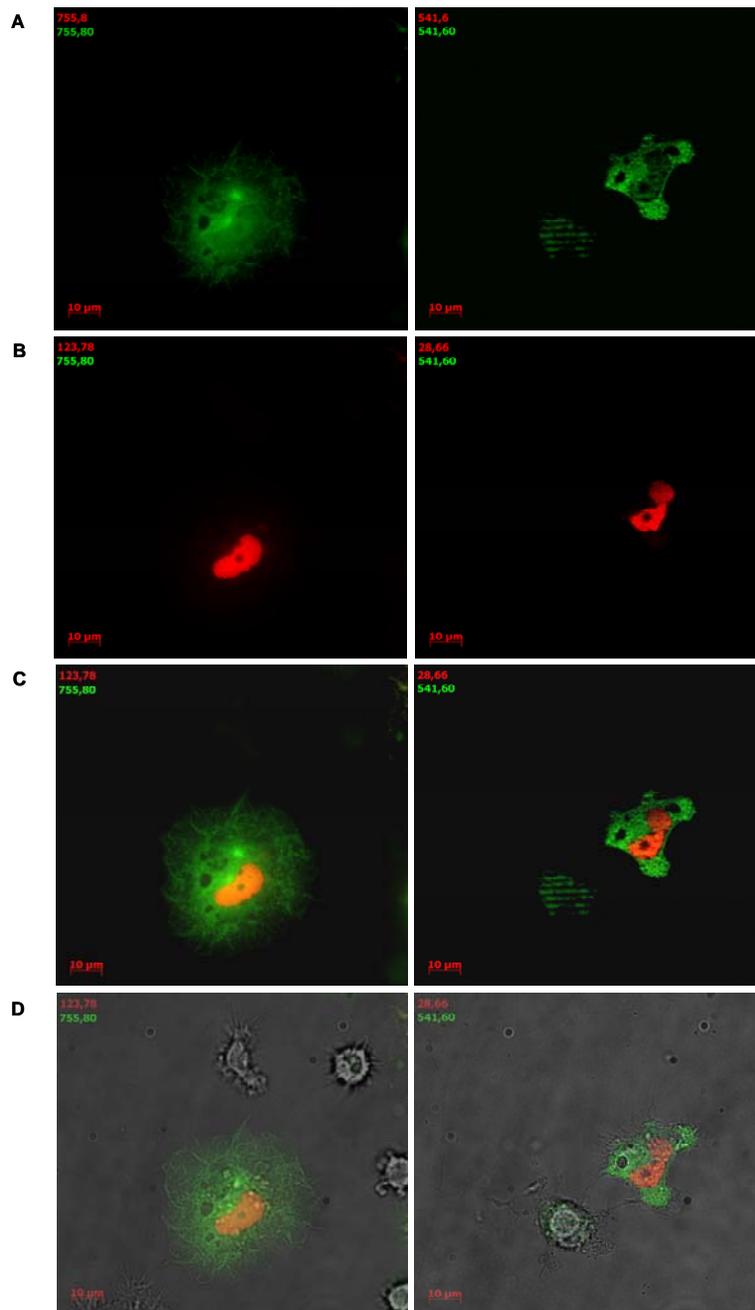


Abb. 3.45: Transport von TM6₄ aus dem Cytoplasma in den Nukleus nach Mikroinjektion

BJA-B-Zellen (1×10^6 Zelle/ml) wurden 48 Std. vor Inkubation in 10 ml Vollmedium in die Petrischalen mit Deckgläschen $\varnothing 12$ mm ausgebracht. Die Zellen wurden komikroinjiziert mit einer Konzentrationen von $30 \mu\text{M}$ Cy3-markierten ODN TM6₄ (rote Fluoreszenz) und einer Konzentrationen von 5mg/ml FITC-Dextran (grüne Fluoreszenz). Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen, auf einen Objektträger gelegt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt ist eine Aufnahme der konventionellen Fluoreszenz (links) und eine Aufnahme der Fluoreszenz als optischer Schnitt (rechts). In den Abbildungen ist jeweils die Belichtungszeit für die Aufnahme der Fluoreszenzen in der jeweiligen Farbe angegeben. **A**, Fluoreszenz des *LysoTracker blue* **B**, Fluoreszenz des Cy3-markierten ODN TM6₄ **C**, Überlagerung der Fluoreszenzen **D**, Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme.

3.6.3 Zwischenfazit zur Bedeutung der intrazellulären Lokalisation von ODN für CpG-vermittelte Immunstimulation

Das Bild, das sich für die Rolle der intrazellulären Lokalisation von CpG-ODN für die Generierung eines immunstimulatorischen Effektes ergibt, bestätigt zunächst die für die Aufnahme ermittelten Versuchsergebnisse, wonach bei den Sequenzen TM6₄, TM6₄-C^{Me} und ODN 2080 keinen Unterschied in der Quantität der zellulären Aufnahme zu beobachten war. Auch bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte kein quantitativer Unterschied in der Internalisierung dieser ODN festgestellt werden sowie auch kein Unterschied in der intrazellulären Lokalisation (Abb. 3.37 und 3.40 Daten nicht für alle ODN gezeigt).

Des Weiteren geben die Ergebnisse der Versuche zur intrazellulären Lokalisation starke Evidenz darauf, dass es möglicherweise einen zweiten Weg zur Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes durch CpG-ODN gibt, der nicht über vesikuläre Aufnahme sondern auch über frei im Cytoplasma vorliegende ODN ausgelöst werden kann, jedoch auch streng CpG-abhängig ist (Abb. 3.35 B und 3.36 B). Das *signalling* scheint hierbei auch über den TLR9-Rezeptor vermittelt zu werden, da nach Mikroinjektion von CpG-ODN zu einem großen Anteil Kolo-kalisation mit dem Rezeptor beobachtet werden konnte (Abb. 3.44).

Es ist jedoch auch möglich, dass CpG-ODN nach Mikroinjektion einen bisher unbekanntem Weg in das lysosomale Kompartiment finden, wo dann das *signalling* ausgelöst wird. Diese Möglichkeit wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nach Mikroinjektion in weiten Bereichen eine meist diffuse, teilweise aber auch vesikuläre Kolo-kalisation zwischen einem Marker für das lysosomale Kompartiment und den CpG-ODN zu beobachten war (Abb. 3.41).

4 Diskussion

Derzeit verdichten sich in der Literatur die Hinweise, dass die zelluläre Aufnahme und die intrazelluläre Lokalisation wichtige Prozesse bei der Vermittlung eines immunstimulatorischen Effektes durch CpG-ODN sein könnten (Leifer *et al.*, 2004; Latz *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse eröffnen eine neue Möglichkeit, die Effizienz dieser Wirkstoffe durch die Modifizierung eben dieser Eigenschaften zu beeinflussen und möglicherweise zu verbessern. Besonders für B-Zellen ist die Bedeutung der Internalisierung und intrazellulärer Verteilung von CpG-ODN jedoch noch nicht untersucht. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Bedeutung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Lokalisation für CpG-vermittelte Immunstimulation in humanen B-Zellen näher zu charakterisieren, um mit diesen Erkenntnissen ein besseres Verständnis der Wirkungsweise und damit eine bessere Grundlage für die Entwicklung neuer, potenter Wirkstoffe auf diesem Gebiet zu schaffen.

4.1 Immunstimulatorische Potenz des „Aufnahme-Motivs“ TM6

CpG-Dinukleotide benötigen im humanen System einen bestimmten Sequenzkontext, um maximale immunstimulatorische Aktivität zu zeigen. Eine der potentesten dieser Sequenzmotive wurde beschrieben als ein Oktamer, das zwei CpG-Dinukleotide enthält (5'-TCGTCGTT-3'; (Hartmann *et al.*, 2000a). Dieses Motiv wurde durch einen systematischen Ansatz identifiziert, ausgehend von einer aus dem murinen System abgeleiteten, CpG-haltigen Sequenz. Demgegenüber war das in dieser Arbeit charakterisierte, CpG-haltige Hexamermotiv (TM6, 5'-TCGTGT-3') das Ergebnis eines kombinatorischen Ansatzes, in welchem ODN mit einer verstärkten, physikalischen, zellulären Aufnahme selektiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass das so identifizierte Hexamermotiv als ein tetrameres ODN ebenfalls eine vergleichbar starke immunstimulatorische Aktivität auf humane B-Zellen zeigt.

In dieser Arbeit wurden zunächst die immunstimulatorischen Effekte des Sequenzmotivs TM6 in humanen B-Zellen charakterisiert. Als Modellsysteme zur Untersuchung der immunstimulatorischen Wirksamkeit von TM6 kamen sowohl die humane, B-lymphoide

Zelllinie BJA-B als auch primäre humane B-Zellen als Bestandteil von humanen PBMCs zum Einsatz. Durch den Einsatz der primären Zellen konnten die für die Zelllinie generierten Versuchsergebnisse bestätigt werden und damit die Berechtigung des Einsatzes der Zelllinie für weitere Versuche gerechtfertigt werden. Zwar variierte das Niveau der ausgelösten Stimulation zwischen den eingesetzten Modellsystemen, jedoch war das Muster der konzentrationsabhängigen Effekte im Vergleich der verschiedenen hier verwendeten Oligonukleotide untereinander vergleichbar (Abb. 3.5 und Abb. 3.8). Beim Einsatz der primären Zellen muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die beobachteten Effekte nicht allein durch die direkte Wirkung der CpG-ODN auf die Zellen generiert wurden, sondern auch ein sekundärer Effekt über beispielsweise in PBMCs ebenfalls enthaltene DCs möglich war.

Für TM6₄ wurde zunächst die CpG-Spezifität der B-Zell-Stimulation untersucht, die sehr hoch war für unmodifizierte ODN sowohl in der Zelllinie BJA-B als auch in primären B-Zellen als Subpopulation von humanen PBMCs. Keines der Derivate mit zerstörtem CpG-Dinukleotid (TM6₄-C/A^{del} und TM6₄-C^{ME}) noch die etablierte Negativkontrolle NOV 2009-A₄ zeigten Stimulation der CD54-Expression, während TM6₄ und die gut charakterisierte Positivkontrolle ODN 2080-C₄ dies taten (Abb. 3.5, Abb. 3.8 und Abb. 3.10). Diese strenge CpG-Spezifität ist augenscheinlich nicht der Fall für die PTO-modifizierte analogen Sequenzen im Falle der primären B-Zellen, da das C^{Me}-Derivat von TM6₄ noch immer signifikant CD54-Expression aktivierte (Abb. 3.8). Die Spezifität für PTO-modifizierte CpG-ODN ist noch deutlich schwächer ausgeprägt im Falle der humanen B-lymphoiden Zelllinie. Hier stimulierten alle PTO-modifizierten ODN CD54 ungeachtet der Anwesenheit eines intakten CpG-Dinukleotids oder der Nukleotid-Sequenz (Abb. 3.8). Sogar das Thio-Derivat von NOV 2009-A₄ stimulierte CD54-Expression bei Konzentrationen ab 150 nM (Abb. 3.10). Diese Ergebnisse waren nicht überraschend, da ein intrinsisches, sequenzunabhängiges immunstimulatorisches Potential von PTO-modifizierten ODN bekannt war (Hartmann *et al.*, 1996). Die Konzentration für die halbmaximale CD54-Stimulation von PTO-modifizierten ODN lag in der Größenordnung von 50 nM in allen hier untersuchten B-Zellen, wogegen dieser Wert für unmodifizierte ODN in der Größenordnung von 300 nM in BJA-B-Zellen und 1 µM bis 2 µM in primären B-Zellen lag (Abb. 3.5, Abb. 3.8 und Abb. 3.10). Weiterhin ist bemerkenswert, dass der maximale Grad der CD54-Stimulation von unmodifizierten ODN in BJA-B-Zellen wie auch in primären B-Zellen ein Niveau der Stimulation erreichte, das

vergleichbar oder sogar höher war als das Stimulationsniveau von PTO-modifizierten ODN, das allerdings bereits bei Konzentrationen in niederen μM Bereich erreicht wurde (Abb. 3.5 und 3.8).

Des Weiteren wurde ebenfalls für das Sequenzmotiv für TM6 die Längenabhängigkeit der B-Zell-Stimulation untersucht. In humanen PBMCs ist eine Länge von mindestens 12 Nukleotiden notwendig, um eine Immunantwort, wie B-Zell-Proliferation oder Sekretion von IL-6 und IgM, auszulösen (Verthelyi *et al.*, 2001). Wie daher zu erwarten war, blieb sowohl das 6mer unwirksam bis zu einer Konzentration von 5 μM als auch das 12mer bis auf eine geringe CD54-Stimulation bei der höchsten eingesetzten Konzentration (Abb. 3.9). Darüber hinaus bestand auch eine klare Abhängigkeit des immunstimulatorischen Effektes von der Länge der eingesetzten ODN, die von 18 Basen (TM6₃) bis 36 Basen (TM6₆) variierten. Es zeigten zwar alle ODN, die 18 Nukleotide lang oder länger waren, maximale Stimulation, aber weiterhin war eine Steigerung der Länge der eingesetzten ODN *invers* korreliert zu der benötigten ODN-Konzentration für halb maximale Stimulation (Abb. 3.9). Es war bemerkenswert, dass TM6₄, ein 24mer mit der selben Länge wie die Positivkontrolle für ein humanes immunstimulatorisches ODN (ODN 2080-C₄) bei hohen Konzentrationen potenter CD54-Expression stimulierte (Abb. 3.9). Eine ähnliche Längenabhängigkeit, jedoch in einem Konzentrationsbereich bis 320 nM, zeigte sich auch für die Phosphorothioat-modifizierten ODN verschiedener Länge von TM6 (Abb. 3.6)

Auch die Abhängigkeit der B-Zell-Stimulation von der Position des CpG-Motives innerhalb der Sequenz eines 24mers wurde für TM6₄ untersucht. Bei den Derivaten mit nur einem TM6-Sequenzmotiv an unterschiedlichen Stellen eines 24mers war in allen Fällen ein signifikanter Verlust der immunstimulatorischen Effektivität verglichen mit der Tetramer-Sequenz TM6₄ zu beobachten. Dieser Effektivitätsverlust war jedoch am größten, wenn das Sequenzmotiv zentral oder am 3' Ende lokalisiert war, jedoch weniger stark bei einer Lokalisation am 5' Ende (Abb. 3.11 B). Man könnte daher spekulieren, dass (im Gegensatz zum Sequenzmotiv in ODN 2080) bei dem Motiv TM6 nicht nur die Position, sondern auch der Kontext *upstream* und *downstream* flankierender Sequenzen eine Rolle spielt bei der Generierung maximaler immunstimulatorischer Aktivität. Aufgrund dieser Beobachtungen könnte man weiterhin die Hypothese aufstellen, dass TM6₄ eine Wirkungsweise besitzt, die sich von der des ODN 2080-C₄ unterscheidet oder eine andere Empfindlichkeit besitzt in Bezug auf den Einfluss der benachbarten Oligo-Cytosine.

Aus der Charakterisierung der immunstimulatorischen Potenz von TM6₄ wurde abgeleitet, dass TM6₄ als PTO-Derivat (S-TM6₄) ein ODN darstellt, das vergleichbar effizient ist wie ein gut charakterisiertes B-Klasse-ODN, ODN 2006 (Hartmann *et al.*, 2000b), im Hinblick auf die CD80-/CD54-Expression. Tatsächlich entspricht S-TM6₄ der Definition eines potenten B-Klasse-ODN. CpG-ODN der B-Klasse haben ein voll modifiziertes PS-Rückrat. Sie besitzen ein oder mehrere CpG-Motive in ihrer Sequenz, jedoch im Gegensatz zu A-Klasse-ODN keine *poly-G*-Motive oder Palindrome (Klinman, 2004). B-Klasse-ODN stimulieren unter anderem stark B-Zell-Aktivierung (Proliferation) (Verthelyi *et al.*, 2001). A-Klasse-ODN stimulieren vor allen IFN-alpha-Sekretion von pDCs. C-Klasse-ODN kombinieren die Effekte von A- und B-Klasse-ODN. Im Gegensatz zu den Klasse-A-ODN sind Klasse-C-ODN Voll-Phosphorothioate, besitzen keine *poly-G*-Motive, jedoch palindromische Sequenzen kombiniert mit stimulatorisch wirksamen CpG-Motiven. Die CpG-Motive sind über einen *Spacer* mit CG-reichen palindromischen Sequenzen verlinkt (5'-CGGCGCGCGCCG-3'). C-Klasse ODN stimulieren sowohl stark IFN- α -Produktion von pDCs sowie auch B-Zell Aktivierung, vergleichbar mit B-Klasse-ODN. Um eine Einteilung anhand der Wirkungsweise des Sequenzmotivs TM6 in eine der drei Klassen von CpG-ODN zu ermöglichen, wurden zur weiteren Charakterisierung der immunstimulatorischen Potenz der Effekt von TM6₄ auf die Proliferation von B-Zellen sowie die Induktion der IFN-alpha-Produktion von pDCs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in primären, humanen B-Zellen interessanterweise das Thio-Derivat von TM6₄ (S-TM6₄) gegenüber der unmodifizierten Sequenz nur eine leichte Zunahme der proliferierenden B-Zellen zeigte, als unmodifizierte Sequenz jedoch sehr effektiv B-Zell-Proliferation induzierte (Abb. 3.12 B). Im humanen pDCs generierte TM6₄ (abhängig von der eingesetzten ODN Konzentration) die zeitpotenteste bzw. eine vergleichbare Induktion von IFN-alpha-Sekretion wie die durch das ODN 2216 als Prototyp eines Klasse-A-ODN erreichten IFN-Menge (Abb. 3.13). Das B-Klasse-ODN 2006 führte hingegen zu der geringsten IFN-alpha-Produktion. Im Hinblick auf die geforderten Sequenzeigenschaften entspricht das ODN S-TM6₄ wie bereits erwähnt der Definition eines potenten B-Klasse-ODN. Aufgrund dieser Versuchsergebnisse zur Wirkungsweise dieses Sequenzmotivs kann es eher in die Kategorie eines C-Klasse-ODN eingeordnet werden, da es sowohl in der Lage ist, B-Zellen zu aktivieren als auch pDCs zur Sekretion von IFN-alpha zu veranlassen. Wenn man versucht, TM6₄ als unmodifiziertes ODN zu klassifizieren, dann kann auf der Basis dieser Studie TM6₄ keiner der bekannten Klassen von ODN zugeordnet werden.

Ein Grund hierfür ist, dass die meisten als aktive Sequenzen im humanen System publizierten CpG-ODN partiell oder komplett PTO-modifiziert sind. Ein weiterer Grund ist, dass die Positivkontrolle für ein wirksames, unmodifiziertes ODN im humanen System, ODN 2080, nicht in eine der Klassen von A-, B-, oder C-ODN eingeteilt wurde.

4.2 Bedeutung der zellulären Aufnahme für CpG-vermittelte Immunstimulation

Durch den Einsatz einer äußerst sensitiven Methode zur Quantifizierung der intrazellulären ODN-Konzentration konnte die ODN-Menge, die verantwortlich für die Generierung eines bestimmten immunstimulatorischen Effektes war, quantitativ bestimmt werden. Für die Generierung des maximalen Effektes bei Inkubation von BJA-B-Zellen mit einer Endkonzentration von 5 μM ODN konnten nach 44 Std. Inkubationszeit intrazellulär im Mittel 200 fmol TM₆₄ in 200.000 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.14), was einer Konzentration von im Mittel 6×10^5 Kopien/Zelle entspricht. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die in unabhängig durchgeführten Zellkultur-Experimenten erhobenen Daten hohe Standardabweichungen zwischen den einzelnen Versuchstagen zeigten. So lagen die für die Aufnahme von 1 μM TM₆₄ bestimmten, intrazellulären ODN-Konzentrationen zwischen 50 fmol und 700 fmol (Abb. 3.17 und Abb. 3.24). Die Auswertung mehrerer, unabhängiger Zellkulturexperimente zur zellulären Aufnahme bei gleichen Versuchsbedingungen ist daher stets mit hohen Standardabweichungen behaftet (Abb. 3.14). Das Pattern der physikalischen Aufnahme war jedoch in Betracht auf die verschiedenen Oligonukleotide untereinander stets vergleichbar. Bei vielen Abbildungen ist daher auch nur ein Experiment beispielhaft für mehrere durchgeführte Experimente gezeigt. Für die Betrachtung der Korrelation zwischen zellulärer Aufnahme und immunstimulatorischem Effekt muss jedoch auf jeden Fall den Daten am meisten Gewicht zugemessen werden, bei denen die Werte für physikalische Aufnahme von ODN und Immunstimulation parallel an einen Versuchstag gewonnen wurden.

Die Charakterisierung der Aufnahme von TM₆₄ ergab eine Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Internalisierung (Abb. 3.17), die einherging mit der Konzentrationsabhängigkeit des immunstimulatorischen Effektes. Allerdings war im Konzentrationsbereich zwischen 1 μM und 5 μM , in dem der immunstimulatorische Effekt keine Steigerung mehr zeigte,

immer noch eine Zunahme der Aufnahme zu beobachten (Abb. 3.17 A und B). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass sich ab einer bestimmten ODN-Konzentration der Effekt in der Sättigung befindet, so dass es auch durch weiter vermehrte Aufnahme nicht mehr zu einer Steigerung des Effektes kommen kann. So ist es z.B. möglich, dass die Expression von CD54 wegen limitierender zellulärer Prozesse wie etwa der m-RNA-Transkription oder deren Translation nicht mehr gesteigert werden kann. Es stellt sich daher die Frage, warum es trotz der Limitierung des Effektes für die Zelle sinnvoll ist, weiter CpG-ODN zu internalisieren. Denkbar wäre, dass diese beispielsweise nicht sofort mit dem signalauslösenden Rezeptor TLR9 in Kontakt gebracht werden sondern länger in endosomalen Kompartimenten verweilen und so zu einem verlängerten Anhalten des immunstimulatorischen Effektes führen. Diese Hypothese ist jedoch höchst spekulativ. Es wäre jedoch interessant, diese Fragestellung im Anschluss an diese Arbeit zu untersuchen.

Eine zeitabhängige Zunahme der zellulären Internalisierung von TM6₄ konnte nicht gezeigt werden, da eine rapide Degradation der ODN stattfand, weshalb zeitabhängige intrazelluläre ODN-Konzentration und die zeitabhängige CD54-Expression *invers* korreliert waren (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Diese Experimente sowie auch die Experimente zum Koinkubator vermittelten Nukleaseschutz (Abb. 3.24) verdeutlichten vor allem den großen Einfluss, den Degradation bei der Generierung von Versuchsergebnissen haben kann. Durch einen Versuch, in dem 1 µM drei verschiedener ODN (TM6₄, ON ah2 und ON ah3) in Zelllysate von 200.000 BJA-B-Zellen für 44 Std. bei 37°C inkubiert wurden und die Menge der ODN nach 44 Std. gegen mitgeführte Extraktionskontrollen quantifiziert wurde, konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Vergleich der Aufnahme von ODN verschiedener Sequenzen (Abb. 3.1) um einen Effekt höherer Degradationsresistenz der Sequenz TM6₄ handelte (Daten nicht gezeigt). Die Sequenz TM6₄ wurde im Gegenteil mit 20% (+/-4%) stärker abgebaut, als die Sequenzen ON ah2 mit 1%(+/-6%) und ON ah3 mit 7%(+/-1%). Deshalb könnte in Betracht gezogen werden, dass der ermittelte Faktor 3 an gesteigerter Aufnahme für das Sequenzmotiv TM6 gegenüber anderen Sequenzen tendenziell noch unterschätzt wurde, da diese Sequenz einer verstärkten Degradation unterworfen zu sein scheint.

Die nachfolgenden Untersuchungen zur Korrelation der zellulären Aufnahme von CpG-ODN mit deren immunstimulatorischem Effekt ergaben eine klare Sequenzabhängigkeit der Aufnahme von ODN in B-Zellen (Abb. 3.1, Abb. 3.25 und Abb. 3.28).

Auch in der Literatur gibt es zunehmend Evidenz dafür, dass unmodifizierte DNA durch einen spontanen, *Facilitator*-unabhängigen Weg in Zellen gelangt sowohl in Zellkultur (Zhao et al., 1996a; Gray et al., 1997; Laktionov et al., 1999) als auch *in vivo* [reviewed in (Budker et al., 2000)]. Für CpG-ODN ist dies ebenfalls ein bekanntes Phänomen. Im Falle von doppelsträngiger DNA konnte für diese spontane, zelluläre Internalisierung gezeigt werden, dass sie auch von der Nukleotidsequenz beeinflusst wird. Diese sequenzabhängige Art und Weise der zellulären Aufnahme wurde für Säugerzellen beschrieben, besonders für die Zelllinie BHK-21 (Lehmann and Sczakiel, 2005). Aus diesem Grund erschien es vernünftig, auch die Hypothese einer sequenzabhängigen, zellulären Aufnahme für einzelsträngige DNA und auch für solche oligomerer Länge zu untersuchen.

Es ist überdies überraschend, dass es eine offensichtliche Relation zwischen CpG-spezifischer Immunstimulation und verstärkter zellulärer Aufnahme von TM6 zu geben scheint (Abb. 3.25 und 3.28). Es sollte erwähnt werden, dass eine mit diesen Zusammenhängen konsistente Beobachtung beschrieben wurde, in welcher ebenfalls überwiegend CpG-haltige ODN bei einer Selektion auf verstärkte Aufnahme in humanen B-lymphoiden Zellen identifiziert wurden (Wu et al., 2003). Ziel der erwähnten Arbeit war es, ODN-Eigenschaften zu identifizieren, die ihre zelluläre Aufnahme erleichtern und damit den durch uneffektive Internalisierung begrenzten, therapeutischen Einsatz von ODN zu verbessern. Dazu wurde eine repetitive Selektions-Prozedur über zehn Runden in der humanen B-Zelllinie Ramos mit wenigstens 10^{14} verschiedenen ODN durchgeführt. Es wurden vor allem ODN identifiziert, die 3'-terminal Guanodin-reiche Sequenzen besaßen und ODN, die potenziell immunstimulatorisch wirksame CpG-Sequenzmotive (5'-TCGT-3') enthielten. Die verbesserte zelluläre Aufnahme von selektionierten Sequenzen gegenüber *random*-Sequenzen konnte im nachhinein durch einen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme-*assay* bestätigt werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass effiziente Aufnahme von ODN auf einer Multimerisierung der Sequenzen beruht, die von den G-reichen Sequenzabschnitten vermittelt wird. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Zellen durch Inkubation mit aggregierenden, CpG-haltigen ODN einen starken immunstimulatorischen Effekt (gemessen in CD40-Expression) zeigten, was nicht der Fall war bei nicht-aggregierenden CpG-ODN. Diese Erkenntnisse könnten einen Hinweis liefern auf den Grund des signifikanten Verlustes der immunstimulatorischen Effektivität bei den Derivaten mit nur einem TM6-Sequenzmotiv innerhalb eines 24mers (Abb. 3.11 B).

Es wäre denkbar, dass durch die Substitution der *poly*-meren TM6-Sequenzmotive durch eine *poly*-C-Sequenz die Möglichkeit des ODN zur Di- oder Multimerisierung verloren geht und damit die Fähigkeit der Vermittlung eines potenten immunstimulatorischen Effektes.

Die beschriebene Korrelation von Aufnahme und ausgelöstem immunstimulatorischem Effekt trifft jedoch nicht zu beim Vergleich von ODN gleicher Sequenz mit intaktem und zerstörtem CpG-Motiv. Da hier eine vergleichbare Aufnahme trotz prägnant unterschiedlichem Effekt beobachtet wurde (Abb. 3.14), ist auszuschließen, dass die Aufnahme die entscheidende Hürde für die Auslösung eines immunstimulatorischen Effektes ist. Vielmehr muss postuliert werden, dass es nach der zellulären Aufnahme einen weiteren Schritt bzw. Mechanismus geben muss, der über die Auslösung eines Effektes entscheidet, wie beispielsweise die Wechselwirkung mit dem TLR9-Rezeptor. Auch bei der Betrachtung PTO-modifizierter-ODN trifft diese Korrelation von Aufnahme und ausgelöstem immunstimulatorischem Effekt nicht zu (Abb. 3.15 und 3.16). Möglicherweise handelt es sich bei dem durch PTO-ODN ausgelösten immunstimulatorischen Effekt um einen anderen Wirkmechanismus aufgrund der chemischen Modifikation, da auch non CpG-Motive immunstimulatorisch wirksam sind. Es kann spekuliert werden, dass hier evtl. keine Aufnahme der ODN in die Zelle nötig ist für die Auslösung des Effektes. Außerdem erfolgt die zelluläre Aufnahme der PTO-ODN sehr schnell und in großer Menge (Abb. 3.22), weshalb sie wahrscheinlich nicht den *rate limiting step* für die Auslösung des Effektes darstellt.

Wenn man voraussetzt, dass die kritische Interaktion zwischen CpG-ODN und ihrem Rezeptor TLR9 innerhalb des endosomalen/lysosomalen Kompartiments stattfindet, dann kann spekuliert werden, dass TM6 die Translokation vom extrazellulärem Raum in dieses Kompartiment steigert. Tatsächlich zeigen die parallel durchgeführten Versuche zur CpG-vermittelten Stimulation der CD54-Expression und der physikalischen Internalisierung von CpG-ODN gleiche Faktoren und Muster für die untersuchten ODN (Abb. 3.25 und 3.28), was auf einen Zusammenhang der Prozesse hinweist. Diese Ergebnisse sind kompatibel mit der Ansicht, dass *downstream* Prozesse der Internalisierung rapide ablaufen und keinen *rate limiting sep* darstellen. Das heißt, dass der Aufnahmeschritt den Flaschenhals der CpG-vermittelten Immunstimulation darstellen könnte, was auch bereits von anderen Arbeitsgruppen postuliert wurde (Sester *et al.*, 2000).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Verbesserung dieses Schrittes in einer größeren biologischen Effektivität von CpG-ODN resultieren sollte.

4.3 Bedeutung der intrazellulären Lokalisation für CpG-vermittelte Immunstimulation

Die bisherigen Erkenntnisse zur Wirkungsweise von CpG-ODN auf zellulärer Ebene wurden hauptsächlich durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in dendritischen Zellen sowie in Zelllinien wie HEK gewonnen (Latz *et al.*, 2004).

Aussagen auf der Basis fluoreszenzmikroskopischer Daten zu treffen ist jedoch vor allen Dingen deshalb schwierig, da nicht eingeschätzt werden kann, welcher Anteil der intrazellulär nachgewiesenen ODN-Konzentration den biologisch wirksamen bzw. für den generierten Effekt verantwortlichen Anteil darstellt. Ein sehr geringer biologisch wirksamer Anteil der gesamten intrazellulären ODN-Menge würde sich beispielsweise völlig der Analyse des Betrachters entziehen. Zudem machte das Modellsystem der B-Zelle die Versuche schwer durchführbar, da immer unter Versuchsbedingungen gearbeitet werden musste, bei denen die Zellen zur Adhärenz neigten. Bei Zellen, die die ursprüngliche Morphologie als runde Suspensionszellen zeigten, waren fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einer ausreichenden Auflösung des Cytoplasmas nicht mehr möglich, da dieses sich nur noch in einem räumlich stark begrenzten Bereich um den Zellkern befand und Differenzierung der cytoplasmatischen Kompartimente *quasi* nicht mehr zuließ (Abb. 3.40). Zudem hatten die Zellen verglichen mit anderen Zelllinien, die oft für mikroskopische Untersuchungen verwendet werden (wie beispielsweise HEK oder HELA), eine sehr geringe Gesamtgröße, was die Experimente zusätzlich erschwerte.

Es sollte untersucht werden, welche Bedeutung die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse über die Wirkungsweise von CpG-ODN in B-Zellen haben. Zu diesem Zweck wurde sich neben fluoreszenzmikroskopischer Methoden auch zweier weiterer Methoden bedient. Durch Mikroinjektion und Elektroporation von CpG-ODN sollte überprüft werden, ob CpG-ODN im endosomalen/lysosomalen Kompartiment vorliegen müssen, um mit dem TLR9-Rezeptor in Wechselwirkung zu treten und die Signalkaskade für die Generierung eines immunstimulatorischen Effektes auszulösen.

Durch die Anwendung der Mikroinjektion bzw. Elektroporation sollten CpG-ODN intrazellulär appliziert werden, ohne dass sie sich in vesikulären Strukturen befinden. Diese so applizierten, frei im Zellkern oder Cytoplasma befindlichen ODN, sollten laut bestehender Hypothese nicht in der Lage sein, einen immunstimulatorischen Effekt auszulösen. Allerdings traten bei der Mikroinjektion andere Probleme auf, wie beispielsweise die stark begrenzte Anzahl an erfolgreich injizierten Zellen, für die durch diese Methode ein Wert für die relative CD54-Expression im Durchfluscytometer gewonnen werden konnte. Wenn man bedenkt, dass standardmäßig für die Generierung eines Messwertes 10.000 Zellen im Durchfluscytometer analysiert werden, dann sind die in diesem Experiment gewonnenen Werte für die CD54-Expression, die sich nur auf 8-38 Einzelzellen zurückführen lassen, (Tabelle. 3.1) doch sehr differenziert zu betrachten. Allerdings spricht die doch erstaunlich geringe Standardabweichung für die Validität dieser Experimente (Abb. 3.35).

Außerdem konnten die hier gewonnenen Erkenntnisse anschließend durch die Applikation von CpG-ODN durch Elektroporation bestätigt werden (Abb. 3.36). So konnte gezeigt werden, dass die Auslösung eines streng CpG-abhängigen immunstimulatorischen Effektes auch über frei im Cytoplasma vorliegende ODN stattfinden kann. Zur Beurteilung dieser Versuche sollte weiterhin zur Kenntnis genommen werden, dass auch ein TLR9-unabhängiger cytosolischer Signalweg der DNA-Detektion beschrieben wurde (Okabe et al., 2005; Ishii et al., 2006). Gegen diese Möglichkeit zur Erklärung der Versuchsergebnisse spricht jedoch die strenge CpG-Abhängigkeit, die für die Immunstimulation durch Mikroinjektion und Elektroporation von ODN beobachtet wurde (Abb. 3.35 B und 3.36 B). Mit fluoreszenzmikroskopischen Experimenten sollte anschließend untersucht werden, wie es zu diesem Effekt kam.

Das Bild, das sich für die Rolle der intrazellulären Lokalisation von CpG-ODN für die Generierung eines immunstimulatorischen Effektes ergibt, bestätigt zunächst die für die Aufnahme ermittelten Versuchsergebnisse, wonach bei den Sequenzen TM6₄, TM6₄-C^{Me} und ODN 2080 kein Unterschied in der Quantität der zellulären Aufnahme zu beobachten war. Auch bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte kein quantitativer Unterschied in der Internalisierung dieser ODN festgestellt werden, als auch kein Unterschied in der intrazellulären Lokalisation (Abb. 3.37 und 3.40; Daten nicht für alle ODN gezeigt).

Diese Ergebnisse unterstützen erneut die Hypothese, dass es einen weiteren Schritt nach der zellulären Aufnahme und auch nach der intrazellulären Verteilung von CpG-ODN geben muss, der über die Auslösung eines Effektes entscheidet, wie beispielsweise die Wechselwirkung mit dem TLR9-Rezeptor.

Es konnte zunächst nach Inkubation von BJA-B-Zellen mit TM₆₄ von 5 min, wobei die gewählte Inkubationszeit analog zu den in der Literatur beschriebenen Experimenten war (Latz *et al.*, 2004), nur in seltenen Fällen Kolokalisation von CpG-ODN und einem lysosomalen Marker beobachtet werden (Abb. 3.37). Dies änderte sich nach einer längeren Inkubationszeit von 12 Std., wobei es jedoch auch durch das Abkugeln der Zellen zu nicht sehr differenzierten Aufnahmen kam (Abb. 3.40). Nach Mikroinjektion von BJA-B-Zellen mit TM₆₄ war die höchste Fluoreszenzintensität bei allen Zellen im Nukleus zu beobachten. Außerdem konnte eine diffus verteilte Fluoreszenz über das gesamte Cytoplasma beobachtet werden (Abb. 3.41 B). Es war jedoch auch zu sehen, dass nach Mikroinjektion von CpG-ODN auch vesikuläre Strukturen innerhalb einiger Zellen auftraten (Abb. 3.41 B links). Analog zu den Inkubationsexperimenten zeigte sich jedoch auch bei Mikroinjektion kein eindeutiger *Match* mit den durch den *Lysotracker* angefärbten Bereichen (Abb. 3.41 C/D).

Eine Beobachtung der intrazellulären Prozesse über längere Zeiträume war aufgrund des schnellen Ausbleichens einiger eingesetzter Fluoreszenzfarbstoffe (wie beispielsweise des lysosomalen Markers) nicht durchführbar. Zudem ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt das CpG-vermittelte *signalling* in der Zelle ausgelöst wird und welcher Anteil der intrazellulär beobachteten ODN Konzentration den biologisch wirksamen Anteil darstellt. Aus diesen Gründen reichen die in B-Zellen gemachten Beobachtungen nicht aus, um definitive Aussagen über die Rolle der intrazellulären Lokalisation nach Inkubation bzw. Mikroinjektion für das CpG-vermittelte *signalling* zu treffen. Es kann spekuliert werden, ob Lokalisation in lysosomalen Kompartimenten auch nach Mikroinjektion auf bisher unbekanntem Wege stattfinden kann oder lysosomale Kompartimentierung in B-Zellen nicht notwendig ist für die Generierung eines Effektes. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch, dass auch für CpG-vermittelte Immunstimulation in B-Zellen Acidifikation als essentieller Schritt für die Signalauslösung beschrieben wurde (Yi *et al.*, 1998b). Einen Hinweis für die erste Hypothese liefert die Beobachtung, dass nach Mikroinjektion in weiten Bereichen eine meist diffuse, teilweise aber auch vesikuläre Kolokalisation zwischen dem Marker für das lysosomale Kompartiment und den CpG-ODN zu beobachten war (Abb. 3.41).

Wie bereits erwähnt, können zu den genauen Mechanismen aufgrund der Versuchsergebnisse jedoch nur Vermutungen angestellt werden.

Das *signalling* schien jedoch bei beiden Applikationsarten von CpG-ODN über den TLR9-Rezeptor vermittelt zu werden, da sowohl nach Inkubation als auch nach Mikroinjektion von CpG-ODN zu einem großen Anteil Kollokalisierung mit dem Rezeptor beobachtet werden konnte (Abb. 3.42 und Abb. 3.44). Allerdings ließ sich auch hier kein Unterschied in der intrazellulären Verteilung zwischen CpG-haltigen und nicht CpG-haltigen ODN feststellen (z.B. TM6₄ und TM6₄-C^{Me}; Daten nicht gezeigt). Es bleibt daher unklar, welcher Schritt nach der zellulären Aufnahme und auch nach der intrazellulären Verteilung von CpG-ODN über die Auslösung eines Effektes entscheidet.

4.4 Ausblick

Auf einem mehr basalen und generellen Level beschreibt diese Arbeit das *proof-of-concept* für den Einsatz von kurzen Nukleotid-Sequenzenmotiven als Facilitatoren der apparenten zellulären Aufnahme, das heißt in diesem speziellen Fall des Trans-Membran-Transports eines oligomeren Cargos *in cis*. In Zellkultur und primären Geweben *ex vivo* gelingt es häufig, oligomere Wirkstoffe in ihre Zielzellen einzuschleusen durch eine große Bandbreite an *Carrier*-Systemen und biochemische oder physikalische Methoden (Mutwiri *et al.*, 2004). *In vivo* können die meisten dieser *Delivery*-Methoden jedoch nicht eingesetzt werden, und keines dieser Systeme scheint derzeit zufriedenstellend für die Applikation beim Menschen. Deshalb bleibt ein effizientes Delivery von therapeutisch wirksamen ODN eine der größten technischen Hürden *in vivo*.

Aus dieser Studie könnte man ableiten, dass das *Delivery* von oligomeren Wirkstoffen in Säuger-Zielzellen und Zielgewebe durch die Technologie eines Transportmotivs *in cis* gesteigert werden kann, in Zellkultur und möglicherweise auch *in vivo*. Dieses könnte die erfolgreiche Applikation von therapeutischen, oligomeren Nukleinsäuren in verschiedenen Anwendungsgebieten einschließlich der Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe und der molekularen Medizin verbessern oder sogar ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Bakterielle DNA enthält unmethylierte CpG-Motive, die eine Simulation des Immunsystems bei Vertebraten auslösen. Diesen stimulatorischen Effekt können auch synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die ein CpG-Motiv enthalten, hervorgerufen. Derzeit ist nicht geklärt, welche Rolle die zelluläre Aufnahme und die intrazelluläre Lokalisation für die Vermittlung des immunstimulatorischen Effektes spielen. Dies gilt besonders für B-Zellen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Bedeutung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Lokalisation für CpG-vermittelte Immunstimulation in humanen B-Zellen zu charakterisieren, um mit diesen Erkenntnissen ein besseres Verständnis der Wirkungsweise und damit eine Grundlage für die Entwicklung neuer, potenter Wirkstoffe auf diesem Gebiet zu schaffen.

Das Sequenzmotiv TCGTGT wurde als Aufnahmemotiv selektioniert und enthielt ein CpG-Motiv. Daher lag es nahe, seine immunstimulatorischen Eigenschaften zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass das Motiv TCGTGT immunstimulatorisch hoch potent und der Effekt bei unmodifizierten ODN streng abhängig von einem intakten CpG-Motiv war, was bei Phosphorothioat-modifizierten ODN nicht der Fall war. Das Tetramer dieses Motivs TM₆₄ generierte eine ähnlich starke, zum Teil sogar stärkere CD54- und CD80-Expression in der B-lymphoiden Zelllinie BJA-B und primären B-Zellen, als das beste für das humane System beschriebene ODN 2080 und verursachte ähnlich starke Proliferation von primären B-Zellen.

Es konnte eine konzentrationsabhängige Aufnahme des CpG-ODN TM₆₄ nachgewiesen werden, die nach 44 Std. bei 5 µM ODN-Inkubation einer Konzentration von im Mittel 6×10^5 Kopien/Zelle entsprach. Die zelluläre Aufnahme von CpG-ODN korrelierte dabei mit deren immunstimulatorischem Effekt bei einer klaren Sequenzabhängigkeit der Aufnahme von ODN in B-Zellen. Diese strenge Korrelation war nicht zu beobachten beim Vergleich von ODN gleicher Sequenz mit intaktem und zerstörtem CpG-Motiv, da hier eine vergleichbare Aufnahme trotz prägnant unterschiedlicher Effekte beobachtet wurde.

Auch bezüglich der intrazellulären Lokalisation dieser ODN konnte kein Unterschied beobachtet werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Auslösung eines streng CpG-abhängigen, immunstimulatorischen Effektes auch über im Cytoplasma vorliegende ODN stattfinden kann. Das *signalling* schien hierbei auch über den TLR9-Rezeptor vermittelt zu werden, da nach Mikroinjektion von CpG-ODN zu einem großen Anteil Kolo-kalisation mit dem Rezeptor beobachtet wurde.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die zelluläre Aufnahme nachweislich eine bedeutende Rolle in der Generierung eines CpG-vermittelten Effektes spielt und damit von großer Bedeutung für die weitere systematische Entwicklung von Therapeutika sein kann. Allerdings ergibt sich kein so eindeutiges, klares Bild für die Rolle der intrazellulären Lokalisation von CpG-ODN in B-Zellen für den immunstimulatorischen Effekt. Die verschiedenen Deutungsmöglichkeiten der Versuchsergebnisse werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. Ahmad-Nejad,P., Hacker,H., Rutz,M., Bauer,S., Vabulas,R.M., and Wagner,H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.*, **32**, 1958-1968.
2. Akira,S. (2003). Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, **278**, 38105-38108.
3. Anselmet,A., Mayat,E., Wietek,S., Layer,P.G., Payrastre,B., and Massoulie,J. (2002). Non-antisense cellular responses to oligonucleotides. *FEBS Lett.*, **510**, 175-180.
4. Askew,D., Chu,R.S., Krieg,A.M., and Harding,C.V. (2000). CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J. Immunol.*, **165**, 6889-6895.
5. Ban,E., Dupre,L., Hermann,E., Rohn,W., Vendeville,C., Quatannens,B., Ricciardi-Castagnoli,P., Capron,A., and Riveau,G. (2000). CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo. *Int. Immunol.*, **12**, 737-745.
6. Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., and Palucka,K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 767-811.
7. Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245-252.
8. Barton,G.M., Kagan,J.C., and Medzhitov,R. (2006). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.*, **7**, 49-56.
9. Bartz,H., Mendoza,Y., Gebker,M., Fischborn,T., Heeg,K., and Dalpke,A. (2004). Poly-guanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes. *Vaccine*, **23**, 148-155.
10. Bauer,M., Redecke,V., Ellwart,J.W., Scherer,B., Kremer,J.P., Wagner,H., and Lipford,G.B. (2001a). Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J. Immunol.*, **166**, 5000-5007.
11. Bauer,S., Kirschning,C.J., Hacker,H., Redecke,V., Hausmann,S., Akira,S., Wagner,H., and Lipford,G.B. (2001b). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 9237-9242.
12. Behboudi,S., Chao,D., Klenerman,P., and Austyn,J. (2000). The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology*, **99**, 361-366.
13. Bernasconi,N.L., Onai,N., and Lanzavecchia,A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*, **101**, 4500-4504.

14. Bird,A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, **16**, 6-21.
15. Brunner,C., Seiderer,J., Schlamp,A., Bidlingmaier,M., Eigler,A., Haimerl,W., Lehr,H.A., Krieg,A.M., Hartmann,G., and Endres,S. (2000). Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J. Immunol.*, **165**, 6278-6286.
16. Budker,V., Budker,T., Zhang,G., Subbotin,V., Loomis,A., and Wolff,J.A. (2000). Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J. Gene Med.*, **2**, 76-88.
17. Chen,W., Yu,Y., Shao,C., Zhang,M., Wang,W., Zhang,L., and Cao,X. (2001a). Enhancement of antigen-presenting ability of B lymphoma cells by immunostimulatory CpG-oligonucleotides and anti-CD40 antibody. *Immunol. Lett.*, **77**, 17-23.
18. Chen,Y., Lenert,P., Weeratna,R., McCluskie,M., Wu,T., Davis,H.L., and Krieg,A.M. (2001b). Identification of methylated CpG motifs as inhibitors of the immune stimulatory CpG motifs. *Gene Ther.*, **8**, 1024-1032.
19. Coley,W.B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop. Relat Res.*, 3-11.
20. Dalpke,A.H., Zimmermann,S., Albrecht,I., and Heeg,K. (2002). Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology*, **106**, 102-112.
21. Davis,H.L., Weeratna,R., Waldschmidt,T.J., Tygrett,L., Schorr,J., and Krieg,A.M. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.*, **160**, 870-876.
22. Fearon,K., Marshall,J.D., Abbate,C., Subramanian,S., Yee,P., Gregorio,J., Teshima,G., Ott,G., Tuck,S., Van Nest,G., and Coffman,R.L. (2003). A minimal human immunostimulatory CpG motif that potently induces IFN-gamma and IFN-alpha production. *Eur. J. Immunol.*, **33**, 2114-2122.
23. Gekeler,V., Gimmnich,P., Hofmann,H.P., Grebe,C., Rommele,M., Leja,A., Baudler,M., Benimetskaya,L., Gonser,B., Pieleis,U., Maier,T., Wagner,T., Sanders,K., Beck,J.F., Hanauer,G., and Stein,C.A. (2006). G3139 and other CpG-containing immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxynucleotides are potent suppressors of the growth of human tumor xenografts in nude mice. *Oligonucleotides.*, **16**, 83-93.
24. Gibbard,R.J., Morley,P.J., and Gay,N.J. (2006). Conserved Features in the Extracellular Domain of Human Toll-like Receptor 8 Are Essential for pH-dependent Signaling. *J. Biol. Chem.*, **281**, 27503-27511.

25. Gray,G.D., Basu,S., and Wickstrom,E. (1997). Transformed and immortalized cellular uptake of oligodeoxynucleoside phosphorothioates, 3'-alkylamino oligodeoxynucleotides, 2'-O-methyl oligoribonucleotides, oligodeoxynucleoside methylphosphonates, and peptide nucleic acids. *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1465-1476.
26. Gursel,I., Gursel,M., Ishii,K.J., and Klinman,D.M. (2001). Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J. Immunol.*, **167**, 3324-3328.
27. Hacker,H., Mischak,H., Miethke,T., Liptay,S., Schmid,R., Sparwasser,T., Heeg,K., Lipford,G.B., and Wagner,H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.*, **17**, 6230-6240.
28. Hartmann,G., Battiany,J., Poeck,H., Wagner,M., Kerkmann,M., Lubenow,N., Rothenfusser,S., and Endres,S. (2003). Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, **33**, 1633-1641.
29. Hartmann,G. and Krieg,A.M. (2000a). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.*, **164**, 944-953.
30. Hartmann,G., Krug,A., Waller-Fontaine,K., and Endres,S. (1996). Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin. *Mol. Med.*, **2**, 429-438.
31. Hartmann,G., Weeratna,R.D., Ballas,Z.K., Payette,P., Blackwell,S., Suparto,I., Rasmussen,W.L., Waldschmidt,M., Sajuthi,D., Purcell,R.H., Davis,H.L., and Krieg,A.M. (2000b). Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.*, **164**, 1617-1624.
32. Hartmann,G., Weiner,G.J., and Krieg,A.M. (1999). CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 9305-9310.
33. He,H. and Kogut,M.H. (2003). CpG-ODN-induced nitric oxide production is mediated through clathrin-dependent endocytosis, endosomal maturation, and activation of PKC, MEK1/2 and p38 MAPK, and NF-kappaB pathways in avian macrophage cells (HD11). *Cell Signal.*, **15**, 911-917.
34. 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.

35. Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408**, 740-745.
36. Hornung,V., Rothenfusser,S., Britsch,S., Krug,A., Jahrsdorfer,B., Giese,T., Endres,S., and Hartmann,G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.*, **168**, 4531-4537.
37. Ishii,K.J., Coban,C., Kato,H., Takahashi,K., Torii,Y., Takeshita,F., Ludwig,H., Sutter,G., Suzuki,K., Hemmi,H., Sato,S., Yamamoto,M., Uematsu,S., Kawai,T., Takeuchi,O., and Akira,S. (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.*, **7**, 40-48.
38. Ishii,K.J., Gursel,I., Gursel,M., and Klinman,D.M. (2004). Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **6**, 166-174.
39. Ito,S., Ishii,K.J., Shirota,H., and Klinman,D.M. (2004). CpG oligodeoxynucleotides improve the survival of pregnant and fetal mice following *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.*, **72**, 3543-3548.
40. Jahrsdorfer,B., Jox,R., Muhlenhoff,L., Tschöep,K., Krug,A., Rothenfusser,S., Meinhardt,G., Emmerich,B., Endres,S., and Hartmann,G. (2002). Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 83-92.
41. Kadowaki,N., Ho,S., Antonenko,S., Malefyt,R.W., Kastelein,R.A., Bazan,F., and Liu,Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.*, **194**, 863-869.
42. Kerkmann,M., Costa,L.T., Richter,C., Rothenfusser,S., Battiany,J., Hornung,V., Johnson,J., Englert,S., Ketterer,T., Heckl,W., Thalhammer,S., Endres,S., and Hartmann,G. (2005). Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 8086-8093.
43. Klinman,D.M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 249-258.
44. Klinman,D.M., Barnhart,K.M., and Conover,J. (1999). CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*, **17**, 19-25.
45. Krieg,A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 709-760.
46. Krieg,A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 471-484.

47. Krieg,A.M., Wu,T., Weeratna,R., Efler,S.M., Love-Homan,L., Yang,L., Yi,A.K., Short,D., and Davis,H.L. (1998). Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**, 12631-12636.
48. Krieg,A.M., Yi,A.K., Matson,S., Waldschmidt,T.J., Bishop,G.A., Teasdale,R., Koretzky,G.A., and Klinman,D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 546-549.
49. Krug,A., Rothenfusser,S., Hornung,V., Jahrsdorfer,B., Blackwell,S., Ballas,Z.K., Endres,S., Krieg,A.M., and Hartmann,G. (2001a). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, **31**, 2154-2163.
50. Krug,A., Towarowski,A., Britsch,S., Rothenfusser,S., Hornung,V., Bals,R., Giese,T., Engelmann,H., Endres,S., Krieg,A.M., and Hartmann,G. (2001b). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.*, **31**, 3026-3037.
51. Laktionov,P.P., Dazard,J.E., Vives,E., Rykova,E.Y., Piette,J., Vlassov,V.V., and Lebleu,B. (1999). Characterisation of membrane oligonucleotide-binding proteins and oligonucleotide uptake in keratinocytes. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2315-2324.
52. Latz,E., Schoenemeyer,A., Visintin,A., Fitzgerald,K.A., Monks,B.G., Knetter,C.F., Lien,E., Nilsen,N.J., Espevik,T., and Golenbock,D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.*, **5**, 190-198.
53. Lee,S.W., Song,M.K., Baek,K.H., Park,Y., Kim,J.K., Lee,C.H., Cheong,H.K., Cheong,C., and Sung,Y.C. (2000). Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials. *J. Immunol.*, **165**, 3631-3639.
54. Lehmann,M.J. and Sczakiel,G. (2005). Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment. *Gene Ther.*, **12**, 446-451.
55. Leifer,C.A., Kennedy,M.N., Mazzoni,A., Lee,C., Kruhlak,M.J., and Segal,D.M. (2004). TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J. Immunol.*, **173**, 1179-1183.
56. Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**, 973-983.
57. Lenert,P., Stunz,L., Yi,A.K., Krieg,A.M., and Ashman,R.F. (2001). CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **11**, 247-256.

58. Liang,H., Nishioka,Y., Reich,C.F., Pisetsky,D.S., and Lipsky,P.E. (1996). Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest*, **98**, 1119-1129.
59. Lin,L., Gerth,A.J., and Peng,S.L. (2004). CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 1483-1487.
60. Lipinski,C.A., Lombardo,F., Dominy,B.W., and Feeney,P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 3-26.
61. Lyons,A.B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods*, **243**, 147-154.
62. Macfarlane,D.E., Manzel,L., and Krieg,A.M. (1997). Unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in WEHI 231 B lymphocytes induced by several agents: evidence for blockade of apoptosis at a distal signalling step. *Immunology*, **91**, 586-593.
63. Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.
64. Menezes,J., Leibold,W., Klein,G., and Clements,G. (1975). Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine.*, **22**, 276-284.
65. 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.
66. Moldoveanu,Z., Love-Homan,L., Huang,W.Q., and Krieg,A.M. (1998). CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*, **16**, 1216-1224.
67. Mutwiri,G., Pontarollo,R., Babiuk,S., Griebel,P., van Drunen Littel-van den Hurk, Mena,A., Tsang,C., Alcon,V., Nichani,A., Ioannou,X., Gomis,S., Townsend,H., Hecker,R., Potter,A., and Babiuk,L.A. (2003). Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **91**, 89-103.
68. Mutwiri,G.K., Nichani,A.K., Babiuk,S., and Babiuk,L.A. (2004). Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J. Control Release*, **97**, 1-17.
69. Okabe,Y., Kawane,K., Akira,S., Taniguchi,T., and Nagata,S. (2005). Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J. Exp. Med.*, **202**, 1333-1339.

70. Overhoff,M., Wunsche,W., and Sczakiel,G. (2004). Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. *Nucleic Acids Res.*, **32**, e170.
71. Peng,S.L. (2005). Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **17**, 230-236.
72. Perez,J.R., Li,Y., Stein,C.A., Majumder,S., van Oorschot,A., and Narayanan,R. (1994). Sequence-independent induction of Sp1 transcription factor activity by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 5957-5961.
73. Ramsahoye,B.H., Davies,C.S., and Mills,K.I. (1996). DNA methylation: biology and significance. *Blood Rev.*, **10**, 249-261.
74. Redford,T.W., Yi,A.K., Ward,C.T., and Krieg,A.M. (1998). Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.*, **161**, 3930-3935.
75. Reid,G.S., She,K., Terrett,L., Food,M.R., Trudeau,J.D., and Schultz,K.R. (2005). CpG stimulation of precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia induces a distinct change in costimulatory molecule expression and shifts allogeneic T cells toward a Th1 response. *Blood*, **105**, 3641-3647.
76. Richardson,B. (2003). DNA methylation and autoimmune disease. *Clin. Immunol.*, **109**, 72-79.
77. Rockwell,P., O'Connor,W.J., King,K., Goldstein,N.I., Zhang,L.M., and Stein,C.A. (1997). Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 6523-6528.
78. Rutz,M., Metzger,J., Gellert,T., Lippa,P., Lipford,G.B., Wagner,H., and Bauer,S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 2541-2550.
79. Santeliz,J.V., Van Nest,G., Traquina,P., Larsen,E., and Wills-Karp,M. (2002). Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **109**, 455-462.
80. Sester,D.P., Naik,S., Beasley,S.J., Hume,D.A., and Stacey,K.J. (2000). Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J. Immunol.*, **165**, 4165-4173.
81. Sparwasser,T., Miethke,T., Lipford,G., Erdmann,A., Hacker,H., Heeg,K., and Wagner,H. (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 1671-1679.

82. Sparwasser,T., Vabulas,R.M., Villmow,B., Lipford,G.B., and Wagner,H. (2000). Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur. J. Immunol.*, **30**, 3591-3597.
83. Stacey,K.J., Sweet,M.J., and Hume,D.A. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.*, **157**, 2116-2122.
84. Stacey,K.J., Young,G.R., Clark,F., Sester,D.P., Roberts,T.L., Naik,S., Sweet,M.J., and Hume,D.A. (2003). The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J. Immunol.*, **170**, 3614-3620.
85. Stunz,L.L., Lenert,P., Peckham,D., Yi,A.K., Haxhinasto,S., Chang,M., Krieg,A.M., and Ashman,R.F. (2002). Inhibitory oligonucleotides specifically block effects of stimulatory CpG oligonucleotides in B cells. *Eur. J. Immunol.*, **32**, 1212-1222.
86. Sur,S., Wild,J.S., Choudhury,B.K., Sur,N., Alam,R., and Klinman,D.M. (1999). Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.*, **162**, 6284-6293.
87. Takeshita,F., Leifer,C.A., Gursel,I., Ishii,K.J., Takeshita,S., Gursel,M., and Klinman,D.M. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.*, **167**, 3555-3558.
88. Temsamani,J., Kubert,M., Tang,J., Padmapriya,A., and Agrawal,S. (1994). Cellular uptake of oligodeoxynucleotide phosphorothioates and their analogs. *Antisense Res. Dev.*, **4**, 35-42.
89. 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.
90. Verthelyi,D., Ishii,K.J., Gursel,M., Takeshita,F., and Klinman,D.M. (2001). Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J. Immunol.*, **166**, 2372-2377.
91. Verthelyi,D. and Zeuner,R.A. (2003). Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9. *Trends Immunol.*, **24**, 519-522.
92. Vollmer,J., Weeratna,R., Payette,P., Jurk,M., Schetter,C., Laucht,M., Wader,T., Tluk,S., Liu,M., Davis,H.L., and Krieg,A.M. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 251-262.
93. Wagner,M., Poeck,H., Jahrsdoerfer,B., Rothenfusser,S., Prell,D., Bohle,B., Tuma,E., Giese,T., Ellwart,J.W., Endres,S., and Hartmann,G. (2004). IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J. Immunol.*, **172**, 954-963.

94. Wang,W., Chen,H.J., Schwartz,A., Cannon,P.J., Stein,C.A., and Rabbani,L.E. (1996). Sequence-independent inhibition of in vitro vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and in vivo neointimal formation by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest*, **98**, 443-450.
95. Wang,Z., Karras,J.G., Colarusso,T.P., Foote,L.C., and Rothstein,T.L. (1997). Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol.*, **180**, 162-167.
96. Wu,C.C., Castro,J.E., Motta,M., Cottam,H.B., Kyburz,D., Kipps,T.J., Corr,M., and Carson,D.A. (2003). Selection of oligonucleotide aptamers with enhanced uptake and activation of human leukemia B cells. *Hum. Gene Ther.*, **14**, 849-860.
97. Yamamoto,S., Yamamoto,T., Iho,S., and Tokunaga,T. (2000). Activation of NK cell (human and mouse) by immunostimulatory DNA sequence. *Springer Semin. Immunopathol.*, **22**, 35-43.
98. 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 INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J. Immunol.*, **148**, 4072-4076.
99. 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.
100. Yamamoto,T., Yamamoto,S., Kataoka,T., and Tokunaga,T. (1994). Ability of oligonucleotides with certain palindromes to induce interferon production and augment natural killer cell activity is associated with their base length. *Antisense Res. Dev.*, **4**, 119-122.
101. Yasuda,K., Rutz,M., Schlatter,B., Metzger,J., Lippa,P.B., Schmitz,F., Haas,T., Heit,A., Bauer,S., and Wagner,H. (2006). CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur. J. Immunol.*, **36**, 431-436.
102. Yi,A.K., Chang,M., Peckham,D.W., Krieg,A.M., and Ashman,R.F. (1998a). CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.*, **160**, 5898-5906.
103. Yi,A.K., Klinman,D.M., Martin,T.L., Matson,S., and Krieg,A.M. (1996). Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J. Immunol.*, **157**, 5394-5402.

104. Yi,A.K., Tuetken,R., Redford,T., Waldschmidt,M., Kirsch,J., and Krieg,A.M. (1998b). CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.*, **160**, 4755-4761.
105. Yuen,A.R. and Sikic,B.I. (2000). Clinical studies of antisense therapy in cancer. *Front Biosci.*, **5**, D588-D593.
106. Zhao,Q., Matson,S., Herrera,C.J., Fisher,E., Yu,H., and Krieg,A.M. (1993). Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides. *Antisense Res. Dev.*, **3**, 53-66.
107. Zhao,Q., Song,X., Waldschmidt,T., Fisher,E., and Krieg,A.M. (1996a). Oligonucleotide uptake in human hematopoietic cells is increased in leukemia and is related to cellular activation. *Blood*, **88**, 1788-1795.
108. Zhao,Q., Temsamani,J., Iadarola,P.L., Jiang,Z., and Agrawal,S. (1996b). Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 173-182.
109. Zhu,F.G., Reich,C.F., and Pisetsky,D.S. (2001). The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Immunology*, **103**, 226-234.

Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung in folgender Publikation eingereicht und akzeptiert:

Miriam Mende, Anne Hopert, Winfried Wünsche, Marita Overhoff, Anke Detzer, Kirsten Börngen, Peter Schlenke, Holger Kirchner and Georg Sczakiel.

A hexanucleotide selected for increased cellular uptake *in cis* contains a highly active CpG-motif in human B cells and primary PBMCs. *Immunology*

ALBERT-LEZIUS-STR. 138 • 23562 LÜBECK
TELEFON 0451/5002733 • PRIVAT 0451/2964866 • E-MAIL MENDE@IMM.UNI-LUEBECK.DE

MIRIAM MENDE

PERSÖNLICHE INFORMATION

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtstag: 03.03.1978
Geburtsort: Lübeck

ANGESTREBTER AKADEMISCHER GRAD

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

AUSBILDUNG

1984 - 1988	Grundschule
1988 - 1997	Thomas-Mann-Gymnasium, Lübeck Abschluss: Abitur
1997 - 2003	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Schwerpunkt: Molekularbiologie Abschluss: Diplom
2004 - 2006	Anfertigung der Dissertation mit dem Titel „Bedeutung der zellulären Aufnahme und intrazellulären Lokalisation für CpG-vermittelte Immunstimulation“ am Institut für Molekulare Medizin der Universität Lübeck unter Betreuung von Prof. Dr. Georg Sczakiel

TAGUNGEN

15.-16.09.2006	Workshop der Paul-Martini-Stiftung in Bonn mit dem Thema „Toll-like receptor-based drug development“
----------------	--

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Georg Sczakiel für die zeitintensive, persönliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Thomas Peters für die Bereitschaft, den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen und Prof. Dr. Horst Stürzbecher und Prof. Dr. Georg Sczakiel für ihre Bereitschaft, die Gutachten zu erstellen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen sowie bei meiner Arbeitsgruppe bedanken. Besonders seien hier erwähnt Winnie, dessen methodischer Erfahrungsschatz und unermüdliche Hilfsbereitschaft eine sehr große Hilfe waren, außerdem Marita für die Unterweisung in den „*Liquid-Hybridization-Assay*“ und Gregor für große Unterstützung in der Fluoreszenzmikroskopie. Außerdem möchte ich Herrn Hein-Langendorf für die Hilfe bei allen großen und kleinen technischen Problemen danken und Petra Höltig für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Bei Prof. Dr. Kirchner und Dr. Schlenke sowie Prof. Dr. Wollenberg möchte ich mich für die gute Kooperation bedanken. Mein besonderer Dank gilt Petra Korittke für die Präparierung der *buffy-coats* und für die nicht selbstverständliche Hilfe in der Durchflusszytometrie.

Den „Jungs“ danke ich für das wahre Ziel dieser Arbeit und ich hoffe: „die Jungs fanden’s klasse“!!!

Bei Mc möchte ich mich bedanken für humorvolle Gespräche unter Biologen und für viel Spaß bei leider inzwischen selten gewordenen „Exkursionen“ ins QC ☺.

Besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern für so viele Dinge, dass ich sie hier nicht alle aufzählen kann, aber auf jeden Fall für ihre Hilfe in jeder Hinsicht und für ihr Vertrauen in mich.

Zuletzt möchte ich mich bei Sascha bedanken für moralische Unterstützung (und Lucky für seine beruhigende Wirkung) und bei Sascha über diese Arbeit hinaus noch einmal für fünf Minuten und ein ganzes Leben.

Zitate

„Eure Immunostimulanz“

„C-Seminar“

„unglaublich!!!“

„I played a lot of Barbie in my childhood“
 „Winnie, too“ (*sollte heißen: Winnetou*)

„Bei der letzten EM war Brasilien aber nicht so gut“
 „Hab ich nicht so genau beobachtet“

Beim Anblick eines siedenden Wasserkochers:
 „Da konzentriert jemand Wasser“

„Magenta“

„Hier werden Köpfe rollen!!!“

Jemand sucht den Isotopenschlüssel:
 „Finde den Winnie!!!“

„Psychomer“

„Wandelndes Laborbuch“

„Sie reden mit dem amtierenden Wochenmeister“

„Übersprungshandlung“

Nach Verspätung beim Montagsseminar wegen geschlossener Bahnschranken:

„Could it be that you were waiting in front of the university-barrier, not of the railway-barrier?!“

„Hat man das mal mit definitiv weiblichen Schwangeren gemacht?“

Die Unwörterliste:

„ähm, also, eigentlich, eventuell, halt, letztendlich,
 nicht wirklich, o.k., sozusagen, wie auch immer...“

„I want to cry a little bit
 and jump out of the window!!!“

„Es lebt sich manchmal unbequem mit Fremdgenom“

Winnie verlässt mit rotem Korb das Labor:

„Ah, cappuccetto rosso – Rotkäppchen!“

„Che tenera!“

„Pfirsich“
 (*Soll heißen: 40*)

„Kann ich Ihnen etwas anbieten?“

verkatert:

Montagsseminar nach der Zeitumstellung:
 „Naja, es ist gefühlte 7 Uhr morgens!“

„Da ist deine Vernunft kurz über der Baseline,
 aber halt immer noch stimuliert“

„Jetzt ist Schluss mit Schmusekurs!!!“

„50-Kilo-Euro“

„Ich find „Johanna“ total schön... Ich werd mein Kind Johanna nennen
 - *Gedankenpause* – wenn es ein Mädchen wird “

„Du exprimierst gerade den TGIF-Faktor
 (= Thank God It's Friday)“