

Die Rolle von bakteriellen DNA-Sequenzen (CpG) bei der Immuntherapie von retroviralen Infektionen

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

vorgelegt von
Anke Olbrich
aus Hameln

Würzburg, 2003

eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

Gutachter: PD. Dr. Ivaylo Gentshev

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Entdeckung von Retroviren	1
1.2 Weltweite Verbreitung von HIV	2
1.3 Tiermodelle für Retroviren	2
1.4 Virologische Grundlagen	3
1.4.1 Struktur von Retroviren	3
1.4.2 Klassifizierung Muriner Leukämie Viren	6
1.4.3 Aufbau und Besonderheiten der Murinen Leukämie Viren	7
1.5 Replikationszyklus von F-MuLV	8
1.6 Pathogenese des Friend Virus Komplex	9
1.7 Die Immunantwort gegen ein Pathogen	10
1.8 Immunität gegen eine FV-Infektion	11
1.9 Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämme nach FV-Infektion	14
1.10 Immunstimulative DNA mit CpG-Motiv	18
1.10.1 Entdeckung der immunstimulativen Aktivität von DNA mit CpG-Motiv	18
1.10.2 Aufbau einer immunstimulativen DNA mit CpG-Motiv	19
1.10.3 Aktivierung von vertebraten Zellen durch CpG-ODN	19
1.10.4 Wirkung von CpG-ODN in der Maus	20
1.10.5 Die DNA von Vertebraten ist nicht immunstimulativ	22
1.10.6 Interaktion von CpG-ODN mit dem Toll-like Rezeptor-9	23
1.10.7 Klinische Anwendungsgebiete von CpG-ODN	24
1.11 Transkutane Immunisierung mit CpG-ODN als Adjuvants	26
1.12 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material	29
2.1 Chemikalien und Medien	29
2.2 Antibiotika	29
2.3 Häufig verwendete Puffer und Medien	29
2.4 Antikörper	32
2.5 Tetramere	34
2.6 Zytokine	34
2.7 F-MuLV spezifische Peptide (T-Zell-Epitope)	34

2.8 CpG-ODN Sequenzen	34
2.9 Viren und Zell-Linien	35
2.10 Kommerzielle Standardtests	35
2.11 Mäuse	35
3 Methoden	36
3.1 Versuchstiere	36
3.1.1 Infektion	36
3.1.2 Injektionen	36
3.1.2.1 Injektionen von CpG-DNA	36
3.1.2.2 Depletion von CD8 ⁺ bzw. NK1.1 ⁺ -Zellen in Mäusen	36
3.1.3 Betäubung der Mäuse mit Ketamine/Xylasine	37
3.1.4 Betäubung der Mäuse mit Ether	37
3.1.5 Transkutane Immunisierung von Mäusen	38
3.1.6 Palpieren von Milzgrößen	38
3.1.7 Blutentnahme	38
3.1.8 Organentnahme	39
3.1.9 Adoptiver Transfer von Milzzellen	39
3.2 Herstellung eines Friend Virus-Stocks	39
3.3 Zellzahlbestimmung	40
3.4 Zellkultur	40
3.4.1 Kultivierung von Zellen	40
3.4.2 Herstellung des monoklonalen α CD8 Antikörpers	40
3.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
3.5 Herstellung einer Milzzellsuspension und Lyse von kernlosen Zellen	41
3.6 Nachweis von infektiösen Zellen in der Milz ("Infectious Center Assay")	42
3.7 Bestimmung FV-neutralisierender Antikörper	43
3.8 Bestimmung von FV-bindenden Antikörpern (ELISA)	44
3.9 Durchflußzytometrie	44
3.9.1 Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut	45
3.9.2 Bestimmung von FV-infizierten Zellpopulationen in der Milz	46
3.10 Arbeiten mit RNA	46
3.10.1 Isolation von Gesamt-RNA	46
3.10.2 Elektrophorese von RNA im Agarosegel	47

3.10.3	"RNA-Protection-Assay"	47
3.10.4	Auftrennung von RNA-RNA-Hybriden in Polyacrylamidgelen	48
3.11	IFNγ-ELISA	48
3.12	Percoll-Gradient zur Isolation von Lymphozyten	48
3.13	ELISPOT-Assay	48
3.14	Tetramerfärbung	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Immunstimulativer Effekt von CpG-ODN auf das Immunsystem von uninfizierten Mäusen	51
4.2	Prophylaktische Gabe von CpG-ODN vor einer FV-Infektion	54
4.3	Therapie der akuten FV-Infektion mit immunstimulativen CpG-ODN	61
4.4	CpG-ODN als Therapie einer FV-induzierten Leukämie	75
4.5	Verwendung von immunstimulativen CpG-ODN als Adjuvants bei einer transkutanen Immunisierung	78
5	Diskussion	84
5.1	Anwendung von immunstimulativen CpG-ODN zur Paraimmunisierung bzw. Immuntherapie einer Retrovirusinfektion	85
5.2	Verwendung von CpG-ODN als Adjuvants bei der transkutanen Immunisierung	90
6	Literaturverzeichnis	92
7	Anhang	101
7.1	Zusammenfassung	101
7.2	Summary	102
7.3	Abkürzungsverzeichnis	104
7.4	Abbildungsverzeichnis	106
7.5	Tabellenverzeichnis	107
7.6	Erklärungen	109
7.7	Lebenslauf	110
7.8	Publikationsliste	111

1. Einleitung

1.1. Die Entdeckung der Retroviren

Die ersten Retroviren wurden am Anfang des letzten Jahrhunderts beschrieben. Im Jahr 1911 fanden Rous *et al.* (1911) das erste onkogene Retrovirus, das "Rous sarcoma virus" (RSV), das in Hühnern Sarkome induziert. In den darauffolgenden Jahren wurden eine Vielzahl an Retroviren entdeckt, darunter z.B. das "Simian foamy virus" (SFV) (Enders und Peebles, 1954), das "Friend murine leukemia virus" (F-MuLV) 1957 (Friend *et al.*, 1957) und das "Feline leukemia virus" (FeLV) (Jarrett *et al.*, 1964).

Das erste mit einer Erkrankung assoziierte Retrovirus des Menschen wurde 1980 isoliert; das "Human T-cell leukemia virus-1" (HTLV-1) (Gallo *et al.*, 1980). Etwa 2% der mit HTLV-1 infizierten Menschen entwickeln eine adulte T-Zell-Leukämie. Im Jahr 1983 wurde am Pasteur Institut in Paris ein bisher unbekanntes Retrovirus entdeckt (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983), welches 1984 von Brun-Vezinet *et al.* (1984) mit der 1981 beschriebenen "acquired immunodeficiency syndrom" (AIDS) Erkrankung in Verbindung gebracht wurde. Bei einer AIDS-Erkrankung wiesen die betroffenen Patienten einen schlechten Allgemeinzustand und verschiedene opportunistische Infektionen auf. Die Prognose für diese Patienten war schlecht und die Anzahl der Betroffenen stieg exponentiell. Das Isolat von Barre-Sinoussi *et al.* (1983), sowie Isolate von Popvic *et al.* (1984) und Levy *et al.* (1984) wurden später unter der Bezeichnung "Human immunodeficiency virus typ 1" (HIV-1) zusammengefaßt. Inzwischen ist HIV-1 weltweit verbreitet.

Im Jahr der Namensgebung von HIV wurde von Clavel *et al.* (1986) ein zweites humanes Immundefizienzvirus (HIV-2) aus einem westafrikanischen Patienten isoliert. Die Genomstruktur und die Serologie unterschied sich deutlich von dem bis dahin beschriebenen HIV-1. Die Infektion mit HIV-2 führt beim Menschen zu einer Immundefizienz mit einer deutlich längeren Inkubationszeit als bei HIV-1 (Ancelle *et al.*, 1987). Die Hauptverbreitung von HIV-2 liegt in West-Afrika (Kong *et al.*, 1988).

1.2. Weltweite Verbreitung von HIV

Seit den frühen achtziger Jahren haben sich nach Angaben des AIDS Programms der Vereinten Nationen (UNAIDS) weltweit schätzungsweise 65 Millionen Menschen mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert. An AIDS sind bis Ende 2001 ungefähr 25 Millionen Menschen verstorben, d.h. zur Zeit sind etwa 40 Millionen Menschen infiziert und die Neuinfektion mit HIV betrug 2001 5 Millionen Menschen. Das humane Immundefizienzvirus ist in jedem Land der Welt verbreitet, wobei 95% aller Infizierten in den Entwicklungsländern leben. (Quelle: Homepage der Internationalen AIDS Vaccine Initiative, IAVI, URL: <http://www.iavi.org>)

Als 1983 das HIV zum ersten Mal beschrieben wurde, begannen die ersten Vakzine- und Therapiestudien zur Bekämpfung von HIV. Dennoch vermittelt keine der bis jetzt entwickelten Prototyp-Vakzinen einen Schutz vor der HIV-Infektion. Die HAART-Therapie ("highly active antiretrovirale therapy"), welche zur Zeit die einzige wirksame antiretrovirale Therapie darstellt, ist außerdem nur einem geringen Teil der Weltbevölkerung (ca. 5% der HIV-Infizierten) zugänglich. Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombinationstherapie, die aus mindestens drei verschiedenen Präparaten besteht. Nachteile dieser Therapie sind die hohen Kosten, die große Belastung der Patienten aufgrund der Nebenwirkungen der Präparate und die trotz Kombinationstherapie immer noch mögliche Resistenzbildung von HIV. Aus diesen Gründen ist es wichtig, an einfacheren und kostengünstigeren Therapien und Vakzinen gegen Retroviren zu forschen.

1.3. Tiermodelle für Retroviren

Ein Problem, welches bei der Entwicklung von Impfstoffen und Therapien gegen HIV auftaucht, ist die begrenzte Anzahl an möglichen Tiermodellen.

Nur Schimpansen lassen sich reproduzierbar mit HIV-1 infizieren. Jedoch replizieren die meisten HIV-1 Virusisolate in Schimpansen sehr schlecht und die Tiere entwickeln innerhalb einer Dekade nach Infektion keine AIDS ähnliche Erkrankung. Hinzu kommt, dass ethische und finanzielle Gründe gegen Experimente mit Schimpansen sprechen. Viele Studien zur Entwicklung von Vakzinen und Therapien gegen AIDS wurden daher in Rhesusmakaken mit dem verwandten SIV ("Simian immunodeficiency virus") durchgeführt.

ciency virus") durchgeführt.

Die Probleme dieses Tiermodells sind die limitierte Anzahl an Affen, ihr heterologer genetischer Hintergrund, das geringe Wissen über die molekulare Immunologie von Affen und die limitierten Möglichkeiten deren Immunsystem zu manipulieren. Daher sind Erkenntnisse über fundamentale Grundlagen der Retrovirusimmunologie im Mausmodell einfacher zu erlangen. Ein Vorteil des Mausmodells ist der genetisch definierte immunologische Hintergrund der Tiere, wobei kongene, transgene und knockout Tiere von besonderer Bedeutung für aussagekräftige Experimente sind.

Weil Mäuse nicht mit HIV oder SIV infizierbar sind, muss ein anderes Retrovirus verwendet werden. Es gibt eine große Anzahl von onkogenen Retroviren in der Maus, jedoch induzieren sehr viele dieser Retroviren nur bei neugeborenen Mäusen eine Erkrankung, während sie bei erwachsenen Tieren apathogen sind. Das Friend Virus (FV) ist ein Retrovirus-Komplex, welches in erwachsenen Mäusen eine lethale Erkrankung (Erythroleukämie) verursacht. Die genetischen und immunologischen Merkmale von FV sind intensiv in den letzten zwanzig Jahren untersucht worden (Hasenkrug und Chesebro, 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Pathogenese von FV im Gegensatz zu HIV oder SIV im Menschen oder Affen ist die FV-Infektion als Modell für pathologische Aspekte nicht geeignet. In der akuten Phase einer FV-Infektion bzw. HIV- oder SIV-Infektion sind jedoch große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Virus zu beobachten (Dittmer und Hasenkrug, 2001). Daher lassen sich die immunologischen Merkmale einer retroviralen Infektion gut am FV-Modell untersuchen. Das Friend Virus Mausmodell wurde in dieser Arbeit als Grundlagenmodell verwendet, um neue Therapien und Impfstoffe gegen Retroviren zu entwickeln.

1.4. Virologische Grundlagen

1.4.1. Struktur von Retroviren

Die Familie der *Retroviridae* ist eine große und divergente Familie von umhüllten RNA-Viren, die einen Durchmesser von 80-100nm haben. Das Genom dieser Viren besteht aus einer linearen, einzelsträngigen, nicht segmentierten RNA positiver Polarität mit einer Größe von 7-12kb. Zwei positive einzelsträngige RNA-Moleküle bilden

zusammen mit dem Nukleokapsidprotein und dem Reverse-Transkriptase-Molekül einen Ribonukleoproteinkomplex (*Core*), der von einer Matrix und einer Hülle (*Envelope*) umgeben ist.

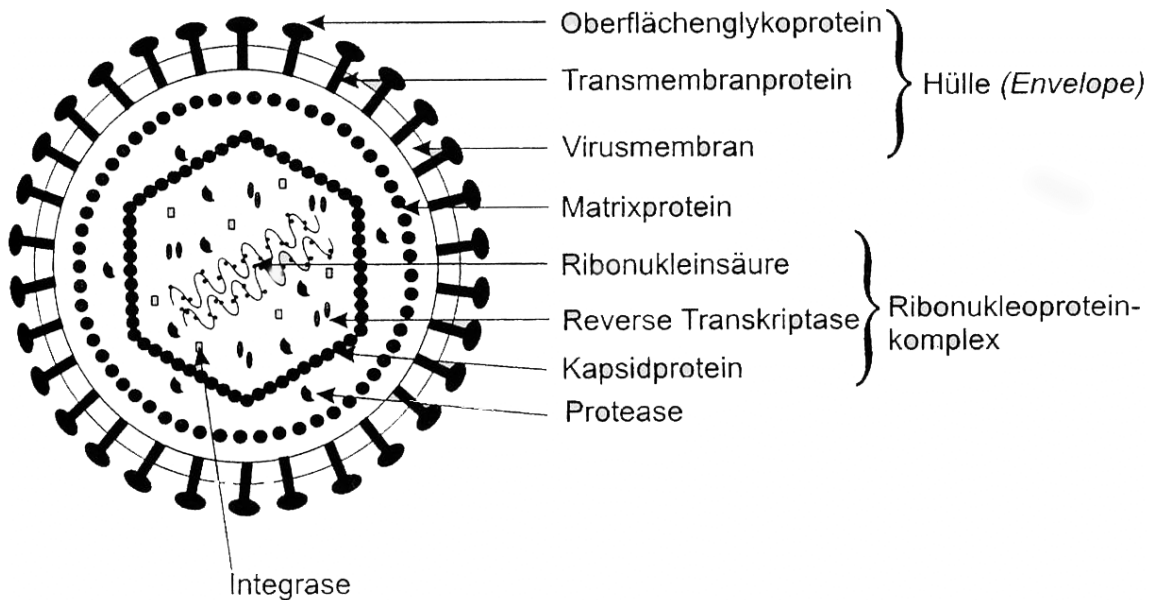


Abbildung 1: Aufbau von Typ-C Retroviren bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV

Die Familie der *Retroviridae* lässt sich in zwei Gruppen einteilen; den einfachen und den komplexen Retroviren.

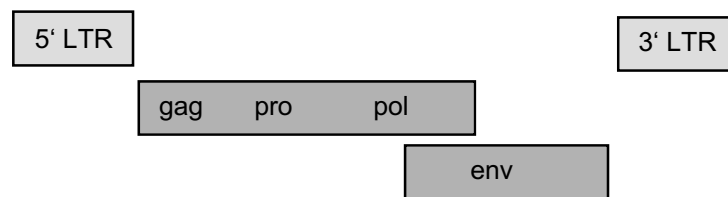
Alle Retroviren haben folgende Hauptgene gemeinsam:

- *gag*-Gen: synthetisiert interne Strukturproteine (Matrix, Kapsid, Nukleoproteinstruktur)
- *pol*-Gen: enthält die Informationen für die Enzyme Reverse-Transkriptase und Integrase
- *env*-Gen: synthetisiert die Oberflächen- und Transmembran-Komponenten des viralen Hüllproteins

Außerdem besitzen alle Retroviren eine kleine Domäne, das *pro*-Gen, welches die Virusprotease synthetisiert.

Einfache Retroviren tragen nur die oben aufgeführten elementaren Gene, während komplexe Retroviren (z.B. HIV) zusätzlich noch eine Reihe an regulatorischen nicht-viralen Strukturproteinen besitzen.

A: MuLV



B: HIV

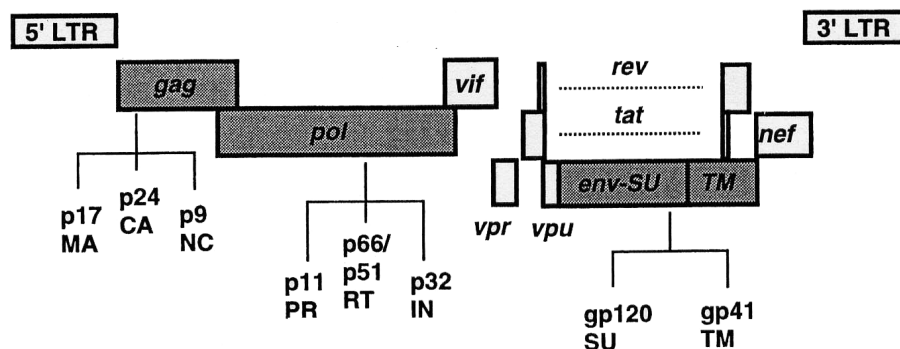


Abbildung 2: Genomorganisation von einfachen und komplexen Retroviren

A.: Aufbau von einfachen Retroviren am Beispiel von MuLV

B.: Aufbau von komplexen Retroviren am Beispiel von HIV

Die Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für die Strukturproteine. Diese sind essentiell und in allen Retroviren vorhanden. Die Gene (*vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat*, *nef*) kodieren für akzessorische und regulatorische Proteine (Coffin *et al.*, 1997).

Vor allem bei Wirbeltieren sind Retroviren zu finden, wo sie für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sind, dazu gehören Tumorerkrankungen (z.B. HTLV-I), Immundefizienz (z.B. HIV), neurologische Defekte bis hin zu inapparenten Infektionsverläufen.

Die Familie der *Retroviridae* lässt sich in 7 Gattungen einteilen:

Tabelle 1: Taxonomie der *Retroviridae*

Unterfamilie	Gattung	Beispiel	Genom
Onkoviren	Alpharetrovirus	ALV (<i>Avian leukosis virus</i>)	simpel
	Betaretrovirus	MMTV (<i>Mouse mammary tumor virus</i>)	simpel
	Gammaretrovirus	MuLV (<i>Murine leukemia virus</i>)	simpel
	Deltaretrovirus	HTLV-I (<i>Humane T-cell leukemia virus</i>)	komplex
	Epsilonretrovirus	WDSV (<i>Walleye dermal sarcoma virus</i>)	simpel
Lentiviren	Lentivirus	HIV-1 (<i>Humane immunodeficiency virus</i>)	komplex
Spumaviren	Spumavirus	SFV (<i>Simian foamy virus</i>)	komplex

Außerdem muss zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden werden. Die exogenen Retroviren besitzen alle Informationen auf dem Genom, die für einen kompletten Infektionszyklus mit anschließender Partikelfreisetzung notwendig sind. So kann das Virus „aktiv“ verbreitet werden. Dieses steht im Gegensatz zu den endogenen Retroviren. Diese sind im Wirtsgenom integriert und können aufgrund von Gendefekten nur noch vertikal übertragen werden.

Bei Retroviren kann es zu Defekten im Genom kommen, die zum Verlust des produktiven Infektionszyklus führen können. Helferviren können diese Defekte komplementieren, so dass das defekte Retrovirus mit Hilfe des Helfervirus einen kompletten Infektionszyklus durchlaufen kann.

1.4.2. Klassifizierung Muriner Leukämie Viren

Die murinen Leukämieviren (MuLV) gehören zu den Gammaretroviren und sind daher simple Retroviren. Ursprünglich wurden murine Leukämieviren aus Mausstämmen isoliert, welche eine hohe Anzahl von Leukämieerkrankungen aufwiesen. Es wurden mehrere Virusisolate hergestellt, so führte das Isolat von Goss und Moloney (1960) in infizierten Mäusen zu einer T-Zell Leukämie, während Isolate von Rauscher (1962) und Friend (1957) zu einer Erythroleukämie führten. Weitere Syndrome, die durch MuLV verursacht werden, sind MAIDS ("murine acquired immunodeficiency

syndrom"), Sarkome und Thymome (Liang *et al.*, 1996; Ruscetti, 1995; Hoatlin und Kabat, 1995; Sourvinos *et al.*, 2000).

Die Viren, die ein solches Krankheitsbild verursachen, sind zum überwiegenden Teil eine Mischung aus defekten und kompletten Viren. Bei den kompletten Viren handelt es sich um nicht-pathogene aber replikationskompetente Viren, auch Helferviren genannt. Die defekten Viren sind pathogen aber nicht replikationskompetent. Bei einer Koinfektion einer Zelle mit beiden Viren können von dem defekten Virus mit Hilfe der Helferviren neue infektiöse Partikel gebildet werden.

Je nach Art des Virus-Rezeptors werden die murinen Leukämieviren in folgende Subklassen eingeteilt:

- ekotrophe Viren, die auf die Infektion von Maus- und Rattenzellen beschränkt sind
- xenotrophe Viren, die Zellen verschiedener Arten außer Mauszellen infizieren
- amphotrophe und polytrophe Viren, welche Rezeptoren nutzen, die sowohl auf Zellen von Nagern als auch auf anderen Säugerzellen vorkommen

1.4.3. Aufbau und Besonderheiten der murinen Leukämieviren

Die virale Hülle der murinen Leukämieviren enthält ein ikosaedrisches Kapsid, in dem sich die (+)ssRNA befindet. In dem Kapsid sind neben den drei virus-kodierten Enzymen (Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) zelluläre t-RNA als Primer für die virale DNA-Synthese enthalten. Das virale Genom ist ein Dimer aus zwei identischen unsegmentierten RNA-Strängen von einer Länge von ca. 8,2kb.

Das *gag*-Gen, welches für die internen Strukturproteine des Virions kodiert, wird als Vorläuferprotein (Pr65Gag) gebildet und in vier Untereinheiten gespaltet (p30Gag, p15Gag, pp12Gag und p10Gag). Das *pol*-Gen liefert die Informationen für die Reverse Transkriptase und Integrase und ist durch ein Stop-Codon vom *gag*-Gen getrennt. Durch das Überlesen des Stop-Codons wird die mRNA in ein Gag-Pol-Polyprotein translatiert. Eine Besonderheit von MuLV ist, dass das glykosylierte Gag-Pol-Polyprotein an die Zelloberfläche transportiert wird. Im Leseraster von *pol* befindet sich ein weiterer Genabschnitt *pro*, der für die Virionprotease kodiert.

Die äußeren Hüll- und Transmembranproteine des Virus leiten sich vom *env*-Gen ab. Das *env*-Gen kodiert für die viralen Hüllproteine gp70 und p15E, welche von einem

gemeinsamen Vorläuferprotein (85kDa) gebildet werden. Dieses Vorläuferprotein (85kDa) wird am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert und im ER glykosyliert. Im Golgi-Apparat wird das Vorläuferprotein nach einer weiteren Glykosylierung in zwei Einheiten gespalten, dem glykosylierten oberflächlichen Hüllprotein gp70 und dem nicht glykosylierten transmembranösen Teil p15E. Das gp70 bildet die sogenannten "knobs" auf der Oberfläche der Virushülle. Mit dem oberflächlichen Proteinanteil (SU) des gp70 ist der transmembranöse Teil (TM) p15E über Disulfidbrücken verbunden. Durch die exponierte Stellung des gp70 auf dem Viruspartikel ist dieses Protein für viele biologische Eigenschaften von MuLV wie Rezeptorerkennung, Wirtsspezifität, Rezeptor-Interferenz und Antigenität verantwortlich (Hunter und Swanstrom, 1990; Cunningham, 1992).

1.5. Replikationszyklus von F-MuLV

Die Replikation von murinen Leukämieviren ist typisch für Retroviren und lässt sich in folgende Abschnitte einteilen:

1. Bindung des Virions an seinen Rezeptor an der Wirtszelloberfläche
2. Internalisierung der Core-Struktur in das Zytoplasma
3. Aktivierung der reversen Transkription mit Synthese der doppelsträngigen viralen DNA
4. Transport der DNA in den Zellkern
5. Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom
6. Transkription des Provirus durch die zelluläre Polymerase II
7. Transport gespleißter und ungespleißter mRNA in das Zytoplasma und dortige Translation
8. Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine zu kompletten Viren an der Plasmamembran und anschließende Freisetzung neuer viraler Partikel

Die Replikation von Murinen Leukämieviren ist nicht lytisch und findet in stabilen Virus-produzierenden Wirtszellen statt.

1.6. Pathogenese des Friend Virus Komplex

Das Friend Virus (FV) ist ein muriner C-Typ Retrovirus-Komplex. Dieser Komplex besteht aus zwei Retroviren: Dem replikationskompetenten "Friend murine leukemia virus" (F-MuLV), ein in adulten Mäusen nicht-pathogenes Helfervirus, und dem replikationsinkompetenten aber pathogenen „spleen focus-forming virus“ (SFFV). Das SFFV besitzt größere Deletionen im *gag*-Gen, so dass keine viralen Partikel gebildet werden können. Erst eine Koinfektion der Wirtszellen durch beide Viren (F-MuLV und SFFV) führt zur Verpackung des SFFV in F-MuLV kodierte Viruspartikel und damit zur Verbreitung des SFFV. Durch diese Verbreitung des SFFV wird in den Mäusen eine Erythroleukämie verursacht. F-MuLV alleine ist in erwachsenen Mäusen apathogen, kann aber in neugeborenen Mäusen, welche kein voll ausgebildetes Immunsystem haben, eine Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie verursachen.

Der Rezeptor für F-MuLV und andere ekotrophe murine Leukämieviren ist Pit-1/2 ("inorganic phosphate transporter"). Die Zielzellen sind daher Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (Dittmer *et al.*, 2002).

Der Rezeptor für das SFFV ist unbekannt (D'Andrea, 1992). Nachdem das SFFV einen Erythroblasten infiziert hat, wird das *env* kodierte Glykoprotein gp55 an der Zelloberfläche exprimiert. Das Glykoprotein bindet an den Erythropoetin-Rezeptor (EPO-R) von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen, wodurch es ein konstitutives Mitogen für diese Zellen ist und eine polyklonale Proliferation induziert (Kabat, 1989). Diese Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen (Zielzellen für das FV) führt zu einer massiven Splenomegalie, bei der das Milzgewicht von FV suszeptiblen Mäusen auf das 10 bis 20fache des Normalgewichts innerhalb der ersten zwei Wochen nach Infektion ansteigt. Das Immunsystem dieser Mäuse ist nicht in der Lage eine schützende Immunantwort gegen das FV auszubilden, so dass die Tiere 3-4 Wochen nach Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln. Die entstandenen malignen Zellen besitzen zwei charakteristische Merkmale: Zum einen aktiviert das Provirus durch seine Integration ein zelluläres Onkogen der *ets*-Familie, zum anderen besitzen viele FV transformierte Zellen ein inaktiviertes p53 Tumorsuppressor-Gen (Kabat, 1989).

1.7. Die Immunantwort gegen ein Pathogen

Um die Immunantwort von Mäusen auf eine Friend Virus Infektion zu verstehen, wird ein kurzer Überblick über die Funktion der Immunantwort bei einer Virusinfektion gegeben.

Bei Säugetieren gibt es zwei unterschiedliche Abwehrsysteme, die "angeborene" und die "erworbene" Immunantwort.

Die "natürliche oder angeborene" Immunantwort vermittelt in den Tieren einen unspezifischen Schutz gegen eine Infektion. Bei dieser Immunantwort sind unter anderem phagozytierende Zellen (z.B. Makrophagen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beteiligt.

Die "erworbene" Immunität ist spezifisch und wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese antigenspezifischen Zellen sind in der Lage verschiedene Effektorfunktionen im Kampf gegen eine Infektion, sowie ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Lymphozyten befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe und in den lymphoiden Geweben. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, der fötalen Leber bzw. des Knochenmarks. Es werden zwei Gruppen unterschieden, die T-Zellen und die B-Zellen. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen während die T-Zellen vom Knochenmark bzw. der fötalen Leber in den Thymus wandern und dort ausreifen.

Anhand von Oberflächenmarkern (CD19, CD4, CD8) lassen sich die Lymphozytenpopulationen experimentell unterscheiden (Parnes, 1989). B-Zellen tragen auf der Zelloberfläche das Molekül CD19. Bei T-Zellen gibt es zwei Populationen, die CD4⁺-Zellen (T-Helferzellen) und die CD8⁺-Zellen (zytotoxische T-Zellen, CTLs).

Mit den zwei Typen der Lymphozyten (T- und B-Zellen) lassen sich zwei Hauptmechanismen der erworbenen Immunantwort assoziieren, die humorale und zelluläre Immunantwort. B-Zellen produzieren antigenspezifische Antikörper (Immunglobuline, Ig). Diese Antikörperantwort wird als humorale Immunantwort bezeichnet. Je nach Beschaffenheit des Antigens produzieren B-Zellen unabhängig oder abhängig von T-Zellen Antikörper. Greaves *et al.* (1973) beobachtete, dass Menschen, die keine T-Zellen besaßen, eine geringere Antikörperantwort aufwiesen. Chesnut und Grey (1986) zeigten, dass dieses Phänomen auf der Funktion von bestimmten T-Zellen beruhte, die eine Regulation der humoralen Immunantwort innehaben. Die Funktion

dieser T-Zellen besteht darin, die Aktivität von Effektorzellen zu regulieren. Daher heißen diese Zellen T-Helferzellen (Th-Zellen).

Die zelluläre Immunantwort wird auch von anderen T-Zellen, den sogenannten zytotoxischen T-Zellen (CTLs), vermittelt. Sie töten Virus-infizierte oder neoplastisch entartete Zellen durch direkten Zellkontakt. Die CTLs werden zusammen mit den B-Zellen als Effektor-Lymphozyten bezeichnet.

Die antigenspezifische T-Helferzell-Antwort wird in zwei Typen, Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), eingeteilt. Die Th-Zell-Typen unterscheiden sich in ihrer Effektorfunktion und ihrer Sekretion von Zytokinen (Abbas *et al.*, 1996; Mosmann und Coffman, 1989; Seder und Paul, 1994). Zytokine sind Effektormoleküle. Diese werden von Zellen des Immunsystems sekretiert und beeinflussen das Verhalten der umgebenden Zellen.

Th1-Zellen sekretieren Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, Interleukin (IL-) 2 und Lymphotoxin. Das sekretierte $\text{IFN}\gamma$ aktiviert Makrophagen und verstärkt den Immunglobulin-Klassenwechsel (Immunglobulin-Switch) von IgM zu IgG2a, ein Kennzeichen einer Th1-Immunität (Finkelman *et al.*, 1990).

Th2-Zellen produzieren IL-4, -5, -10 und IL-13 und hemmen die Makrophagenaktivität. Kennzeichen einer Th2-assoziierten Immunantwort ist die hohe Konzentration an IL-4 und der Immunglobulin-Switch zu IgG1.

Eine Th1-dominierte Immunantwort wird vor allem bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien beobachtet. Bei einer parasitären oder extrazellulären bakteriellen Infektion ist eine Th2-Immunantwort dominant.

1.8. Immunität gegen eine FV-Infektion

Ob ein Mausstamm, nach der Infektion mit dem Friend Virus, eine maligne Erythro-leukämie entwickelt (FV-suszeptibler Mausstamm) oder das Virus nach einer vorübergehenden Splenomegalie vom Immunsystem kontrolliert werden kann (FV-resistenter Mausstamm), ist abhängig von der Virusdosis und dem genetischen Hintergrund der infizierten Maus.

Die Resistenz gegen FV wird durch eine Reihe von Genen vermittelt. Es gibt mindestens sechs Gene (Fv 1-6), die eine Resistenz auf nicht-immunologischer Grundlage induzieren (Stoye, 1998) und mindestens vier Gene des Haupthistokompatibilitäts-

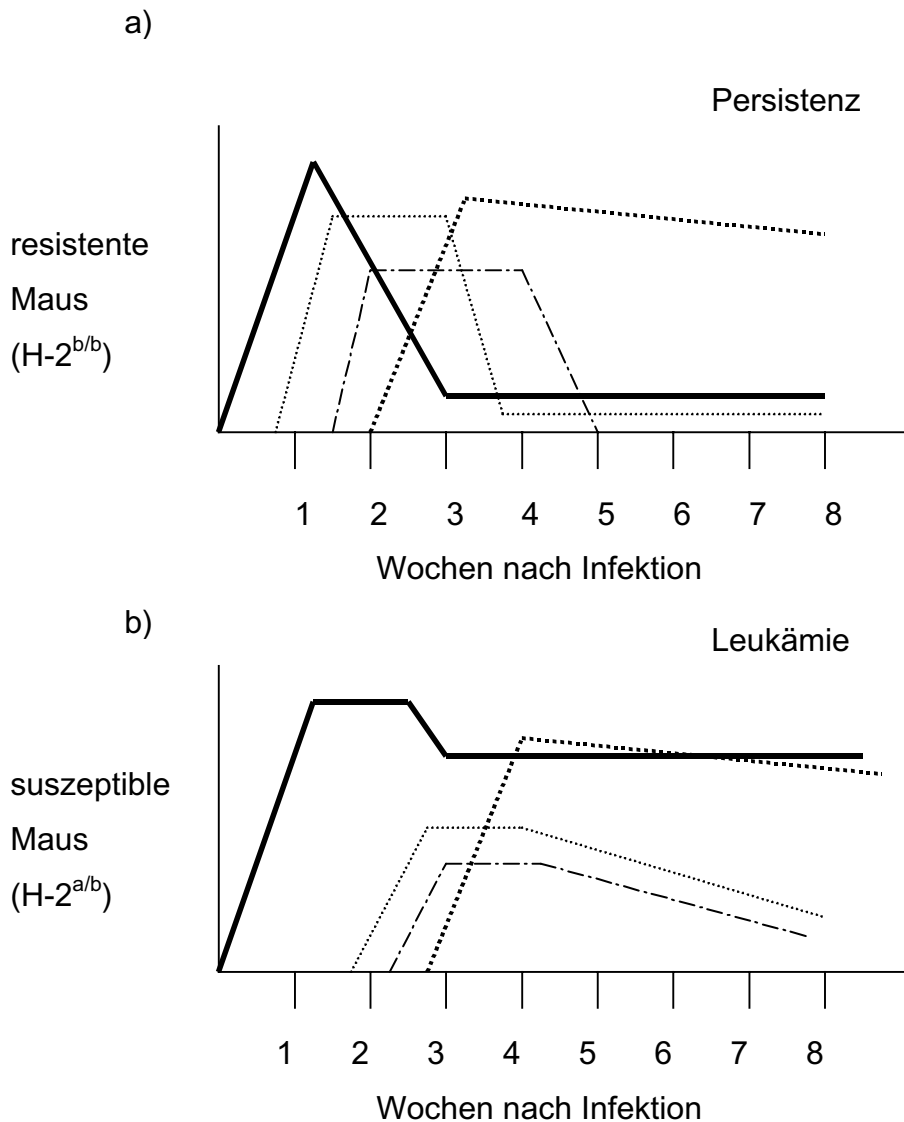
komplexes (MHC, in der Maus als H-2 bezeichnet), die die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das FV beeinflussen.

So sind C57Bl/6 Mäuse, die den H-2^b Haplotyp tragen, resistent gegen eine FV-induzierte Erythroleukämie, während z.B. A.BY Mäuse mit einem H-2^a Haplotyp suszeptibel sind. Hinzukommt, dass C57Bl/6 Mäuse noch das nicht-immunologische Resistenzgen Fv-2 tragen, welches die polyklonale Zellaktivierung von Erythrozyten-vorläuferzellen und die damit verbundene Splenomegalie limitiert (Hoatin und Kabat, 1995).

Zwischen den Mausstämmen mit dem H-2^b und dem H-2^a Haplotyp lassen sich eine Anzahl von kongenen Mausstämmen einordnen, welche unterschiedlich suszeptibel gegenüber einer FV-Infektion sind. Diese kongenen Mausstämme, welche sich nur in dem H-2 Genlokus unterscheiden, sind F1-Generationen aus der Verpaarung von H-2^a und H-2^b Haplotyp Mäusen. Aus der Verpaarung von A.BY x B10 entstehen Y10 Mäuse mit einem H-2^{b/b} Genlokus, welche resistent gegen eine FV Infektion sind. Y.10A Mäuse mit dem Genlokus H-2^{a/b} aus der Kreuzung von A.BY x B.10A Mäusen sind hingegen FV-suszeptibel (Tabelle 2). Das H-2 Gen ist wichtig für die Präsentation von viralen T-Zell-Epitopen.

Der immunologische Schutz vor einer FV-induzierten Erythroleukämie in FV-resistenten Mäusen wird durch die Kombination von FV-spezifischen CTLs, T-Helferzellen und neutralisierenden Antikörpern vermittelt. Nur ein Bestandteil der Immunantwort (z.B. CTLs) reicht nicht aus, um einen Schutz zu erzeugen. Die Depletion von z.B. CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen in FV-resistenten Mäusen führt dazu, dass das Immunsystem dieser Tiere nicht mehr in der Lage ist, das Virus zu kontrollieren. Die Tiere erkranken, wie FV-suszeptible Mäuse, an einer Erythroleukämie.

Entscheidend für den Schutz vor einer Erythroleukämie ist neben der Anzahl an spezifischen T-Zellen und B-Zellen auch die Kinetik der spezifischen Immunantwort. So können in FV-infizierten Mäusen mit dem Genlokus H-2^{a/b} erst etwa eine Woche später als in FV infizierten Mäusen mit H-2^{b/b} Genlokus T-Helferzellen detektiert werden (Abbildung 3). Durch die verzögerte und schwächere Immunantwort in FV-suszeptiblen Mäusen kann sich das Virus stark vermehren, bevor das Immunsystem die Virusinfektion kontrollieren kann. Die Virus-induzierte Erkrankung ist zu diesem Zeitpunkt in den H-2^{a/b} Mäusen schon so weit vorangeschritten, dass ein vom Immunsystem vermittelter Schutz nicht mehr aufgebaut werden kann.



— Viruslast
 T-Helferzellantwort
 - . - . - CTL-Antwort
 neutralisierende Antikörperantwort

Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Viruslast und der Immunantwort nach einer FV-Infektion

Schematische Darstellung der Kinetik der Viruslast und der Virus-spezifischen Immunantwort (neutralisierende Antikörper, T-Helferzellen und CTLs) nach Infektion von Mäusen mit dem Friend Virus. In a) ist der Verlauf bei einer FV-resistenten Maus dargestellt. Das Immunsystem der Y10-Mäuse (Genlocus H-2^{b/b}) ist in der Lage das Virus zu kontrollieren. Die Mäuse sind zeitlebens persistierend infiziert, haben aber eine normale Lebenserwartung. In b) ist die Kinetik der Viruslast und der spezifischen Immunantwort FV-suszeptibler Mäuse dargestellt. Die Virus-spezifischen Immunantworten können in FV-suszeptiblen Tieren im Gegensatz zu den FV-resistenten Tieren erst etwa eine Woche später nachgewiesen werden. Das Immunsystem dieser FV-suszeptiblen Mäuse ist nicht in der Lage das Virus zu kontrollieren. Die Tiere entwickeln eine Leukämie und versterben an den Folgen der Erkrankung.

1.9. Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämme nach FV-Infektion

Der Krankheitsverlauf einer FV-infizierten Maus lässt sich anhand der Veränderung der Milzgröße (Splénomegalie) verfolgen. Die Milzgrößen werden durch Palpation dokumentiert. Die Viruslast in der Milz korreliert mit der Milzgröße, so dass zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion anhand der Milzgröße Rückschlüsse über die Schwere der FV-induzierten Erkrankung gezogen werden können. Die Schwere der Splénomegalie wird in verschiedene Stufen eingeteilt, die mit dem Krankheitsverlauf korrelieren (Abbildung 4). So spiegelt die Milzgröße 1 (Milzgewicht von 0,1-0,2g) die Milz einer uninfizierten Maus wieder. Die Einteilung Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splénomegalie nach FV Infektion dar.

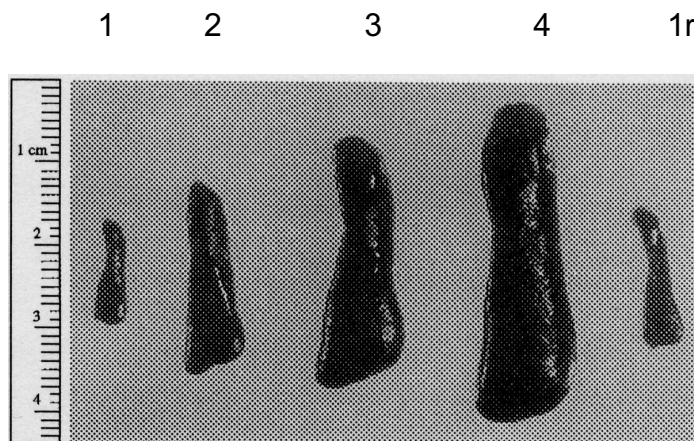


Abbildung 4: Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splénomegalie nach FV-Infektion (Hasenkrug *et al.*, 1998b)

Die Milz einer uninfizierten Maus mit etwa 0,1-0,2g ist als Milzgröße 1 definiert. Die Einteilung der Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splénomegalie nach FV-Infektion dar. Folgende Milzgrößeneinteilungen entsprechen folgenden Gewichten: 1 < 0,5g, 1-2 = 0,5-0,6g, 2 = 0,6-0,8g, 2-3 = 0,8-1,2g, 3 = 1,2-1,7g und 4 > 1,7g. Die Milzgröße 1r bezeichnet die Milzgröße einer persistierend infizierten Maus.

Die Milzvergrößerung bis zu zwei Wochen nach Infektion wird als Splénomegalie definiert, welche durch die rasche polyklonale Erythroblastenproliferation (Zielzellen) entsteht. Bei einer Milzgröße 3-4 wird ab dem Zeitpunkt 4 Wochen nach Infektion von einer Erythroleukämie gesprochen. Zu diesem Zeitpunkt treten die ersten FV-transformierten Zelle auf (Abbildung 5). Tiere, welche zu diesem Zeitpunkt eine Milzgröße 3-4 aufweisen, sterben an den Folgen der Erythroleukämie ab der 10ten Woche nach Infektion. Ist bei den FV-infizierten Tieren zum Zeitpunkt 4 Wochen nach

Infektion eine Milzgröße kleiner 2 nachweisbar, so sind diese Mäuse nicht an einer Erythroleukämie erkrankt. Diese Mäuse haben eine normale Lebenserwartung, sind aber persistierend mit FV infiziert.

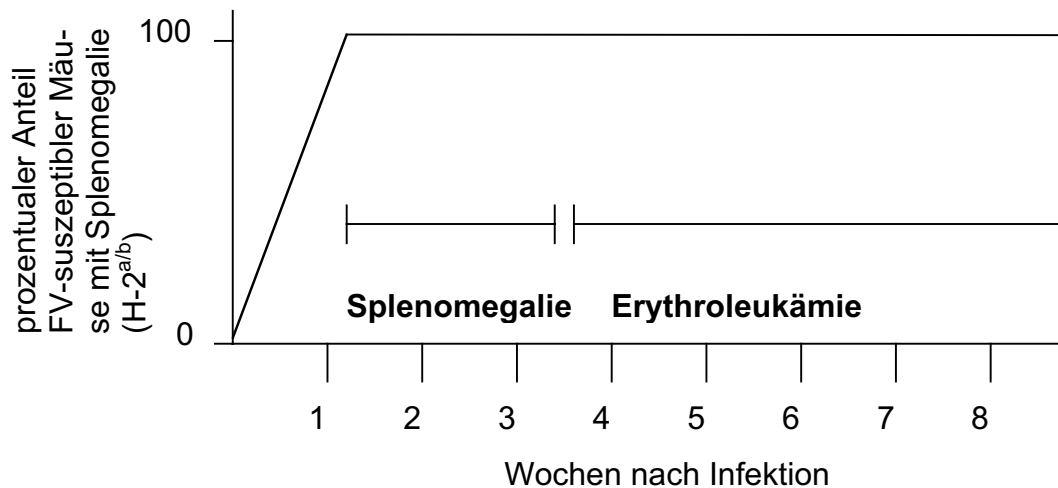


Abbildung 5: Schematische Darstellung des FV-induzierten Krankheitsverlaufs in FV-suszeptiblen Mäusen

Bei der Infektion mit dem Friend Virus entwickeln alle FV-suszeptiblen Tiere eine Splenomegalie, welche durch die rasche polyklonale Erythroblastenproliferation entsteht. Diese starke Milzvergrößerung wird bis etwa zwei Wochen nach Infektion als Splenomegalie bezeichnet. Ab dem Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion sind für die starke Milzvergrößerung FV-transformierte Milzzellen verantwortlich. Daher wird ab diesem Zeitpunkt von einer Erythroleukämie gesprochen.

Im folgenden sind die Krankheitsverläufe der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämmen kurz umrissen (Hasenkrug und Chesebro, 1997) .

- **C57Bl/6; (H-2^{b/b})**

Die Infektion von C57Bl/6-Mäusen mit einer hohen Dosis von FV (>3000 SFFU; "spleen focus forming units") induziert in den ersten zwei Wochen eine leichte Splenomegalie (mindestens Verdopplung des Milzgewichtes), die sich danach zurückbildet. Die C57Bl/6-Mäuse sind in der Lage, das Virus über das nicht-immunologische Fv-2 Gen und ihre effiziente FV-spezifische Immunantwort (MHC H-2^{b/b}) zu kontrollieren. Die Tiere erkranken nicht an einer Erythroleukämie, bleiben aber lebenslang persistierend infiziert und haben eine normale Lebenserwartung.

- **Y.10-Mäuse; (H-2^{b/b})**

Die F1-Mausgeneration der Verpaarung von B10-Mäusen mit A.BY-Mäusen wird als Y.10-Mäuse bezeichnet. Diese Y.10-Mäuse besitzen den MHC H-2^{b/b} Genlocus und sind FV-resistent. Anders als die C57Bl/6 Mäuse kontrollieren diese Mäuse das FV nur über ihre effiziente Virus-spezifische Immunantwort. Y.10 Mäuse besitzen keine vom Fv-2 Gen vermittelte genetische Resistenz gegen das FV.

Nach einer FV-Infektion entwickeln sich in Y.10 Mäusen in den ersten zwei Wochen eine massive Splenomegalie (bis zu 25faches des normalen Milzgewichtes). Ab der zweiten bis dritten Woche nach Infektion bildet sich die Milzvergrößerung zurück. Die Milzgröße bleibt dennoch zeitlebens leicht vergrößert (bis 0,5g). Die Tiere sind persistent mit FV infiziert und haben eine normale Lebenserwartung.

- **Y.10A-Mäuse; (H-2^{a/b})**

Als Y.10A-Maus wird die (B.10AxA.BY)F1-Generation bezeichnet. Y.10A-Mäuse besitzen einen H-2^{a/b} Genlocus.

Y.10A-Mäuse zeigen denselben FV-induzierten Krankheitsverlauf wie Y.10-Mäuse bei einer FV-Infektion mit geringer Virusdosis (<1500 SFFU), entwickeln aber bei einer hohen Virusdosis (>1500 SFFU) zu >95% eine FV-induzierte Erythroleukämie. Die Mäuse sterben an den Folgen der Erythroleukämie etwa 10-12 Wochen nach Infektion. (Hasenkrug und Chesebro, 1997; Miyazawa *et al.*, 1988; (Peterson *et al.*, 2000). Aufgrund des heterozygoten H-2 Gens bildet sich die FV-spezifische Immunantwort langsamer und schwächer aus als es bei den Y.10-Mäusen mit dem Genlocus H-2^{b/b} zu beobachten ist. Diese Kinetik in Y.10A-Mäuse verschafft dem Virus einen Vorsprung vor der FV-spezifischen Immunantwort, so dass das Immunsystem bei einer hohen Infektionsdosis nicht mehr in der Lage ist, die Infektion zu kontrollieren. Etwa drei bis vier Wochen nach Infektion bildet sich in Y.10A-Mäuse die FV-induzierte Erythroleukämie aus, die tödlich verläuft.

- **Balb/c (H-2^{d/d})**

Balb/c-Mäuse (Genlocus H-2^{d/d}) haben im Gegensatz zu den H-2^{a/b} Mäusen keine nachweisbare FV-spezifische Immunantwort, so dass geringste Dosen von FV zu einer Erythroleukämie und zum Tod führen.

Mausstamm	H-2	Fv-2	Splenomegalie	Leukämie	FV-spezifische T-Zell- und Antikörper-Antwort
C57Bl/6	b/b	r/r	schwach Rückgang nach ca. 2 Wochen	-- normale Lebenserwartung Persistenz von FV	stark
(B10xA.BY) F1.(Y10)	b/b	r/s	stark bis Milzgröße 4 Rückgang nach ca. 2-3 Wochen	-- normale Lebenserwartung Persistenz von FV	stark
(B10.AxA.BY) F1.(Y10A)	a/b	r/s	stark bis Milzgröße 4 kein Rückgang	++ FV-induzierter Tod ca. 10-12 Wochen nach Infektion	schwächer und etwa eine Woche langsamer als in H-2 ^{b/b} Mäusen
Balb/c	d/d	s/s	stark bis Milzgröße 4 kein Rückgang	++ FV-induzierter Tod nach ca. 14 Tagen	nicht nachweisbar

Tabelle 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme

In dieser Tabelle sind alle wichtigen Informationen über die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme in Bezug auf FV-induzierte Splenomegalie, Leukämie und FV-spezifischen T-Zell- und Antikörperantworten aufgelistet. Das Fv-2 Gen vermittelt eine genetische Resistenz gegen das FV; r = resistent, s = suszeptibel; Mäuse mit einem r/s Fv-2 Gen sind FV-suszeptibel.

1.10. Immunstimulative DNA mit CpG-Motiv

1.10.1. Entdeckung der immunstimulativen Aktivität von DNA mit CpG-Motiv

Im Jahr 1984 beschrieben Tokunaga *et al.*, dass genomische DNA-Fragmente von *Mycobacterium bovis* eine Antitumoraktivität, NK-Zell-Aktivierung und Interferon (IFN)-Produktion in Mäusen auslösen (Tokunaga *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1988). In den Jahren 1991/1992 zeigte die Arbeitsgruppe von Pisetsky, dass bakterielle DNA (bDNA) *in vitro* B-Zellen zur Proliferation anregt und NK-Zellen aktiviert (Messina *et al.*, 1991; Messina *et al.*, 1993).

Als Ursache für die immunstimulative Aktivität wurde bei der bDNA eine selbstkomplementäre palindromische Sequenz mit 5'-CG-3'-Motiv angenommen (Kuramoto *et al.*, 1992). Zur gleichen Zeit wurde gezeigt, dass bakterielle, virale und invertebrate DNA, sowie einige synthetische Einzelstrang-Oligodesoxyribonukleotide (ODN), einen starken immunstimulativen Effekt auf das vertebrierte Immunsystem auslösen. Kein Effekt war jedoch mit vertebrater oder pflanzlicher DNA zu beobachten (Krieg *et al.*, 1989; Tokunaga *et al.*, 1992; Branda *et al.*, 1993).

Für diese für den immunstimulativen Effekt verantwortliche bDNA-Sequenz mit 5'-CG-3'-Motiv wurden 1995 von Krieg *et al.* die Bezeichnung immunstimulative DNA mit CpG-Motiv eingeführt. Krieg *et al.* (1995) zeigten, dass diese immunstimulative DNA mit CpG-Motiv murine B-Zellen *in vitro* und *in vivo* zur Proliferation und Antikörperproduktion aktivierten.

In den folgenden Jahren wurde untersucht, welche Bestandteile der immunstimulativen DNA für den immunstimulativen Effekt verantwortlich sind, welche Zelltypen aktiviert werden und welches Zytokinmuster sich bei der *in vivo* Gabe in Vertebraten ausbildet. Außerdem wurde den Fragen nachgegangen, ob es funktionelle Unterschiede der immunstimulativen DNA-Aktivität in verschiedenen Spezies (z.B. Maus, Mensch) gibt, warum vertebrierte DNA nicht immunstimulativ ist und welcher Rezeptor den immunstimulativen Effekt bei vertebrierten Zellen auslöst.

Den immunstimulativen Eigenschaften der synthetisch hergestellten immunstimulativen DNA mit CpG-ODN liegt der immunstimulative Effekt von bDNA zugrunde. In dieser Arbeit wurde nur mit der synthetisch hergestellten DNA mit CpG-Motiv gear-

beitet. Aus diesem Grund wird in den nachfolgenden Kapiteln nur auf die synthetisch hergestellte DNA (CpG-ODN) näher eingegangen.

1.10.2. Aufbau einer immunstimulativen DNA mit CpG-Motiv

Bei der synthetisch hergestellten immunstimulativen DNA mit CpG-Motiv handelt es sich um eine einzelsträngige DNA-Sequenz von etwa 20 Basen. Diese Sequenz wird auch als CpG-DNA oder CpG-ODN bezeichnet.

Im Kern besteht die immunstimulative DNA-Sequenz aus einem unmethylierten Cytosin/Guanin Dinukleotid (CpG) mit flankierenden Basen (5'- 2x Purine und 3'-2x Pyrimidine).



$X_1 = \text{Purin}$

$X_2 = \text{Purin oder T}$

$Y_{1,2} = \text{Pyrimidin}$

Abbildung 6: Aufbau der Kernsequenz von CpG-ODN (Krieg *et al.*, 2000)

Werden Basenveränderungen im Grundgerüst des CpG-ODN vorgenommen, z.B. ein Austausch von CpG zu GpC, ist die Sequenz nicht mehr immunstimulativ.

Um einen Abbau der synthetisch hergestellten immunstimulativen DNA *in vitro* und *in vivo* durch Nukleasen zu vermeiden, werden die Oligodesoxynukleotide modifiziert. Eine Möglichkeit ist die Modifikation mit Phosphothioat, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

1.10.3. Aktivierung von vertebarten Zellen durch CpG-ODN

CpG-ODN sind in der Lage antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen (DC) und B-Zellen) direkt zu aktivieren (Krieg *et al.*, 1995; Stacey *et al.*, 1996; Lipford *et al.*, 1997; Sparwasser *et al.*, 1997a,b). Diese Aktivierung erfolgt durch die Bindung des CpG-ODN an den Toll-like Rezeptor-9 (TLR9) (Hemmi *et al.*, 2000). Das Aktivierungssignal des TLR9 wird über die Signalkaskade des MAPK-Weg ("Mitogen-activated protein kinases pathway") weitergeleitet und endet in der

Aktivierung von NF κ B (Stacey *et al.*, 1996). CpG-ODN stimulieren NK-Zellen und T-Zellen nicht direkt sondern über die CpG-ODN induzierten Zytokine (Ballas *et al.*, 1996; Cowdery *et al.*, 1996; Krieg, 2002). Die *in vivo* Gabe von CpG-ODN induziert eine Th1-dominierte Zytokinantwort (z.B. IL-12, TNF α , IFN γ) (Agrawal und Kandimalla, 2002).

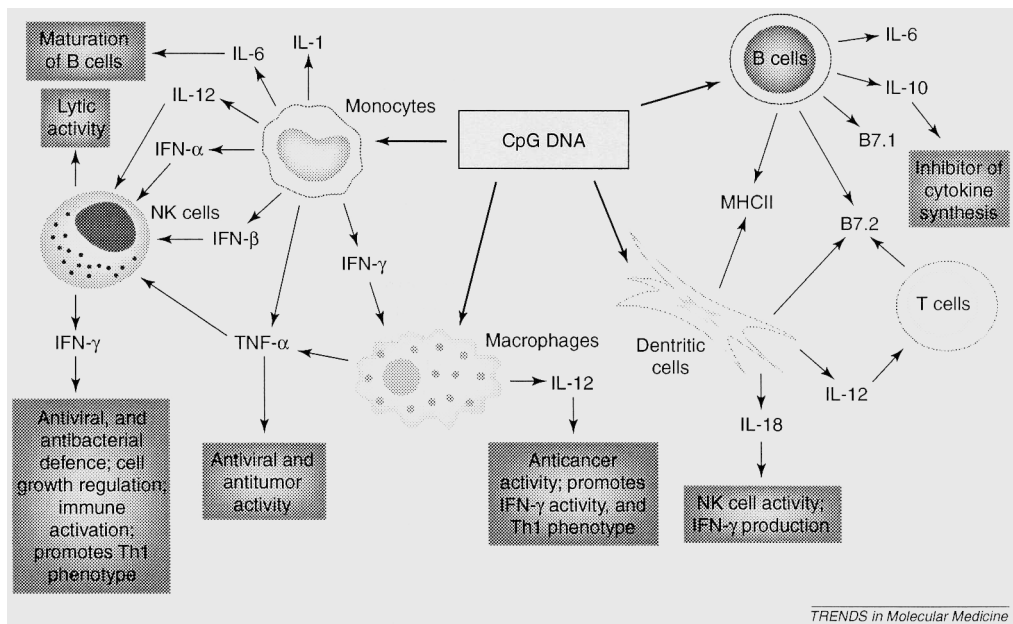


Abbildung 7: Schematische Darstellung von CpG-ODN Effekten auf Zellen des Immunsystems (Agrawal und Kandimalla, 2002)

1.10.4. Wirkung von CpG-ODN in der Maus

Werden CpG-ODN intraperitoneal (i.p.) in Mäuse injiziert, so entwickelt sich eine vorübergehende Splenomegalie (Verdopplung der Milzgröße) mit Peak am Tag 6 nach Injektion. Die Stärke der Splenomegalie ist sequenz- und dosisabhängig. Der Anstieg der Zellzahl in der Milz ergibt sich aufgrund einer Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Ter119⁺-Zellen) und myeloiden Zellen (Mac1⁺-Zellen) (Sparwasser *et al.*, 1999).

- Einfluß von CpG-ODN auf B-Zellen

CpG-ODN sind ein starkes Mitogen für B-Zellen. B-Zellen werden durch den direkten Kontakt mit CpG-ODN angeregt, in die G1-Phase des Zellzyklus einzutreten und IL-6 sowie IL-10 innerhalb einiger Stunden zu sekretieren. Die von CpG-ODN induzierte B-Zell-Proliferation besitzt *in vivo* ihr Maximum zwischen Tag 1 und 3 nach CpG-ODN Gabe. Die induzierte IL-6 Produktion führt zur verstärkten IgM Sekretion der B-Zellen (Yi *et al.*, 1998).

Darüberhinaus exprimieren B-Zellen nach CpG-Aktivierung mehr FC-Rezeptoren und kostimulatorische Moleküle wie MHC II, CD80 und CD86, wodurch T-Zellen bessere Hilfe erhalten (Davis *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999; Krieg *et al.*, 1995).

- Einfluss von CpG-ODN auf professionelle antigenpräsentierende Zellen

CpG-ODN stimulieren DC, Makrophagen und Monozyten, Zytokine der Th1-dominierenden Immunantwort zu sekretieren, wozu u.a. IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- α , IFN- β und IFN- γ gehören. Durch die Sekretion z.B. von IL-12 werden NK-Zellen aktiviert und Th1-Zellen gebildet. Außerdem ist eine CpG-ODN induzierte Hochregulierung von MHC II, CD40, CD80 und CD86 (kostimulatorische Moleküle) zu beobachten (Stacey *et al.*, 1996; Lipford *et al.*, 1997; Sparwasser *et al.*, 1997a,b). Diese Hochregulierung verstärkt die Präsentation von Antigenen auf der Oberfläche, die zu einer stärkeren antigenspezifischen T-Zellantwort (Th1, Th2, CTL) beiträgt. Bei der CpG-Aktivierung von DC wurde außerdem beobachtet, dass mehr exogene Proteine durch MHC I auf der Oberfläche der DC präsentiert werden, was eine effiziente CTL-Antwort induzieren kann (Maurer *et al.*, 2002)

- indirekter Einfluss von CpG-ODN auf NK-Zellen und T-Zellen

Der stimulatorische CpG-ODN Effekt auf murine NK-Zellen wird indirekt über die Anwesenheit von Zellen, welche IL-12 sekretieren, induziert (Cowdery *et al.*, 1996; Ballas *et al.*, 1996). Der Hauptanteil der IFN γ -Produktion in CpG-ODN stimulierten Milzzellen in der Maus wird von NK-Zellen produziert. Im Moment wird davon ausgegangen, dass CpG-ODN keinen direkten Effekt auf ruhende T-Zellen haben (Krieg, 2002).

1.10.5. Die DNA von Vertebraten ist nicht immunstimulativ

Die vertebrale DNA hat keinen immunstimulativen Effekt auf Zellen von Vertebraten. Das liegt daran, dass die Frequenz an CpG-Dinukleotiden in vertebrater DNA (vDNA) supprimiert ist. Das Vorkommen von CpG-Frequenzen liegt in vDNA zwischen 1/50 bis 1/60 Basen, während die CpG-Motive in bDNA in einer Frequenz von 1/16 Basen vorkommen. Außerdem ist die vDNA in den meisten Fällen am Cytosin des CG-Dinukleotids methyliert, während bDNA am CG-Dinukleotid unmethyliert vorliegt (Bird *et al.*, 1980). Untersuchungen zeigten, dass auch eine höhere Konzentration von vDNA keinen immunstimulatorischen Effekt auslöst. Selbst unmethylierte vDNA weist keine immunstimulative Aktivität auf (Sun *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass die stimulatorischen CpG-Motive (GACGTT) im humanen Genom stark supprimiert sind, nicht aber die CG-Dinukleotid-Sequenzen an sich. Die CG-Motive sind jedoch in der vDNA am 3'-Ende (Cytosin) und/oder am 5'-Ende (Guanin) anders flankiert als in bDNA, wodurch kein immunstimulativer Effekt ausgelöst werden kann (Han *et al.*, 1994). Diese nicht-stimulativen CpG-Motive werden auch als neutralisierende CpG-Motive bezeichnet, da sie spezielle Antagonisten der immunstimulativen CpG-Motive sind (Krieg *et al.*, 1998).

Untersuchungen der immunstimulativen Eigenschaften viraler Genome auf das vertebrale Immunsystem zeigen ein sehr heterogenes Bild (Krieg *et al.*, 1996; Krieg *et al.*, 1998b). So gibt es virale Genome, welche einen immunstimulativen Effekt auf das vertebrale Immunsystem ausüben (z.B. Adenovirus-Serotyp 12) andere hingegen nicht (z.B. Lentiviren, Adenovirus-Serotyp 2). Statistische Analysen der Genome von Lentiviren zeigten, dass die CpG-Motiv-Suppression durch eine evolutionäre Adaption an die Replikation im eukaryontischen Wirt angepaßt ist (Shpaer und Mullins, 1990; Karlin *et al.*, 1994; Krieg 1996). Somit ist das Genom der Lentiviren nicht mehr immunstimulativ. Das Genom von Adenoviren besitzt hingegen eine Vielzahl an CpG-Motiven. So konnte für das Genom des Adenovirus-Serotypes 12 ein immunstimulativer Effekt nachgewiesen werden. Für die Genome der Adenoviren-Serotypen 2 und 5 konnte trotz dieser Vielzahl an CpG-Motiven hingegen kein immunstimulativer Effekt gezeigt werden. Dieser nicht immunstimulative Effekt kommt durch die größere Anzahl von neutralisierenden CpG-Motiven im Verhältnis zu den immunstimulativen CpG-Motiven zustande (Krieg *et al.*, 1998b).

1.10.6. Interaktion von CpG-ODN mit dem Toll-like Rezeptor-9

Der immunstimulative Effekt von CpG-ODN wird über den Toll-like Rezeptor-9 (TLR9) vermittelt. Die Erkennung der CpG-ODN durch den TLR9 ist von der Basensequenz der CpG-ODN und der Empfänger-Spezies (Maus, Mensch) abhängig. So können z.B. ODN-Sequenzen (5'-GACCGTT-3'), die in der Maus über den TLR9 myeloiden Mauszellen aktivieren, bei humanen Zellen wirkungslos sein (Krieg *et al.*, 1995; Yi *et al.*, 1998; Rankin *et al.*, 2001). Dagegen aktiviert die Kernsequenz 5'-GTCCGTT-3' humane Zellen, aber nur extrem schlecht Mauszellen (Hartmann *et al.*, 2000).

Der TLR9 enthält alle Strukturmerkmale, die charakteristisch für die Gruppe der TLRs sind. Die meisten TLRs werden auf der Oberfläche von Zellen exprimiert. Wo sich der TLR9 befindet, ist dagegen umstritten. Die Zellaktivierung durch CpG-ODN wird gehemmt, wenn Zellen mit Chloroquine vorbehandelt werden (Häcker *et al.*, 1998; Macfarlane und Manzel, 1998). Die Behandlung mit Chloroquine verhindert die Ansäuerung von Lysosomen. Das zeigt, dass für den CpG-induzierten Aktivierungsschritt der Zelle die Ansäuerung im Lysosomen essentiell ist. Chuang *et al.* (2002) postulieren aufgrund ihrer Mutationsstudien am TLR9, dass der Rezeptor an der Zelloberfläche liegt.

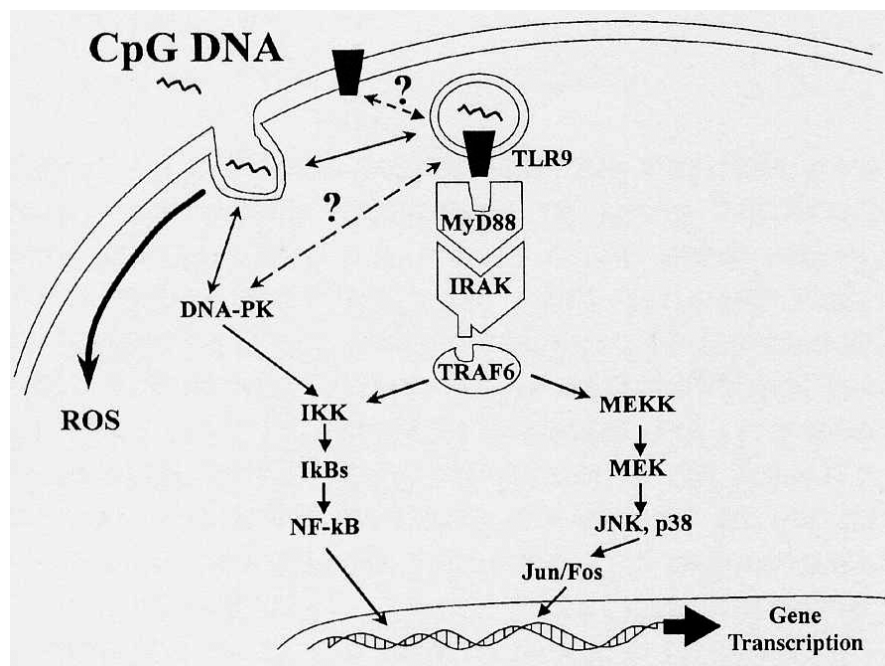


Abbildung 8: Schematische Darstellung des CpG-DNA Signaltransduktionsweges (Wild und Sur, 2001)

1.10.7. Klinische Anwendungsgebiete von CpG-ODN

Das klinische Anwendungsgebiet für den Einsatz von CpG-ODN ist sehr heterogen. CpG-ODN können als Adjuvants bei Impfstoffen, bei der Bekämpfung von Allergien, zur Behandlung von Krebs oder bakteriellen, parasitären oder viralen Infektionen eingesetzt werden. Im folgenden werden Beispiele für die klinische Verwendbarkeit von CpG-ODN dargestellt.

Bei der Verwendung von CpG-ODN als Adjuvants mit Vakzinen war im Mausmodell (z.B. bei Hepatitis B Virus, HBV) ein stark erhöhter Titer an viruspezifischen Antikörpern und CTLs im Vergleich zu immunisierten Tieren ohne CpG-ODN festzustellen (Davis *et al.*, 1998). Dieser Adjuvants-Effekt wurde auch erfolgreich in Orangutans nachgewiesen. Orangutans, welche eine kaum nachweisbare HBV-spezifische Antikörperantwort nach Immunisierung mit einem kommerziell erhältlichen Impfstoff haben, zeigten eine drastische Erhöhung der HBV-Antikörperantwort durch Koinjektion des kommerziellen Impfstoffes mit CpG-ODN (Davis *et al.*, 2000). Seit dem Frühjahr 1999 testet die Firma Coley Pharmaceutical (Langenfeld, Deutschland) in klinischen Studien CpG-ODN als Adjuvants bei der HBV-Vakzine mit dem kommerziellen Impfstoff Engerix B. Die klinischen Studien (Phase I und II) zeigten, dass die Impfung mit CpG-ODN einen schützenden Antikörpertiter zwei Wochen nach einer einmaligen Immunisierung induzierte. Die Impfung mit Engerix B allein induziert diesen schützenden Antikörpertiter gegen HBV frühestens nach der Auffrischungsimpfung.

Bei der Anwendung von CpG-ODN bei Allergien (z.B. bei Asthma) wurde gezeigt, dass eine Asthmaentwicklung, wenn CpG-ODN mit dem Allergen zusammen inokuliert werden, im Mausmodell verhindert werden kann (Kline *et al.*, 1998). Im Jahr 2002 zeigte Kline *et al.* außerdem, dass CpG-ODN als erfolgreiche Therapie in einer ausgebildeten eosinophilen Lungenerkrankung in der Maus einsetzbar ist (Kline *et al.*, 2002). Die erfolgreiche Prophylaxe und Therapie von Allergien beruht auf der CpG-ODN induzierten Verschiebung der Immunantwort von der durch das Allergen induzierten Th2-Antwort zu einer CpG-ODN induzierten Th1-Antwort.

Die experimentelle Behandlung von Tumoren mit CpG-ODN ist ein Gebiet mit sehr heterogenen Ergebnissen. Der Erfolg der CpG-ODN Therapie ist davon abhängig, ob

es sich um einen diffusen oder soliden Tumor handelt. Hinzukommt, dass der Therapieerfolg von der verwendeten CpG-ODN Sequenz abhängig ist. So induzieren einige CpG-ODN eine T-Zell-abhängige Immunantwort, während andere CpG-Motive eine NK-Zell-abhängige Antwort induzieren (Krieg, 2002). Ballas *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Tumorzellen (B16 Meloma-Mausmodell), die gegenüber NK-Zellen suszeptibel sind, erfolgreich mit einer CpG-ODN Sequenz eliminiert werden konnten, die beim EL4 Lymphomen (T-Zell-abhängig) nicht effektiv waren. Außerdem zeigten Ballas *et al.* (2001), dass in ihren verwendeten Tumormodellen Mäuse vor einer Tumorentstehung geschützt werden konnten, wenn Tumorzellen (B16 bzw. EL4) zusammen mit CpG-ODN injiziert wurden. Dies konnten Heckelsmiller *et al.* (2002) für ihr Tumormodell (C26 Zellen) nicht zeigen. Allerdings führte eine CpG-ODN Injektion in das ausgebildete Colonkarzinom (durch C26 Zellen induziert) zur vollständigen Rückbildung des Tumors (Heckelsmiller *et al.*, 2002). In den erfolgreich mit CpG-ODN behandelten Tieren wurde eine tumorspezifische zelluläre Immunantwort nachgewiesen, welche einen Schutz vor einer erneuten Belastung mit denselben Tumorzellen aufwies.

Die Firma Coley Pharmaceutical (Langenfeld, Deutschland) führt erste klinische Studien (Phase I), in denen CpG-ODN gegen Tumore (z.B. T-Zell-Lymphom, Melanoma und Mammakarzinom) eingesetzt wurden, durch.

CpG-ODN können außerdem erfolgreich als Prophylaxe gegen bakterielle Infektionen eingesetzt werden (Paraimmunisierung). So konnten Krieg *et al.* (1998a) zeigen, dass Mäuse durch prophylaktische CpG-ODN Gaben vor einer *Listeria monocytogenes*-induzierten Erkrankung geschützt werden können. Um diesen Schutz zu induzieren, muss die CpG-ODN Gabe mindestens 48 Stunden vor der Infektion erfolgen. Einen Schutz vor einer *Leishmania major*-induzierten Erkrankung durch die prophylaktische CpG-ODN Gabe konnte auch von Lipford *et al.* (2000) gezeigt werden. Der CpG-ODN vermittelte Schutz hält dabei bis zu zwei Wochen nach ODN-Gabe an. Außerdem zeigten Lipford *et al.* (2000), dass auch bei direkter Gabe von CpG-ODN am Tag der Infektion ein Schutz vor der *L. major* induzierten Erkrankung generiert werden kann.

Neben der Prävention einer Infektion (Impfung oder Paraimmunisierung) ist die Behandlung einer pathogen induzierten Erkrankung in der Klinik von großer Bedeutung.

Zimmermann *et al.* (1998) zeigten, dass Mäuse mit einer etablierten *L. major* induzierten Erkrankung erfolgreich mit CpG-ODN therapiert werden konnten. *L. major* induziert in den Mäusen eine Th2-Immunantwort. Der CpG-ODN Therapieerfolg wird durch die Verschiebung der *L. major*-induzierte Th2-Immunantwort in eine CpG-ODN induzierte Th1-Immunantwort vermittelt. Diese erfolgreich therapierten Mäuse entwickelten eine *L. major* spezifische zelluläre und humorale Immunantwort, die die Tiere vor einer erneuten Belastungsinfektion schützten.

Für den Einsatz von CpG-ODN als Therapeutikum für bakterielle oder parasitäre Infektionen wurde bis jetzt noch keine klinische Studie durchgeführt.

Mit dieser experimentellen Arbeit wurde zum ersten Mal CpG-ODN gegen virale Infektionen eingesetzt (Paraimmunisierung und Therapie).

Aus diesen beschriebenen klinischen Anwendungsmöglichkeiten der CpG-ODN stellte sich die Frage, ob sich CpG-ODN auch für die Bekämpfung von viralen Infektionen einsetzen lassen. Für die Untersuchungen der Verwendbarkeit von CpG-ODN als Prophylaxe bzw. Therapie bei einer viralen Infektion wurde das Friend Virus Mausmodell verwendet.

1.11. Transkutane Immunisierung mit CpG-ODN als Adjuvants

Menschen durch eine Impfung vor einer viralen Infektion zu schützen ist meistens der kosteneffektivste und einzige Weg, da es bis heute nur wenige antiviral wirksame Medikamente gibt. Die meisten Impfungen werden durch Injektionen in den Muskel (intramuskulär, i.m.) oder unter die Haut (subkutan, s.c.) durchgeführt. Der Nachteil dieser Impfstrategie ist, dass für die Impfung Einmalspritzen, medizinisches Personal und die Kühlung des Impfstoffes notwendig sind. Dieses ist mit hohen Kosten verbunden und lässt sich in der Praxis vor allem außerhalb der Industrieländer nur bedingt durchführen. Daher sind einfachere und kostengünstigere Immunisierungstechniken nötig. Hinzukommt, dass Vakzine mit einem nicht-replizierenden Antigen zwar eine humorale Immunantwort (Antigen-spezifische Antikörper) induzieren, aber keine Antigen-spezifische CTL-Antwort (Chen *et al.*, 2001). Gerade für die Kontrolle von intrazellulären Pathogenen wie Viren, sind CTLs aber oft wichtig.

Untersuchungen zur Immunisierung über die intakte Haut (transkutan) zeigten, dass bei dieser Impfstrategie neben spezifischen Antikörpern auch spezifische CTLs ge-

gen ein nicht-replizierendes Antigen gebildet werden (Chen *et al.*, 2001). Bei der transkutanen Immunisierung wird auf die Haut ein Gemisch aus Antigen, Cholera Toxin und eventuell CpG-ODN aufgetragen. Beim Antigen kann es sich z.B. um Virus-Peptide, Proteine oder inaktiviertes Virus handeln. Das Cholera Toxin dient zur Permeabilisierung der Haut, so dass die Impfsubstanz in die Epidermis gelangen kann. Dort wird das Antigen von den Langerhans-Zellen (LC) aufgenommen, in die regionalen Lymphknoten transportiert und dort den naiven T-Zellen präsentiert (Chen *et al.*, 2001). Die aufgenommenen Antigene sind im Zytosol der LC zu finden, so dass eine endosomale Aufnahme ausgeschlossen wird. Das Antigen wird vorwiegend über MHC I präsentiert und löst eine T-Zellantwort aus. Das Cholera Toxin induziert als Adjuvants eine Th2-dominierte Immunantwort. Für eine antivirale Immunantwort ist eine Th1-dominierte T-Zellantwort aber effektiver. Die Zugabe von CpG-ODN zu dem Antigen/Cholera Toxin-Gemisch induziert *in vivo* eine Th1-dominierte Immunantwort mit stärkerer Antigen-spezifischer CTL-Antwort und höherem Titer an IgG2a-Antikörpern im Vergleich zu der Immunisierung ohne CpG-ODN (Beignon *et al.*, 2002).

Chen *et al.* (2001) konnten zeigen, dass durch die Immunisierung über die Haut mit Cholera Toxin und inaktiviertem Influenzavirus Mäuse vor einer Belastungsinfektion mit Maus Influenzavirus geschützt sind. In diesen immunisierten Mäusen konnten Antigen-spezifische Antikörper und CTLs nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse von Beignon *et al.* (2002) und Chen *et al.* (2001) zeigten, dass der CpG-ODN Einsatz als Adjuvants bei der transkutanen Immunisierung einen Schutz vor einer viralen Belastungsinfektion induzierte. Daraus stellte sich die Frage, ob eine transkutane Immunisierung gegen Retroviren angewendet werden kann. Als Modell für die Vakzinestudie gegen Retroviren wurde das Friend Virus Mausmodell verwendet.

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Das Immunsystem von Vertebraten ist in der Lage nach einer Virusinfektion eine spezifische Immunantwort auszubilden. Ist die Immunreaktion gegen den Erreger aber nicht schnell genug, nicht gegen die richtigen Komponenten des Virus gerichtet oder es werden nicht die richtigen Zellen des Immunsystems aktiviert, so kommt es zu einer akuten Erkrankung des Wirts oder zu einer Viruspersistenz mit chronischer

Erkrankung. Virusinfektionen induzieren in der Regel eine Helfer-T-Zell Typ1 (Th1) dominierte Immunantwort, wobei Virus-spezifische zytotoxische T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Erregerabwehr spielen. Immunstimulative DNA mit CpG-Motiv (CpG-ODN) vermittelt *in vivo* durch die Aktivierung von Zellen des Immunsystems eine Th1 Zytokinproduktion. Dadurch können CpG-ODN eine antigen-spezifische zelluläre Immunantwort verstärken.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Immuntherapien mit CpG-ODN einen Schutz vor einer Virus-induzierten Erkrankung vermitteln können. Nach der Etablierung einer erfolgreichen antiviralen Therapie soll der Wirkmechanismus der CpG-ODN aufgeklärt werden. Als experimentelles Modell wird das Friend Virus, ein Retroviruskomplex, welcher eine Leukämie in Mäusen verursacht, verwendet. Im zweiten Teil der Arbeit soll die Wirkung von CpG-ODN als Adjuvants bei einer Impfung gegen das Friend Virus, am Beispiel einer transkutanen Immunisierung, untersucht werden.

2. Material

2.1. Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien von den Firmen *Applichem*, *Merck*, *Roth* und *Sigma* bezogen.

Acrylamid, Agarose (*Biozyme*), Agar (*Gibco*), 3-Amino 4-Ethylencarbazole (AEC), Ammoniumchlorid, Ammoniumpersulfat, Äther, Bisacrylamid, BSA (Rinderserum Eiweiß), Calciumchlorid, Cholera Toxin (Sigma, Nr. C-8052), Chloroform, N-N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid (DMSO), DEPC, EDTA, Ethanol, Ethidiumbromid, Essigsäure, Formalin (40%), Fötale Kälberserum (*Biochrom KG*), Glukose, Harnstoff, Heparin, Hexadimethrine bromide (Polybren), Ionomycin, Isopropanol, LB Broth Base (*USB*), Ketamine, β -Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumazid, o-Phenylenediamine (OPD), Phenol, Phorbol-12-Myristate 13-Acetate (PMA), Pikrinsäure, RPMI-Medium (*Gibco*), Salzsäure, SDS (Sodium dodecyl sulfate-1-¹⁴C), Schafserythrozyten (Virion, München), Schwefelsäure, Streptavidin-AP, TEMED, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, TRIzol (GIBCOBRL), Trypanblau, Tween 20, Wasserstoffperoxid, Xylasine

2.2. Antibiotika

- Ampicillin (*Sigma*)
- Penicillin (*Grünenthal*)
- Streptomycin (*Fatol* Arzneimittel)

2.3. Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt.

Tabelle 3: Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
AEC Gebrauchslösung	AEC-Stock-Lösung (4mg/ml) wird 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion mit 0,5 µl 30 % H ₂ O ₂ / ml Lösung gestartet
AEC-Stocklösung (4mg/ml)	AEC-Tabletten in N-N-Dimethylformamid gelöst
ATV	137mM NaCl 5,4 mM KCl 5mM D-Glucose 70mM NaHCO ₃ 500mg/l Trypsin 200mg/l Versene Σ 1Liter H ₂ O _{dest.}
Bouin's Lösung	75ml gesättigte Pikrinsäure 25ml 40% neutrales Formalin 5ml Essigsäure
Einfriermedium	80% FCS 20% DMSO
FACS-Puffer	PBS 0,02% Natriumazid 0,1% BSA
MuLV-ELISA: Coatingpuffer	200mM Natriumkarbonat, pH 9,6
MuLV-ELISA: Substratpuffer	35mM Zitronensäure x H ₂ O 66mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, pH 5,2

Material

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBBS	0,2g KH_2PO_4 1,15g Na_2HPO_4 0,14g CaCl_2 0,32g KCl 7,2g NaCl 0,2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1ml Phenol Rot (1%) 1,0g Glukose Σ 1Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
PBS	137mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4mM KH_2PO_4 1,5mM CaCl_2 1mM MgCl_2 Σ 1Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}	137mM NaCl 2,7mM KCl 4,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,4mM KH_2PO_4 Σ 1Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
Polyacrylamidgel (4%)	54ml Page Buffer (100g Harnstoff, 67,5ml Wasser, 40ml 5x TBE) 6ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid 450 μ l 10% APS 30 μ l TEMED

Material

Bezeichnung	Zusammensetzung
Probenpuffer (6x)	Bromphenolblau (0,25%) Xylencyanol (0,25%) Glycerol (30%)
TAE (50x)	2M Tris Base 57,1% Eis-Essigsäure 0,5mM EDTA (pH 8)
TBE (5x)	54g Tris Base 27,5g Borsäure 20ml 0,5M EDTA (pH 8)

2.4. Antikörper

Die Antikörper (AK) wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von BD Pharmingen (Heidelberg) bezogen.

Alle verwendeten Fluorochrome absorbieren Licht mit der Wellenlänge 488nm und werden dadurch zur Emission von Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt. Abkürzungen der Fluorochrome: FITC, Fluoresceinisothiocyanat (Peak-Emission bei 520nm); PE, Phycoerythrin (Peak-Emission bei 575nm); APC, Allophycocyanin (Peak-Emission bei 660nm); CyChr, Cy-Chrome (Peak-Emission bei 682nm).

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflußzytometrie

Antikörper	Klon	Hersteller
CD19-FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D3	
CD19-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	1D3	
CD2-PE (LFA-2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	RM2-5	
CD4-APC (L3T4); monoklonaler Ratte anti Maus AK	RM4-5	
CD4-FITC (L3T4); monoklonaler Ratte anti Maus AK	H129.19	

Material

Antikörper	Klon	Hersteller
CD4-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	H129.19	
CD43-FITC (L3T4); monoklonaler Ratte anti Maus AK	1B11	
CD69-PE; monoklonaler Hamster anti Maus AK	H1.2F3	Caltag
CD8a-CyChr (Ly-2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	53-6.7	
CD8a-FITC (Ly-2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	5H10	Caltag
CD8a-PE (Ly-2); monoklonaler Ratte anti Maus AK	5H10	Caltag
Thy-1.2-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK CD90.2	30-H12	
CD16/CD32-Biotin; monoklonaler Ratte anti Maus AK	2.4G2	
Ter119-PE (Ly-76); monoklonaler Ratte anti Maus AK	TER-119	
Mac-1-FITC (CD11b); monoklonaler Ratte anti Maus AK	M1/70	
MHCII-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	M5/114.15.2	
Pan-NK-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK	DX5	
NK1.1-FITC; monoklonaler Maus anti Maus AK	PK136	

Tabelle 5: sonstige Antikörper

- „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelter Ratte anti Maus IgG₁ monoklonaler AK (Klon: X56)
- HRP gekoppelter Esel anti Maus IgG (Dianova Nr. 715-035-151)
- HRP gekoppelter Ziege anti Maus IgG_{2a} (NatuTec Nr. E90-107)
- HRP gekoppelter Ziege Anti Maus Immunoglobulin (bindet bevorzugt IgG, IgA und IgM; *Dako*)
- Monoklonaler AK 720: Maus Anti-MuLV env (Isotyp Ig2b), (Robertson *et al.*, 1991)
- Monoklonaler Antikörper 48: Anti-MuLV gp70 env (Isotyp IgG2a), (Chesebro *et al.*, 1983)
- Monoklonaler Antikörper 34: Anti-MuLV p15 (Isotyp IgG2b), (Chesebro *et al.*, 1981)
- Monoklonaler IgG2b PE-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Maus (Caltag)
- Monoklonaler NK1.1 Maus-anti-Maus Antikörper Klon LY-55
- Monoklonaler biotinylierter anti-IFN γ Ratte-anti-Maus Antikörper Klon XMG1.2
- Monoklonaler anti-IFN γ Klon R4-6A2

2.5. Tetramere

PE markierte MHC Klasse I H2-D^b Tetramere spezifisch für FV GagL Peptid (D^b-GagL Tetramere), siehe auch Altman *et al.* (1996). Die Tetramere (FV gag CD8⁺ Epitop gPr80^{gag}85-93 (Chen *et al.*, 1996) wurden von K.Schepers und T.N.M. Schumacher zur Verfügung gestellt (Stromnes *et al.*, 2002). TO-PRO-3 wurde verwendet, um tote Zellen für die Durchflußzytometrie anzufärben (Molecular Probes, USA).

2.6. Zytokine

Als Standard für den IFN γ ELISA wurde rekombinantes IFN γ (Maus) von BD Pharmingen (Heidelberg) bezogen.

Zur Verstärkung der T-Zellproliferation wurde rekombinantes IL-2 (Maus) von der Firma Roche (Basel) verwendet.

2.7. F-MuLV spezifische Peptide (T-Zell-Epitope)

Die verwendeten F-MuLV spezifischen T-Zell-Peptide wurden von der Firma Jerini (Berlin) synthetisiert. Die Th-Zell-Peptide wurden in sterilem PBS gelöst. Das CTL-Peptid wurde in 50% sterilem DMSO und 50% sterilem PBS gelöst.

Tabelle 6: F-MuLV Peptide

Peptidname	Sequenz	Referenz
CTL-Epitop von F-MuLV	CCLCLTVFLKK-Amid	Chen <i>et al.</i> , 1996
TH1-Epitop von F-MuLV	DEPLTSLTPRCNTAWNRLKL	Miyazawa <i>et al.</i> , 1995
TH2-Epitop von F-MuLV	HPPSYVYSQFEKSYRHKR	Miyazawa <i>et al.</i> , 1995

2.8. CpG-ODN Sequenzen

Die Phosphothioat-modifizierten CpG-ODN wurden von der Firma MWG (Ebersberg) hergestellt. Die ODN wurden in sterilem PBS verdünnt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 7: CpG-ODN Sequenzen

ODN-Name	Sequenz
CpG-1668	5'-tcc atg acg ttc ctg atg ct -3'
CpG-Control	5'-tcc atg agc ttc ctg atg ct -3'
CpG-1826	5'-tcc atg acg ttc ctg acg tt -3'

2.9. Viren und Zell-Linien

Mus Dunnii: Maus Fibroblasten Zell-Linie

Hybridomazelllinie 169.4 monoklonaler α -CD8 Antikörper aus der Maus
(Hasenkrug *et al.*, 1998a)

2.10. Kommerzielle Standardtests

- "AP Conjugate Substrate Kit", Bio-RAD (München)
- "OptEIA Mouse IFN γ Set", BD Pharmingen (Heidelberg)
- "RiboQuantTM Ribonuclease Protection Assay" (RPA) , BD Pharmingen (Heidelberg)
- "cytokine emplate set mCK-1", BD Pharmingen (Heidelberg)

2.11. Mäuse

In die Versuche wurden nur Mäuse mit einem vollständig ausgebildeten Immunsystem eingesetzt. Die Tiere mußten dazu mindestens 2 1/2 Monate alt sein. Für alle Experimente, welche über einen Zeitraum von länger als 10 Tage gingen, wurden ausschließlich Weibchen verwendet. In den Experimenten bis zu 10 Tagen wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg gezüchtet. Alle verwendeten Mäuse und deren Charakteristika wurden in Tabelle 2 zusammengefaßt.

3. Methoden

3.1. Versuchstiere

3.1.1 Infektion

Die Friend Virus Infektion der Mäuse wurde mit einer 0,6 x 25mm Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt. Es wurde mit 3000SFFU/Maus infiziert.

3.1.2 Injektionen

Für die ODN-Gabe, die Depletion von Zellpopulationen und die Narkotisierung der Mäuse wurde das jeweilige Agens in die Bauchhöhle (intraperitoneal; i.p.) der Maus injiziert. Bei der Injektion lag die Maus überspannt auf dem Rücken. Das Bauchfell war dabei gespannt, wodurch bei der Injektion keine inneren Organe verletzt werden konnten. Das Injektionsvolumen betrug 0,03-1ml.

3.1.2.1 Injektionen von CpG-DNA

Für die i.p. Injektionen von CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN wurden die ODN lyophilisiert von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany) bezogen. Pro ODN-Injektion wurden 15nmol/Maus verwendet. Dazu wurden die ODN auf 30nmol/ml mit sterilem PBS verdünnt. Die Injektionen wurden mit einer 0,6 x 25mm Kanüle durchgeführt.

3.1.2.2 Depletion von CD8⁺ bzw. NK1.1⁺-Zellen in Mäusen

Um funktionelle Aussagen über bestimmte Zellpopulationen machen zu können, wurden diese *in vivo* depletiert. Die Injektionen wurden mit einer 0,6 x 25mm Kanüle durchgeführt.

Zur Depletion von CD8⁺-Zellen in Mäusen wurde der Überstand der Hybridomazelllinie 169.4 verwendet. Diese Hybridomazelllinie produziert monoklonale anti-CD8⁺ (α CD8⁺) Antikörper. Den Tieren wurde 0,5ml zellfreier Hybridoma-überstand i.p. injiziert. Für die Depletion in der akuten Phase der FV-Infektion wurde den Mäusen 4x

der Hybridomaüberstand im Abstand von 2 Tagen inokuliert. Die erste Depletion wurde am Tag der FV-Infektion durchgeführt.

Zum Zeitpunkt 9 Tage nach der letzten α CD8⁺ Antikörpergabe waren 95,2% der CD8⁺-Zellen im Blut depletiert. Nach 17 Tagen waren in der Milz noch 73,4% der CD8⁺-Zellen depletiert.

NK-Zellen wurden in Mäusen mit dem NK1.1-spezifischen Antikörper NK1.1 (Pharmingen) depletiert. Dazu wurde den Mäusen 2x im Abstand von vier Tagen, α NK1.1 Antikörper injiziert. Die erste Depletion wurde am Tag der FV-Infektion durchgeführt. Für die Depletion wurden pro Injektion 50 μ g NK1.1, welche auf 500 μ l mit sterilem PBS verdünnt wurden, i.p. inokuliert.

Neun Tage nach der ersten Depletion waren 93,7% der NK1.1⁺-Zellen in der Milz und 95,6% der NK1.1⁺-Zellen im Blut depletiert. Zum Zeitpunkt 16 Tage nach der ersten α NK1.1 Antikörpergabe waren noch >80% der NK1.1⁺-Zellen in der Milz depletiert.

Die Depletion von CD8⁺ und NK1.1⁺-Zellen wurde im Durchflußzytometer mit dem α CD8a monoklonalen Antikörper 5H19 (Caltag, Hamburg, Germany) und dem NK-Zellmarker α DX5 monoklonalen Antikörper überprüft.

3.1.3 Betäubung der Mäuse mit Ketamine/Xylasine

Um Mäuse über einen Zeitraum >2 Stunden zu narkotisieren, wurde das Narkosegemisch Ketamine/Xylasine eingesetzt. Das Ketamine und das Xylasine wurden in sterilem PBS gelöst. Das Mischungsverhältnis betrug 98% Ketamine (15%) und 2% Xylasine (9%). Für die Betäubung wurden pro Maus von dem Betäubungscocktail 25-50 μ l i.p. mit einer Insulinspritze injiziert.

3.1.4 Betäubung der Mäuse mit Ether

Für die Palpation der Milzen und der retroorbitalen Blutentnahme reichte es aus, die Mäuse für 5-10min zu betäuben. Daher wurde die Betäubung mit Ether durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in einen Glastopf gesetzt, in dem sich ein mit Ether getränk-

tes Tuch befand. Sobald die Tiere eine flache Atmung aufwiesen, wurden die Tiere aus dem Ethertopf genommen.

3.1.5 Transkutane Immunisierung von Mäusen

Die Tiere wurden für 2 Stunden mit 98% Ketamine (15%)/2% Xylasine (9%) narkotisiert. Der am Vortag rasierte Bereich am Abdomen wurde mit sterilem Wasser benetzt und das Vakzinegemisch mit einer Pipette aufgetropft. Das Volumen des Gemisches betrug 30 μ l. Nach 1 bis 1 1/2 Stunden wurden die Reste des Vakzinegemisches mit Wasser abgewaschen, um eine orale Aufnahme zu vermeiden.

Zusammensetzung des Vakzinegemisches:

Cholera Toxin	25 μ g
CpG-1826	100 μ g
CTL-Peptid	33 μ g
T-Helferzell-Peptid 1	33 μ g
T-Helferzell-Peptid 2	33 μ g
PBS	Σ 30 μ l

Bei der Kontrollgruppe wurden keine FV-spezifischen Peptide verwendet. Die fehlende Volumenmenge wurde mit PBS aufgefüllt.

Für die Immunisierung über die Haut wurden die Mäuse vor der FV-Belastungsinfektion zweimal im Abstand von mindestens 3 Wochen zwischen den Impfungen und der FV-Infektion immunisiert.

3.1.6 Palpieren von Milzgrößen

Mit Hilfe der Palpation der Milz wurde der FV-induzierte Krankheitsverlauf verfolgt. Für die Palpation wurden die Mäuse mit Ether betäubt und die Milzgrößen in einer Skala von 1-4 eingeteilt (Abbildung 4).

3.1.7 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte retroorbital mit einer 3mm Glaskapillare, welche mit Heparin beschichtet war. Das Blut wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß, in dem 2,5 Units Heparin vorgelegt waren, aufgefangen und auf Eis gestellt.

Zur Plasmagewinnung wurde das gewonnene Blut für 2min bei 8000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Das Plasma wurde bei -80°C gelagert.

3.1.8 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere entweder mit CO_2 getötet oder zuerst mit Ether betäubt und dann durch Genickbruch getötet. Die Milz wurde entnommen und in ein Gefäß mit 5ml PBBS auf Eis gelegt.

3.1.9 Adoptiver Transfer von Milzzellen

Für den Transfer von Milzzellen aus C57Bl/6-Mäusen mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül THY1.2 in C57Bl/6-Mäuse mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül THY1.1 wurde eine Einzelzellsuspension von Milzen aus C57Bl/6 THY1.2 Mäusen hergestellt (3.5). Die kernhaltigen Zellen wurden von den kernlosen Zellen über einen Percoll-Gradienten getrennt (3.12). Die kernhaltigen Milzzellen wurden in die C57Bl/6 THY1.1 Empfängermäuse transferiert. Pro Transfer wurden jeder Maus 5×10^7 Zellen übertragen.

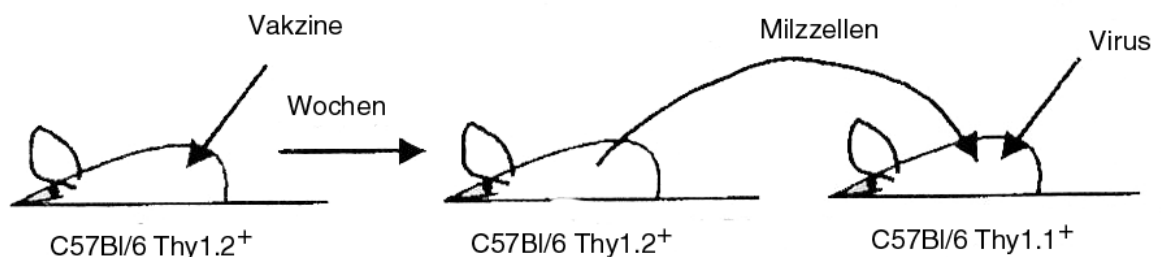


Abbildung 9: Schematische Darstellung des adoptiven Transfers von Milzzellen

3.2 Herstellung eines Friend Virus-Stocks

Das Friend Virus (FV) besteht aus zwei Viren, dem „Spleen Focus Forming Virus“ und dem „Friend Murine Leukemia Virus“. Der FV-Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit 1000-1500SFFU infiziert, nach 9 Tagen getötet und aus den Milzen ein Milzzell-Homogenat (10-20%) in PBBS mit 2mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde bei -80°C gelagert.

Zur Titration dieses Stocks wurden Y10.A-Mäuse infiziert und diesen nach 14 Tagen die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung (Sigma) lassen sich maligne Zellhaufen, die durch die FV Infektion entstehen, auf der Milz anfärben. Die Anzahl dieser Foci ergab die Viruskonzentration („Spleen Focus Forming Units", SFFU).

3.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung von Zellzahlen wurde die Einzelzellsuspension 1:2 oder 1:10 verdünnt und mit 0,4% Trypanblau (in PBS gelöst) versetzt. Diese mit Trypan versetzte Einzelzellsuspension wurde in einer Neubauerkammer gezählt.

Trypanblau färbt tote Zellen an. Für die Zellzahlbestimmung wurden nur lebende Zellen gezählt.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Je nach benötigter Anzahl der Zellen wurden diese in unterschiedlichen Zellkulturgefäßen (Greiner, Frickenhausen, Germany) in dem Zellkulturmedium RPMI mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) gehalten.

Die verwendeten Indikatorzellen (*Mus Dunningi*) sind adhärente Zellen und wurden in RPMI-Medium kultiviert. Zweimal die Woche wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit ATV von der Kulturflasche abgelöst und 1×10^5 Indikatorzellen mit 10ml neuem Medium in eine neue Kulturflasche ausgesät.

Die verwendeten Hybridomazellen 169.4 sind Suspensionszellen. Sie produzieren α CD8 monoklonale Antikörper. Zur Haltung der Zellen wurden diese 2x die Woche 1:2 gesplittet und mit neuem Medium versorgt.

3.4.2 Herstellung des monoklonalen α CD8 Antikörpers

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden die Hybridomazellen in 175cm² Zellkulturflaschen überführt und in 100ml RPMI-Medium kultiviert. Sobald

etwa 50% der Zellen tot waren, wurde der α CD8 Antikörper-haltige Überstand gepoolt und von den Zellen durch Zentrifugation getrennt. Der Hybridomaüberstand wurde aliquotiert und die Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Der Überstand wurde ohne weitere Aufreinigung oder Aufkonzentrierung der Antikörper verwendet.

3.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Lagerung von Zellkulturzellen wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. 1×10^6 Zellen/ml wurden dazu in Einfriermedium (40%FCS, 10%DMSO und 50% RPMI-Medium) resuspendiert. Aliquots von 2ml wurden in Einfrierröhrchen überführt und bei -20°C für 2-3 Stunden eingefroren. Vor der Überführung der Zellen in den flüssigen Stickstoff wurden die Zellen über Nacht bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen von Zellen wurden diese schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 10ml angewärmtes Mediums (37°C) überführt. Die Zellen wurden 10min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut mit Medium gewaschen, um das DMSO aus dem Medium gänzlich zu entfernen. Die Einzelzellsuspension wurde im Verhältnis 1/5 und 4/5 gesplittet, in kleine Zellkulturflaschen überführt und auf ein Endvolumen von 10ml mit RPMI-Medium aufgefüllt.

3.5 Herstellung einer Milzzellsuspension und Lyse von kernlosen Zellen

Zur Erstellung einer Milzzellsuspension wurde die entnommene Milz in 5ml PBBS liegend durch ein Sieb zerrieben, die groben Bestandteile entfernt und die Einzelzellsuspension in ein Röhrchen überführt. Die Suspension wurde auf 10ml mit PBBS aufgefüllt, eine Zählprobe entnommen und die Zellen mit 1200rpm bei 4°C 10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf die jeweilige gewünschte Zellzahl pro ml mit RPMI-Medium eingestellt.

Wurde die Milzzellsuspension für eine durchflußzytometrische Untersuchung der Zellpopulationen, eine *in vitro* Stimulation (z.B. "RNA Protection Assay") oder für den ELISPOT verwendet, so wurden die kernlosen Zellen mit Ammoniumchlorid lysiert. Dazu wurde die Milzzellsuspension mit 1200rpm 10min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 5ml 0,16M Ammoniumchlorid pH7,2 aufgenommen. Nach 5min wurde die Einzelzellsuspension auf 10ml mit PBS aufgefüllt und eine Zählprobe entnommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet auf die jeweilige Zellzahl pro ml mit RPMI-Medium eingestellt.

3.6 Nachweis von infektiösen Zellen in der Milz ("Infectious Center Assay")

Die Anzahl FV-infektiöser Zellen in der Milz wird mit diesem Test bestimmt. Dazu wird eine Milzzellsuspension von FV-infizierten Mäusen hergestellt (3.5). Von der Suspension wird eine Verdünnungsreihe mit Indikatorzellen (*Mus Dunni*) koinkubiert. Infektiöse Milzzellen infizieren durch Zell-Zellkontakt die *Mus Dunni*-Zellen. Diese teilen sich und geben das Friend Virus an ihre Tochterzellen weiter. Es entsteht ein Virus-Focus. Diese Foci können mittels Antikörperreaktion und Substratreaktion angefärbt werden. Als FV-spezifischer Antikörper wird AK720 verwendet, dieser bindet an das MuLV-*env*. Der zweite, „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelte Antikörper (Ziege Anti Maus IgG2b-HRP) bindet an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Das lösliche Substrat (3-Amino-9-Ethylcarbazole; AEC) wird von der HRP umgesetzt und in ein unlösliches rotes Produkt umgewandelt. Die entstandenen roten Punkte markieren auf dem Zellrasen die Virus-Foci. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtmilzzellzahl kann die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt werden.

Dazu wurde am ersten Tag in eine 6-Napf Gewebekulturschale eine definierte Anzahl Indikatorzellen ($6,6 \times 10^3$ Zellen/ml) ausgesät. Es wurden 3ml Indikatorzellsuspension pro Napf ausplattiert. Am zweiten Tag wurde die hergestellte Milzzellsuspension von FV-infizierten Mäusen auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt und eine Verdünnungsreihe von 10^7 bis 10^2 hergestellt. Jeweils 1×10^7 bis 1×10^2 Zellen wurden auf die Indikatorzellen gegeben und drei Tage koinkubiert. Die Inkubation fand bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ statt. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils 3 Näpfe mit F-MuLV und 3 Näpfe ohne Virus bzw. infektiöse Zellen mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus mußte Polybrene ($4 \mu\text{g/ml}$) hinzugegeben werden. Das Polybrene A diente dazu, dass das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden konnte (Toyoshima und Vogt, 1969).

Nach drei Tagen wurde der Test ausgewertet. Dazu wurde das Medium abgekippt und die Zellen mit 95% Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden 1x mit PBS und 1x mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der erste Antikörper (AK720) wurde 30min bei RT inkubiert. Dazu wurden pro Napf 600 μl Hybridomaüberstand (AK720) verwendet. Die Platten wurden 2x mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege anti Maus IgG2b-HRP; 0,05mol/L) wurde 1:500 in PBS/0,1% BSA verdünnt und jeweils 600 μl pro Napf gegeben. Die Inkubation betrug 20min bei RT. Nach dem Waschen mit PBS (2x) wurden 2ml frisch angesetzte Substratlösung (AEC) pro Napf zugege-

ben und 20min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abkippen, Waschen und Trocknen der Platten, wurden die Foci gezählt. Die Anzahl an infektiösen Milzzellen wurde wie folgt berechnet: Mittelwert der Anzahl an Foci pro Verdünnung und Napf x Anzahl der Milzzellen pro Maus = Anzahl infektiöser Milzzellen pro Maus

3.7 Bestimmung FV-neutralisierender Antikörper

Der Test zur Bestimmung des Titers von FV-neutralisierenden Antikörpern (Immunglobulinen; Ig) beruht auf dem Prinzip des IC-Tests (3.6).

Es wird eine Verdünnungsreihe der Plasmen hergestellt und diese mit einer definierten Menge an freien Viren und Meerschweinchenkomplement kokubiert. Das Kokubat wird dann auf die am Vortage ausgesäten *Mus Dunningi*-Zellen gegeben. Die freien Viren, welche nicht von den sich im Plasma befindenen Antikörpern gebunden werden, können nun mit Hilfe des Polybrenes die *Mus Dunningi*-Zelle infizieren und Virus-Foci ausbilden. Das Meerschweinchenkomplement dient zur Lyse von Antikörper gebundenen Viren.

Als Bezugspunkt für die Anzahl an neutralisierenden Antikörpern dient eine definierte Menge Viren, die ohne Antikörper auf die Indikatorzellen gegeben werden. Diese Anzahl an Virus-Foci wird als 100% gesetzt. Als neutralisierend gilt die Verdünnungsstufe des Plasmas, in dem 75% der zu induzierenden Virus-Foci verhindert werden.

Mit diesem Test kann sowohl Gesamt-Ig (IgM und IgG) als auch IgG nachgewiesen werden.

Am ersten Tag wurden 2ml *Mus Dunningi*-Einzelzellsuspension pro Napf ($3,75 \times 10^3$ /ml) in einer 24-Napf Zellkulturplatte ausgesät. Am zweiten Tag wurden auf die *Mus Dunningi*-Zellen 4µg/ml Polybrene A gegeben. Zuerst wurde das Plasma bei 56°C für 30min erhitzt, um vorhandenes Virus und Komplement zu inaktivieren. Es wurde eine Plasmatitration durchgeführt, um die Anzahl an Antikörpern zu verdünnen. Die Plasmaverdünnung von 1:10 bis 1:320 wurde für Gesamt-Ig mit PBS durchgeführt. Für den Nachweis von IgG-Antikörpern wurde das Plasma im Verhältnis 1+1 mit 0,2M β-Mercaptoethanol 30min bei 37°C vorinkubiert. Dann wurden die Plasmen von 1:10 bis 1:320 mit 0,01M β-Mercaptoethanol verdünnt. Der Nachweis von Gesamt-Ig und IgG wurde nun in gleicher Weise weitergeführt. Eine definierte Anzahl von freiem Virus (sollte ohne Antikörper 30 Virus-Foci pro Napf ergeben) wurde mit Meerschweinchenkomplement (1:6 verdünnt) und dem verdünnten Plasma 1 Stunde bei 37°C ko-

inkubiert (Gesamtmenge 40µl). In dieser Zeit konnten die neutralisierenden Antikörper aus dem Plasma das freie Virus binden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 120µl kaltem PBS unterbrochen. Zum Schluß wurden 50µl dieses Koinkubates auf die am Vortage ausgesäten *Mus Dumni*-Zellen gegeben und 3 Tage bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Der Test wurde wie unter 3.6 ausgewertet.

3.8 Bestimmung von FV-bindenden Antikörpern (ELISA)

Mit dem Test zur Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern wird nur ein Teil von F-MuLV spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Mit der Bestimmung von F-MuLV bindenden Antikörpern können alle gegen F-MuLV gebildeten Antikörper nachgewiesen werden.

An den Boden einer 96 Napf-Rundbodenplatte wurde über Nacht bei 4°C 100µl Virusantigen (0,5µg) in Coatingpuffer gecoatet. Die Platte wurde 5x mit PBS/0,5% Tween 20 gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen 30min bei Raumtemperatur (RT) mit 100µl/Napf PBS/10% FCS abgesättigt. Danach wurden die hergestellten Plasmaverdünnungen (1:10 bis 1:156250) in die Nöpfe gegeben (100µl) und bei 4°C 1 Stunde inkubiert. Es erfolgten erneute Waschungen (5x) der Platte mit PBS/0,5% Tween 20. Je nachdem welcher Antikörper-Subtyp nachgewiesen werden sollte, wurde als zweiter „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelter Antikörper entweder Esel anti Maus IgG (Nachweis Gesamt IgG; vorverdünnt 1:15000), Ratte anti Maus IgG1 (vorverdünnt 1:1000) oder Ziege anti Maus IgG2a (vorverdünnt 1:25000) verwendet. Es wurden von den vorverdünnten zweiten Antikörpern je 100µl/Napf 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach 5x Waschen mit PBS/0,5% Tween 20 wurde die Substratreaktion mit o-Phenylenediamine (OPD) durchgeführt. Eine OPD-Tablette wurde in 10ml Substratpuffer gelöst und die Reaktion mit 10µl 10%H₂O₂ gestartet. Von der H₂O₂ versetzten Substratlösung wurden 100µl/Napf ca. 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50µl konzentrierter Schwefelsäure abgestoppt. Der ELISA wurde bei einer OD von 490nm gemessen.

Für die Bestimmung des FV spezifischbindenden Antikörpertiters wurde der dreifache OD-Wert der Plasmen von uninfizierten Tieren als Grenze gesetzt.

3.9 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Eigen-

schaften der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurden spezifische fluorchrom-markierte Antikörper verwendet, die an Oberflächenproteine binden (Tabelle 4).

Es wurden 5×10^5 – 1×10^6 Zellen aus dem Blut oder der Milz mit PBS gewaschen, in 100 μ l PBS und 0,5-2 μ l konjugierten Antikörper aufgenommen und 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen im Durchflußzytometer (FACScan, BD, Heidelberg, Germany) analysiert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Antikörper von Pharmingen (Heidelberg, Germany) bezogen. Ausgenommen der in Tabelle 8 aufgeführten Antikörper (0,2mg/ml) wurden diese 1:100 für die durchflußzytometrische Färbung eingesetzt.

Tabelle 8: Verwendung von Antikörpern für die Durchflußzytometrie

Antikörper mit jeweiligem Konjugat	eingesetzte Verdünnung zur Färbung
CD19-FITC	1:50
CD4-PE	1:200
CD43-FITC	1:200
CD4-APC	1:200
CD8-CyChr	1:200
THY1.1-FITC	1:10000
THY1.1-PE	1:800
THY1.2-FITC	1:10000
AK34	150 μ l Hybridomaüberstand
CD16/CD32	1:200
AK34-Biotin	1:200
THY1.2-PE	1:800

3.9.1 Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Zellen im Blut

Für die Bestimmung der Anzahl an FV-infizierten Zellen im Blut, wurden 1×10^6 Zellen aus dem Blut mit dem Antikörper 34 (AK34) inkubiert. FV-infizierte Zellen exprimieren an der Oberfläche das glykolysierte FV Gag-Protein, an welches der AK34 bindet. Der AK34 ist nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, so dass für die durchflußzytometrische Analyse ein zweiter Antikörper eingesetzt werden mußte. Dieser 2te AK (IgG2b-PE; monoklonaler Ziege anti Maus AK) bindet an den AK34. Nach der

Inkubation der Zellen aus dem Blut mit AK34 wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit IgG2b-PE für 30min bei 4°C im Dunkeln. Nach erneuten Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert.

3.9.2 Bestimmung von FV-infizierten Zellpopulationen in der Milz

Mit dem Durchflußzytometer kann die Anzahl und Zellart der infizierten Zellen in der Milz bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen einer Doppelfärbung unterzogen. Mit dem AK34/Avidin-PE wurde das an der Oberfläche exprimierte glykolysierte FV Gag-Protein markiert. Mit den Antikörpern CD19, CD4, CD8, Mac1 und Ter119 wurden die jeweiligen Zellpopulationen gefärbt.

Dafür wurden die kernlosen Zellen mit einer Ammoniumchloridbehandlung aus der Milzzellsuspension entfernt (3.5). Für die durchflußzytometrische Färbung wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz verwendet. Nachdem die Zellen 30min bei 4°C mit AK34-Biotin inkubiert wurden, wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Um die Anzahl an FV-infizierten CD19⁺ und MAC1⁺-Zellen zu untersuchen, wurde eine Fc-Rezeptor-Absättigung durchgeführt. Dazu wurde der Ratte anti Maus CD16/CD32 AK 15min bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen. Eine Fc-Rezeptor-Absättigung mußte bei der CD4⁺, CD8⁺ und Ter119⁺-Zellanalyse nicht durchgeführt werden. Nun wurden die Zellen mit Avidin-PE und den Antikörpern CD4, CD8, CD19, Mac1 oder Ter119 für 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen wurden, wurde die Anzahl der FV-infizierten Zellen einzelner Zellpopulationen mittels Durchflußzytometer bestimmt.

3.10 Arbeiten mit RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Handschuhen ausgeführt. Es wurden spezielle RNase freie Lösungen und gestopfte Pipettenspitzen verwendet.

3.10.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus *in vitro* restimulierten Milzzellen (3.10.3) wurde mit TRIZOL nach dem Standardprotokoll der Firma AppliChem (Darmstadt, Germany) isoliert.

3.10.2 Elektrophorese von RNA im Agarosegel

Die aus Milzzellen isolierte Gesamt-RNA wurde zur Kontrolle über ein 1% (w/v) Agarosegel mit TAE als Laufpuffer in einer Horizontalelektrophoresekammer überprüft. Dazu wurde die Agarose in TAE suspendiert und aufgekocht. Die Lösung wurde auf 60°C abgekühlt und mit 1,4µl einer 10% Ethidiumbromidlösung pro 30ml Agaroselösung versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in RNA und macht diese durch Fluoreszenz unter UV-Belichtung sichtbar.

Von der isolierten tGesamt-RNA wurde 1/10 der Probe abgenommen, mit 1/6 Volumen des 6x Probenpuffers versetzt und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 100V für 30-90min durchgeführt.

3.10.3 "RNA-Protection-Assay"

Mit dem "RNA-Protection-Assay" konnte die Zytokinproduktion in Milzzellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen der zu untersuchenden Milzen hergestellt (3.5) und die Zellen *in vitro* für 5 Stunden mit 2ng Phorbol-12-Myristate 13-Acetate (PMA) und 500µg Ionomycin pro 10^7 Zellen bei 37°C/5%CO₂ stimuliert. Der "RiboQuant™ Ribonuclease Protection Assay" wurde mit dem kommerziell erhältlichen "cytokine template set mCK-1" (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany) nach Anleitung durchgeführt. Nach Isolation der Gesamt-RNA aus den mit PMA/Ionomycin *in vitro* stimulierten Milzzellen wurde diese mit den *in vitro* transkribierten radioaktiv-markierten Sonden hybridisiert. Mittels der *in vitro* Transkription wurden 11 verschiedene RNA-Sonden erzeugt. Dabei handelt es sich um 9 Zytokin-Sonden (IL-4, -5, -10, -13, -15, -9, -2, -6 und IFN γ) und um 2 "house keeping gene"-Sonden (L32 und GAPDH). Nach der Hybridisierung und der Aufarbeitung der Proben wurden diese auf einem 4%igem (w/v) Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt. Zur Quantifizierung wurde der Phosphorimager (Molecular Dynamics) und die Software ImageQuant verwendet. Die Bandenstärke der spezifischen Zytokine ist angegeben als Prozentzahl im Vergleich zu der Bandenstärke des internen "Housekeeping genes" GAPDH.

Folgende Änderungen im aufgeführten Ablauf des Experimentes wurden vorgenommen:

Zur Kontrolle der isolierten Gesamt-RNA wurde eine Aliquot auf ein 1%igem (w/v) Agarosegel aufgetragen. Die isolierte Gesamt-RNA wurde mittels einer SpeedVac getrocknet.

3.10.4 Auftrennung von RNA-RNA-Hybriden in Polyacrylamidgelen

Die größenmäßige Auftrennung der Hybride aus isolierter Gesamt-RNA und spezifischer RNA-Sonde beim "RNA Protection Assay" wurde über ein 4%iges (w/v) Polyacrylamidgel durchgeführt. An das polymerisierte Gel wurde in einer mit 1x TAE gefüllten Kammer eine Spannung (50-100 Volt) für ca. 3 Stunden angelegt. Nach der Auftrennung der RNA-RNA-Banden wurde das Gel in einem Vakuumtrockner getrocknet und die Quantifizierung der Zytokinbanden mit einem Phosphor-Imager durchgeführt.

3.11 IFN γ -ELISA

Zum Nachweis der IFN γ Zytokinproduktion auf Proteinebene bei FV-infizierten und ODN behandelten Mäusen wurden 1×10^7 primäre Milzzellen nach Lyse der kernlosen Zellen für 48 Stunden mit PMA (2ng/ml)/Ionomycin (500ng/ml) bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Die IFN γ Konzentration im Kulturüberstand wurde mit dem kommerziell erhältlichen ELISA (OPTEIA, Pharmingen, Heidelberg) bestimmt.

3.12 Percoll-Gradient zur Isolation von Lymphozyten

Für das Transferexperiment wurden die kernhaltigen Milzzellen von den kernlosen Milzzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten über ein Percollkissen voneinander getrennt. Dazu wurde das Percoll (Sigma) 10:1 mit 10xPBS verdünnt. Dieses verdünnte Percoll wurde gleich 100% Percoll-Lösung gesetzt. Für die Separation wurden 10ml einer 70%ige Percoll-Lösung in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben und die Milzzellsuspension aufgeschichtet. Die Zellseparation wurde bei 8°C für 30min bei 1200rpm in der Zentrifuge durchgeführt. Aufgrund der Dichte befanden sich die kernlosen Zellen nach der Zentrifugation unter dem Percoll. Die kernhaltigen Zellen lagen auf dem Percollkissen. Die kernhaltigen Zellen wurden, nach der Abnahme vom Percollkissen 2x mit 1x PBS gewaschen (8°C, 10min bei 1200rpm) und auf eine Zellzahl von 1×10^8 /ml eingestellt.

3.13 ELISPOT-Assay

Mit dem ELISPOT-Assay werden IFN γ -produzierende Zellen auf der Einzelzell-Ebene detektiert. Dadurch kann eine quantitative Aussage über IFN γ -produzierende Zellen gemacht werden. Der Test beruht auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs. Der Unterschied dabei ist, dass anstelle eines löslichen Substrats ein Substrat verwendet wird, welches nach der Umsetzung ausfällt.

Für die Bestimmung der Anzahl an IFN γ -produzierenden Zellen wurden nicht-separierte Milzzellen eingesetzt. Am ersten Tag wurde die ELISPOT-Platte (Millipore, MAHA-S45, Bedford, USA) mit dem anti-IFN γ R4-6A2 Antikörper beschichtet. Zum Beschichten wurde der Antikörper in sterilem PBS (ohne Mg $^{2+}$ und Ca $^{2+}$) vorverdünnt (Endkonzentration 5-10 μ g/ μ l) und in jeden Napf 100 μ l gegeben. Am zweiten Tag wurde die Platte 3x mit sterilem Waschpuffer gewaschen und anschließend die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation von 200 μ l PBS/10%FCS pro Napf 1 Stunde bei 37°C abgesättigt. Nach erneuten Waschen (3x) mit Waschpuffer wurde die Platte trocken geklopft. Jeweils 1x10 5 bis 3x10 5 kernhaltige Milzzellen wurden in jeden Napf gegeben. Zur Erhöhung der IFN γ -Produktion wurde IL-2 (50-100U/ml) verwendet. Als Kontrollen wurden naive Milzzellen eingesetzt sowie nicht PMA/Ionomycin stimulierte Zellen. Das Endvolumen betrug 200 μ l/Napf. Nach 24 Stunden im Inkubator wurde die ELISPOT-Platte 6x mit Wasch/Lysepuffer gewaschen. Zur Detektion wurde der biotinylierte anti-IFN γ XMG1.2 Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:500 in PBS/1% FCS/0,05% Tween 20 verdünnt (Endkonzentration 1 μ g/ml) und je 100 μ l pro Napf gegeben. Nach dem Waschen der Platte (6x) mit Waschpuffer wurde je 100 μ l/Napf Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Streptavidin-AP) hinzugegeben. Die Alkalische Phosphatase wurde 1:1000 in PBS/1%FCS/0,05% Tween 20 verdünnt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei RT, sowie erneutes 6maliges Waschen der Platte mit Waschpuffer. Am Schluß wurde pro Napf 100 μ l AP-Färbelösung hinzugegeben. Die AP-Färbelösung setzte sich aus 0,4ml Entwicklungspuffer, 9,6ml sterilem Wasser, sowie Reagenz A + B zusammen (Bio-RAD, München, Germany). Die Inkubation betrug bei RT im Dunkeln zwischen 15 und 30min. Der Überstand wurde abgekippt und die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen mit H $_2$ O abgestoppt. Die Platte wurde getrocknet und die Anzahl der Punkte gezählt. Jede IFN γ -produzierende Zelle erzeugte einen Punkt. Die Zählung der Punkte wurde mit dem Axioplan2 Mikroskop und der ES ELISPOT Software (Carl Zeiss, Jena) durchgeführt.

3.14 Tetramerfärbung

Virus-spezifische CD8⁺-Zellen wurden *ex vivo* mittels Tetramertechnik quantitativ bestimmt. Tetramere bestehen aus 4 MHC I-Moleküle, welche das Virus-spezifische Peptid tragen. Die MHC-Moleküle sind über Biotin miteinander verbunden und mit PE konjugiert.

Für die Tetramerfärbung wurde eine Milzzellsuspension hergestellt und die kernlosen Zellen mittels Ammoniumchlorid (3.5) lysiert. Die lysierten Milzzellen wurden mit 10ml PBS gewaschen und jeweils 5×10^5 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in einem Volumen von 25 μ l für 15min bei RT gefärbt. Für die Dreifach-Färbung wurden 2,5 μ l Tetramere mit den Antikörpern α -CD8⁺-CyChr und α -CD43-FITC eingesetzt. Nach 2maligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und innerhalb einer Stunde im Durchflußzytometer gemessen.

4. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Immuntherapie gegen Retroviren zu entwickeln. Für die Experimente wurde das Friend Virus Modell verwendet. Zur Therapie der FV-Infektion wurde immunstimulative DNA mit einem CpG-Motiv eingesetzt. Zunächst wurde der Effekt von CpG-ODN auf das Immunsystem von uninfizierten Mäusen untersucht.

4.1. Immunstimulativer Effekt von CpG-ODN auf das Immunsystem von uninfizierten Mäusen

Uninfizierten Mäusen wurden CpG-ODN intraperitoneal injiziert. Sechs Tage nach der ODN-Gabe wurde die immunstimulative Wirkung der ODN *in vivo* anhand des Milzgewichts, der Gesamtzellzahl einzelner Zellpopulationen der Milz und deren CpG-ODN induzierte Aktivierung bestimmt.

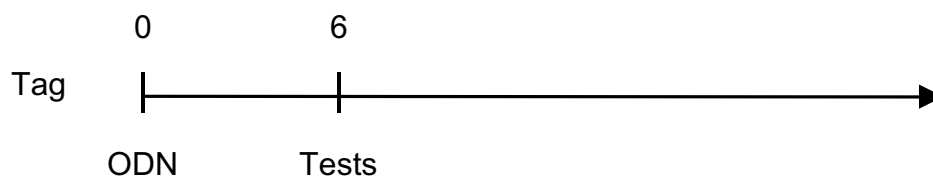


Abbildung 10: Versuchsablauf der ODN-Applikation in naiven Mäusen

Mäusen wurde 15nmol CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN i.p. injiziert. Bei der Kontroll-ODN handelte es sich um die CpG-1668-Sequenz ohne CpG-Motiv. Die Kontrollsequenz war dadurch nicht immunstimulativ. Sechs Tage später wurden die Tiere getötet und verschiedene immunologische Tests mit den Zellen der entnommenen Milz durchgeführt.

Wie schon in früheren Experimenten beobachtet (Sparwasser *et al.*, 1999) induziert die Gabe von immunstimulativer DNA (z.B. CpG-1668) eine vorübergehende Splenomegalie mit Peak an Tag 6. Diese Ergebnisse konnten auch für die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme (Y10.A, Y10 und C57Bl/6) bestätigt werden. So zeigten Y10.A-Mäuse 6 Tage nach CpG-1668 Injektion ein 2,4fach erhöhtes Milzgewicht im Vergleich zu den Kontroll-ODN behandelten bzw. unbehandelten Tieren (Tabelle 9). Kein Unterschied war zwischen den Kontroll-ODN behandelten und den unbehandelten Mäusen festzustellen.

Tabelle 9: Milzgewichte von Mäusen nach CpG-ODN Injektion

	CpG-1668	Kontroll-ODN	unbehandelt
	0,38g	0,13g	0,11g
	0,35g	0,16g	0,16g
	0,30g	0,12g	0,13g
	0,29g	0,16g	0,12g
	0,34g	0,14g	0,13g
	0,32g		0,12g
	0,41g		0,12g
	0,37g		
	0,38g		
	0,34g		
Mittelwerte	0,34g	0,142g	0,127g

Mäusen wurde i.p. 15nmol CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN injiziert. Sechs Tage nach Injektion wurden die ODN behandelten und unbehandelten Mäuse getötet und das Milzgewicht bestimmt (Abbildung 10). In normaler Schriftstärke sind Milzgewichte einzelner Tiere aufgelistet. In fettgedruckten Zahlen sind die jeweiligen Mittelwerte der Milzgewichte aufgeführt.

Es stellte sich daher die Frage, welche Zellpopulationen in der Milz für die CpG-ODN induzierte Splenomegalie verantwortlich waren. Die Untersuchungen zeigten, dass die Gesamtanzahl aller untersuchten Zellpopulationen in der Milz erhöht waren (Abbildung 11). Dabei wurde ein Anstieg an CD4⁺-Zellen in der Milz um das 1,7fache in den CpG-1668 behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. CD8⁺-Zellen von Mäusen mit CpG-1668 Injektion waren um das 2,2fache, B-Zellen um das 3,1fache und die Mac1⁺-Zellen um das 4,5fache im Bezug zu den Kontrollen erhöht. Ein besonders drastischer Anstieg der Zellzahlen war verglichen mit den Kontrollen in den CpG-1668 behandelten Mäusen für Erythrozytenvorläuferzellen (Ter119⁺-Zellen) um das 13fache und bei den NK-Zellen (NK1.1⁺) um das 8,5fache messbar.

Untersuchungen zum Zeitpunkt 6 Tage nach ODN-Gabe zeigten außerdem, dass die CD4⁺-, CD8⁺-, CD19⁺-, NK1.1⁺- und Mac1⁺-Zellen in der Milz von CpG-1668 behandelten Tieren verstärkt Aktivierungsmarker (CD69 und MHCII) auf der Zelloberfläche exprimierten (Abbildung 12).

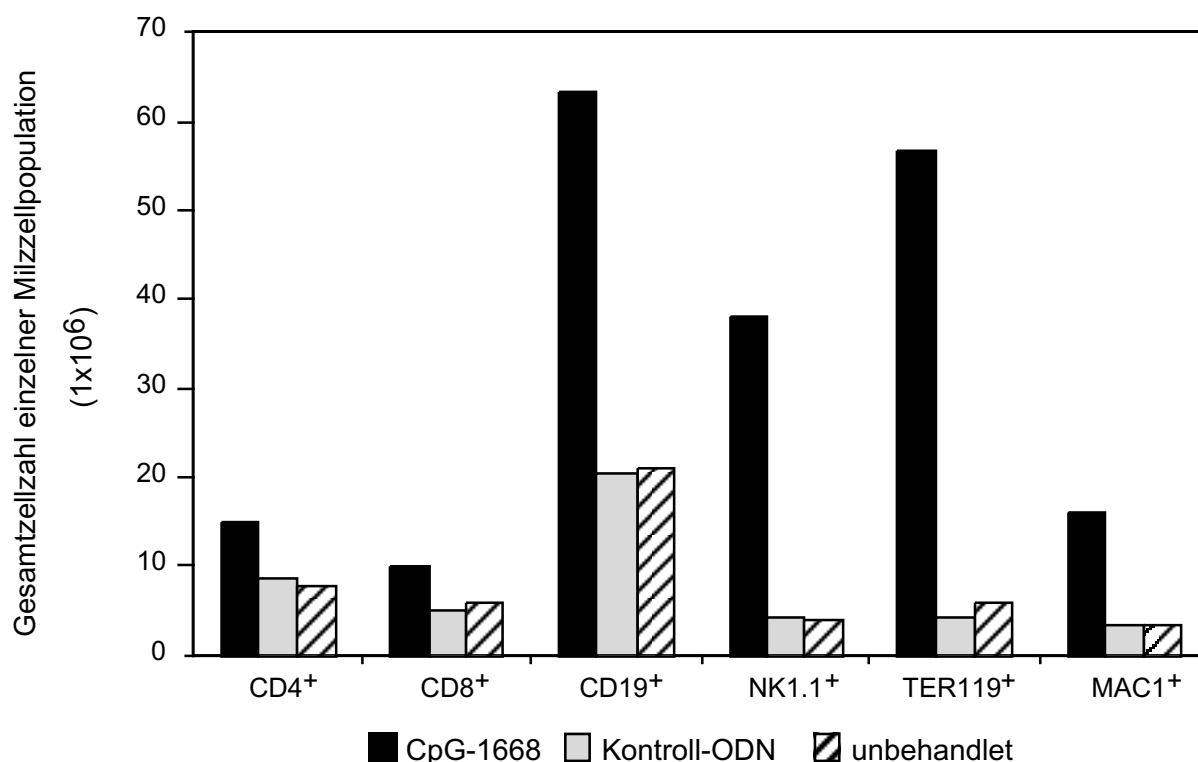


Abbildung 11: Gesamtzellzahl einzelner Zellpopulationen der Milz nach ODN-Injektion

Y10.A-Mäuse wurden 6 Tage nach der Injektion von CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN getötet und die Gesamtzellzahl der CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, NK1.1⁺, Ter119⁺ und Mac1⁺-Zellen in der Milz mittels Durchflußzytometer bestimmt (Abbildung 10). Dieselbe Messung wurde auch mit unbehandelten Tieren durchgeführt.

Als schwarze Balken dargestellt sind die CpG-1668 behandelten Tiere (n=9). In grauen Balken sind die Tiere gezeigt, die eine Kontroll-ODN Injektion erhalten haben (n=5). Als dritter Balken (Schragstreifen) sind unbehandelte Tiere gezeigt (n=6).

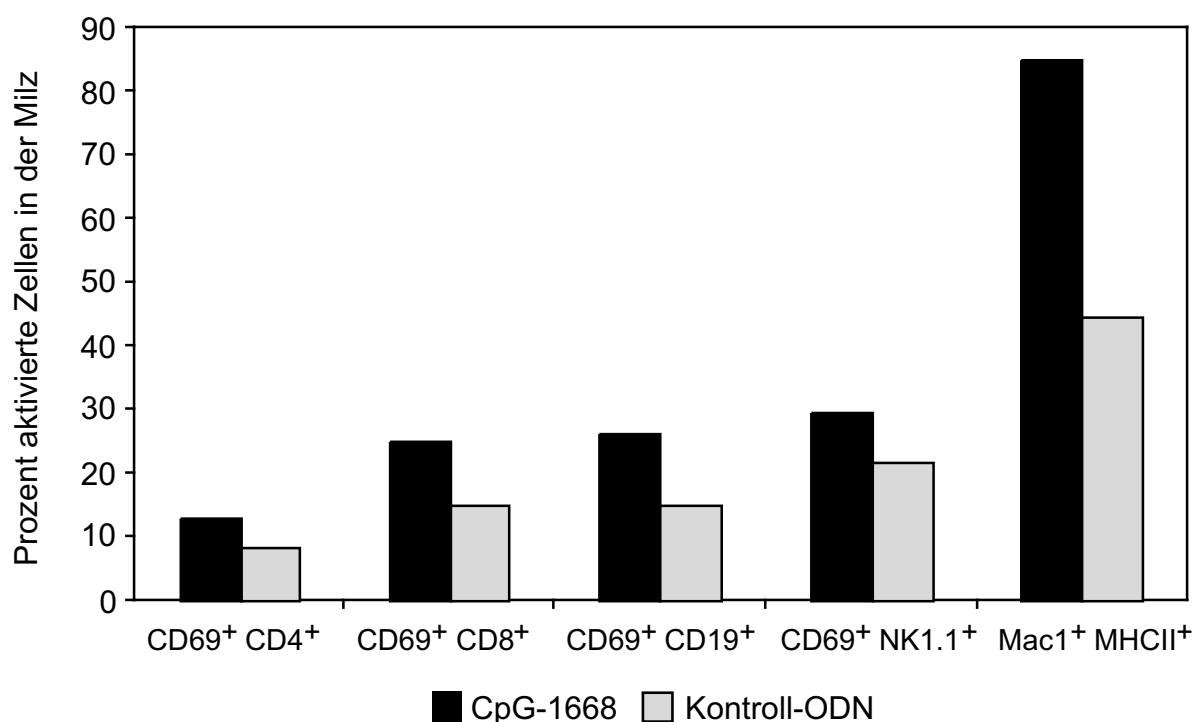


Abbildung 12: Prozentualer Anteil an aktivierten Milzzellen nach CpG-ODN Gabe

Y10.A-Mäuse wurden sechs Tage nach einmaliger ODN-Gabe getötet (Abbildung 10). Verschiedene Zellpopulationen der Milz (CD4⁺-, CD8⁺-, CD19⁺-, NK1.1⁺- und Mac1⁺-Zellen) wurden auf CpG-ODN induzierte Aktivierung mittels des Oberflächenmoleküls CD69 bzw. MHCII untersucht. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der ODN behandelten Gruppen; CpG-1668 n=9 und Kontroll-ODN n=5.

Lipford *et al.* (2000) zeigten, dass die Gabe von immunstimulatorischer DNA **vor** der Infektion mit *Leishmania major* eine Erkrankung der Mäuse verhindern kann. Dieser Schutz vor der *L. major* Erkrankung wurde durch das CpG-ODN induzierte Th1-dominierte Zytokinmuster vermittelt. Um zu überprüfen, ob die prophylaktische Gabe von CpG-ODN einen Effekt auf die FV-Infektion bzw. FV-induzierte Erythroleukämie hat, wurden FV-suszeptible Mäuse mit einer lethalen Dosis FV nach vorangegangener CpG-ODN Injektion infiziert.

4.2. Prophylaktische Gabe von CpG-ODN vor einer FV-Infektion

Um zu untersuchen, welchen Einfluß die prophylaktische CpG-ODN Gabe auf den FV-induzierten Infektionsverlauf hat, wurden FV-suszeptible Mäuse (Y10.A) an den Tagen -12, -5 und 0 vor der FV-Infektion mit CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN behandelt (Abbildung 13).

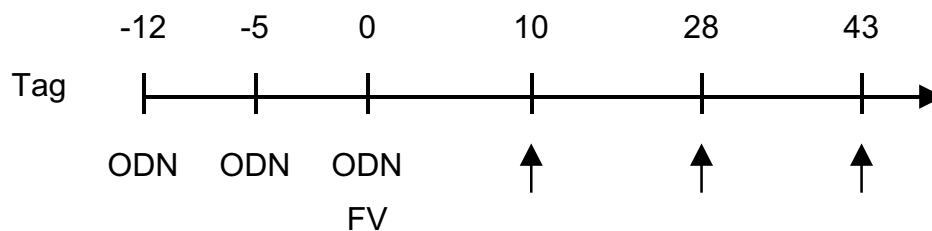


Abbildung 13: Versuchsablauf der prophylaktischen CpG-ODN Gabe vor FV-Infektion susceptibler Mäuse

Den FV-suszeptiblen Mäusen (Y10.A) wurde zu den Zeitpunkten -12, -5 und 0 vor Infektion mit FV CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN i.p. injiziert. Zum Zeitpunkt 43 Tage nach Infektion wurden die Mäuse getötet und das Milzgewicht sowie die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der virologischen und immunologischen Tests.

Der Versuch mußte vier Wochen nach FV-Infektion abgebrochen werden, da einige der CpG-1668 behandelten Mäuse eine extrem schwere Splenomegalie aufwiesen.

Dargestellt sind in Tabelle 10 die Milzgewichte der CpG-1668 behandelten Y.10A-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen. Die Milzen in den CpG-1668 behandelten Mäusen waren gegenüber den Milzen aus den Kontrolltieren signifikant vergrößert. Auch die Viruslast in der Milz war in den CpG-1668 behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erhöht (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tabelle 10: Milzgewichte von FV-suszeptiblen Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Gabe und anschließender FV-Infektion

	CpG-1668	Kontroll-ODN
	3,96g	2,15g
	2,44g	0,89g
	3,13g	3,28g
	2,53g	2,47g
	3,98g	0,41g
	2,68g	0,58g
	3,07g	1,07g
Mittelwerte	3,11g	1,55g

Y10.A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -12, -5 und 0 vor Infektion mit einer lethalen Dosis FV i.p. mit ODN behandelt (Abbildung 13). Das Milzgewicht wurde zum Zeitpunkt 43 Tage nach Infektion bestimmt. In normaler Schriftstärke sind Milzgewichte einzelner Tiere aufgelistet. In fettgedruckten Zahlen sind die jeweiligen Mittelwerte der Milzgewichte aufgeführt. Der Unterschied in den Milzgewichten war zwischen den Gruppen statistisch signifikant; Mann-Whitney-Test $p=0,007$.

Anders als bei einer *L. major* Infektion führte die prophylaktische CpG-ODN Gabe nicht zu einer Reduktion der FV-induzierten Splenomegalie (Sparwasser *et al.*, 2000). Die Daten zeigten stattdessen einen schwereren FV-induzierten Krankheitsverlauf in den CpG-1668 vorbehandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich aus diesen Ergebnissen daher die Frage, ob durch die prophylaktische CpG-ODN Gabe FV-resistente Mäuse (Y10) suszeptibel für eine FV-induzierte Leukämie werden würden.

Unbehandelte Y10-Mäuse kontrollieren nach einer kurzen Phase der FV-induzierten Splenomegalie die Virusvermehrung (Abbildung 3). Diese Mäuse erkrankten folglich nicht an einer Erythroleukämie und haben eine normale Lebenserwartung. Nach einer prophylaktischen CpG-1668 Behandlung wiesen jedoch noch 70% der FV-

resistenten Mäuse drei bis vier Wochen nach FV-Infektion eine extrem schwere Splenomegalie (Stufe 3-4) auf (Abbildung 14). Dagegen war in den Kontrolltieren zu diesem Zeitpunkt keine Splenomegalie mehr festzustellen.

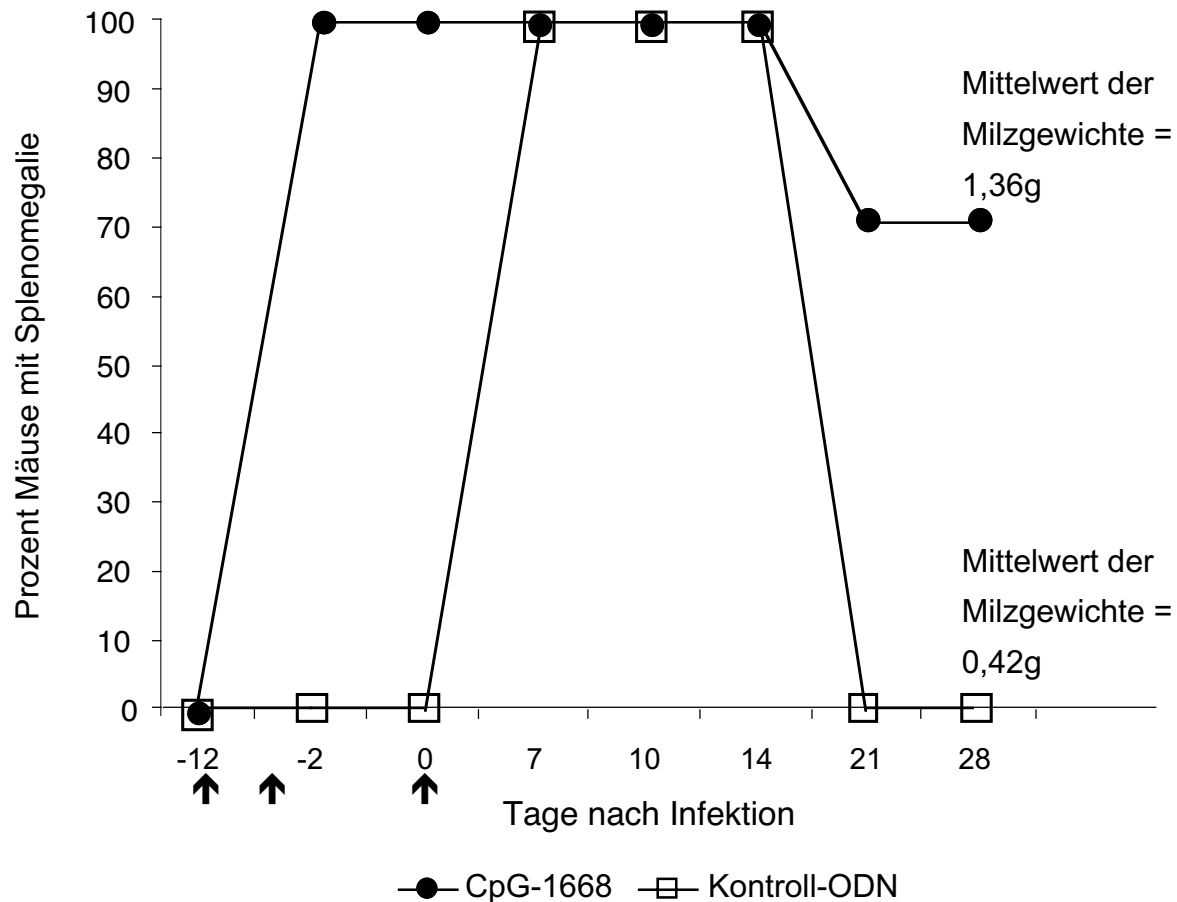


Abbildung 14: FV-induzierter Krankheitsverlauf in FV-resistenten Mäusen nach prophylaktischer ODN-Behandlung

Den Y10-Mäusen wurde zu den Zeitpunkten -12, -5 und 0 ODN i.p. injiziert. Zum Zeitpunkt 0 wurden die ODN behandelten Mäuse mit FV infiziert (Abbildung 4). Der FV-induzierte Krankheitsverlauf wurde durch Palpation verfolgt. Die Mittelwerte der Milzgewichte betragen 28 Tage nach Infektion für die CpG-1668 behandelten Mäuse (n=14) 1,36g und für die Kontrollgruppen (n= 9) 0,42g. Die Unterschiede in den beiden Gruppen waren statistisch signifikant; Milzgewichte (Mann-Whitney-Test) $p=0,0046$ und Splenomegalie (Fisher's Exakt Test) $p=0,0016$.

Inwieweit die Splenomegalie in den prophylaktisch CpG-ODN behandelten Y10-Mäusen aufgrund einer FV-induzierten Erythroleukämie verursacht wurde, wurde daraufhin untersucht. Dazu wurden die Milzzellen der prophylaktisch Kontroll-ODN bzw. CpG-ODN behandelten FV-infizierten Mäuse mit dem Antikörper Ter119 gefärbt. Die Anzahl der Ter119⁺-Zellen wurde durchflußzytometrisch gemessen. In Abbildung 15 ist ein repräsentatives Tier aus jeder ODN behandelten Mausgruppe dar-

gestellt. In der Kontrollmaus wurden nur 9,59% Erythrozytenvorläuferzellen (Ter119⁺-Zellen) nachgewiesen, während in der prophylaktisch mit CpG-ODN behandelten Maus 71,08% Ter119⁺-Zellen gefunden wurden. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Splenomegalie in den CpG-ODN behandelten Mäusen durch eine massive Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen verursacht wurde, was zum Zeitpunkt 4 Wochen nach FV-Infektion auf die Entstehung einer Erythroleukämie schließen lässt.

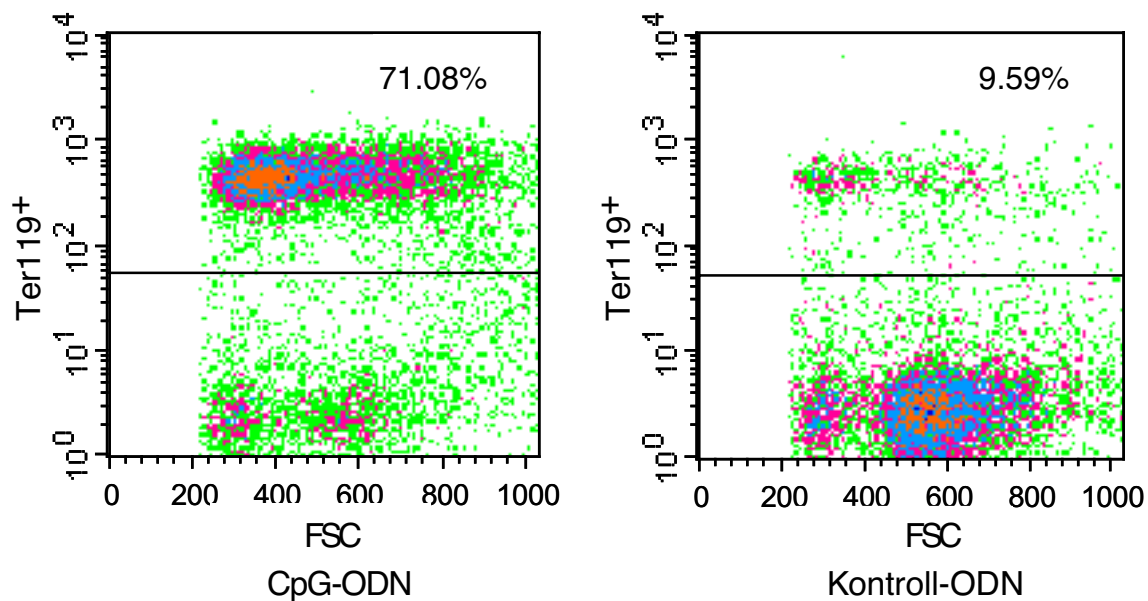


Abbildung 15: Durchflußzytometrische Analyse der Erythrozytenvorläuferzellen in FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung

Den FV-suszeptiblen Mäusen wurde zu den Zeitpunkten -12, -5 und 0 vor der FV-Infektion ODN i.p. injiziert (Abbildung 13). 28 Tage nach der FV-Infektion wurden die kernhaltigen Milzzellen der ODN behandelten Mäuse mit dem Erythrozytenmarker Ter119 gefärbt.

(Links) Dargestellt ist eine repräsentative FV-resistente Maus, welche CpG-ODN vor der FV-Infektion injiziert bekam. Diese Maus hatte eine extreme Splenomegalie (Milzgewicht 2g).

(Rechts) Dargestellt ist eine repräsentative FV-resistente Maus, welche Kontroll-ODN vor der FV-Infektion injiziert bekam. Diese Maus wies keine Splenomegalie auf (Milzgewicht 0,32g).

Welchen Einfluß die ODN-Gabe vor einer FV-Infektion auf die Viruslast in den Tieren hatte, wurde daraufhin untersucht. Dazu wurden die Mäuse zum Zeitpunkt 3 bis 4 Wochen nach Infektion getötet und die Viruslast in der Milz und im Blut bestimmt. Wie in Abbildung 16 dargestellt, war die Anzahl der infizierten Milzzellen in den CpG-1668 behandelten Mäusen im Bezug auf die Kontrollen signifikant erhöht. Derselbe signifikante Unterschied war in der Prozentzahl FV-infizierter Zellen im Blut zu finden (Abbildung 17).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die prophylaktische CpG-1668 Behandlung FV-resistente Mäuse suszeptibel für eine FV-induzierte Erythroleukämie machten.

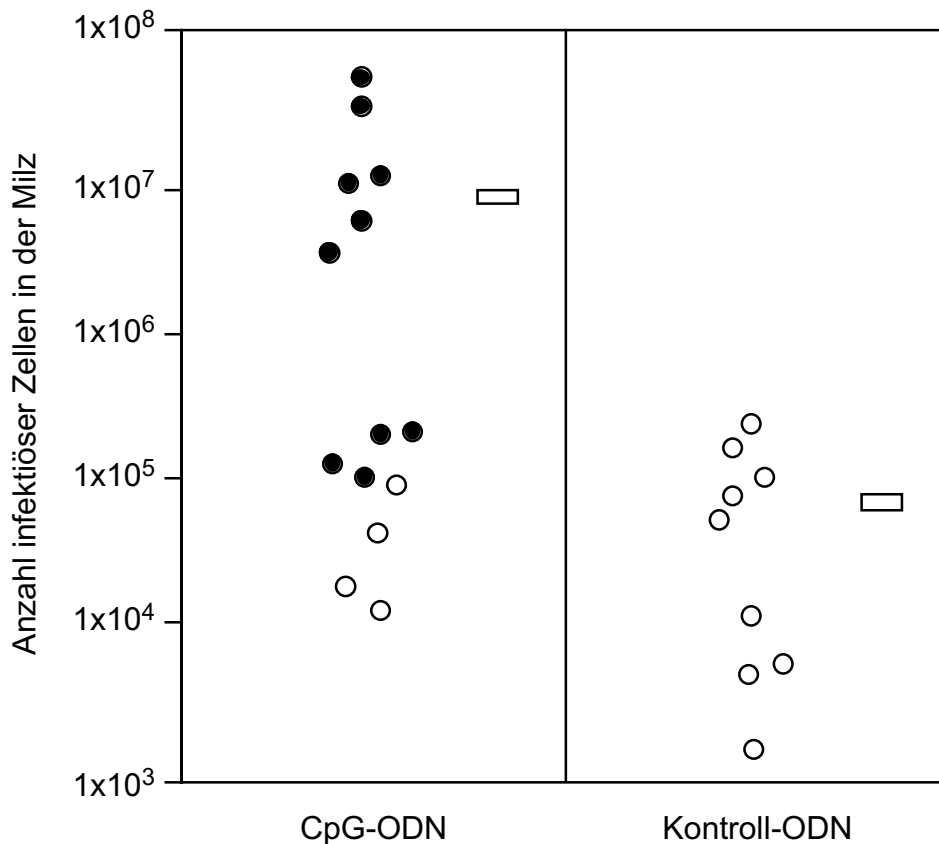


Abbildung 16: Anzahl FV-infektöser Zellen in der Milz von FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung

Y10-Mäuse wurden vor der FV-Infektion mit CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN behandelt (Abbildung 13). Zu den Zeitpunkten drei bis vier Wochen nach Infektion wurden diese Mäuse getötet und die Anzahl infektöser Zellen in der Milz bestimmt. In den CpG-1668 behandelten Mäusen (linke Spalte) stellt jeder ausgefüllte Punkt ein individuelles Tier mit Splenomegalie dar. Die offenen Punkte (linke und rechte Spalte) repräsentieren die Tiere, in welchen zum Untersuchungszeitpunkt keine Splenomegalie mehr nachweisbar war. Als Rechtecke sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (aller Tiere) dargestellt. Der Mittelwert der Anzahl an infektösen Zellen in der Milz lag bei den CpG-1668 behandelten Mäusen bei $7,8 \times 10^6$ und bei den Kontrolltieren bei $7,5 \times 10^4$. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ($p=0,015$).

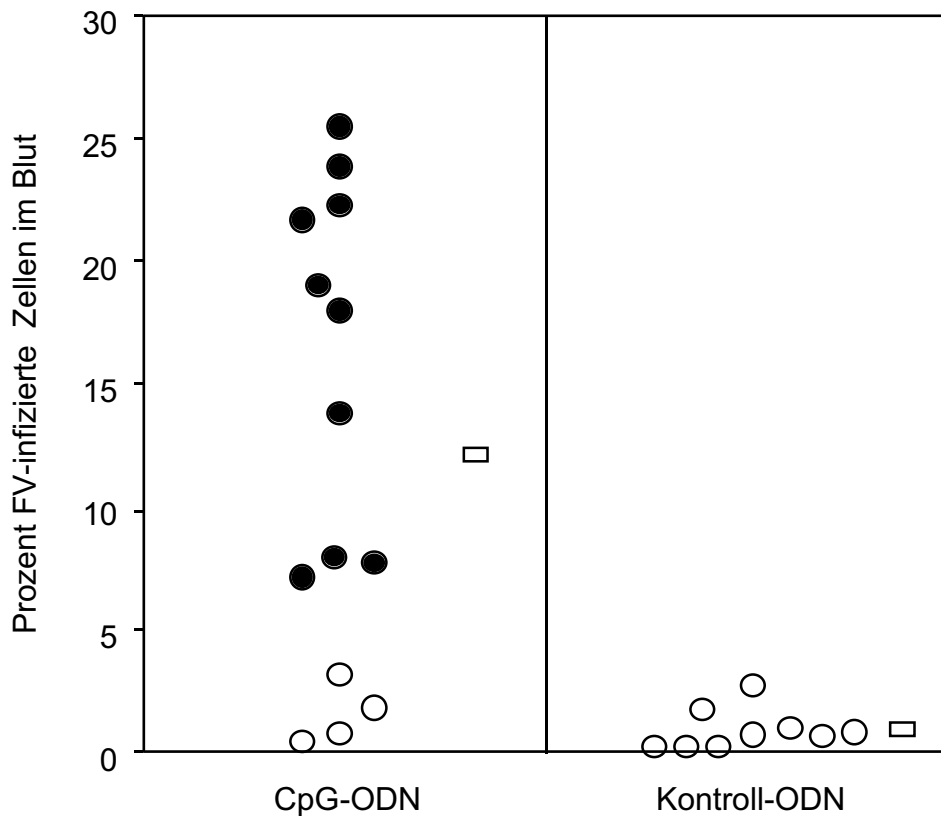


Abbildung 17: Prozentzahl FV-infizierter Zellen im Blut von FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung

Den Y10-Mäusen wurde zu den Zeitpunkten -12, -5 und 0 vor der FV-Infektion ODN i.p. injiziert (Abbildung 13). Zum Zeitpunkt 3 bis 4 Wochen nach Infektion wurde die Prozentzahl infizierter Zellen im Blut mittels Durchflußzytometer bestimmt.

In den CpG-1668 behandelten Mäusen (linke Spalte) stellt jeder ausgefüllte Punkt ein individuelles Tier mit Splenomegalie dar. Die offenen Punkte (linke und rechte Spalte) repräsentieren die Tiere, in welchen zum Untersuchungszeitpunkt keine Splenomegalie mehr nachweisbar war. Als Rechtecke sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen (aller Tiere) dargestellt. Der Mittelwert der Prozentzahl FV-infizierter Zellen im Blut lag bei den CpG-1668 behandelten Tieren bei 12,30% und bei den Kontrollen bei 0,75%. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ($p=0,015$).

Aus der Erkenntnis, dass die CpG-Gabe vor der FV-Infektion zu einer höheren Viruslast in den CpG-1668 behandelten Mäusen führte, stellte sich die Frage, welche Zellpopulationen in der Milz zu der erhöhten Viruslast beitrugen. Dazu wurden Mäuse, wie in Abbildung 13 dargestellt, mit CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN behandelt und dann mit FV infiziert. Zum Zeitpunkt 10 Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet. Mittels Durchflußzytometrie wurden die Anzahl FV-infizierter $CD8^+$ -, $CD4^+$ -, $CD19^+$ -, $Mac1^+$ - und $Ter119^+$ -Zellen in der Milz untersucht (Abbildung 18).

Es zeigte sich, dass im Mittel die Gesamtzahl an FV-infizierten Milzzellen in den CpG-1668 behandelten Mäusen $2,43 \times 10^8$ betrug, während in den Kontroll-ODN behandelten Tieren im Mittel nur $1,43 \times 10^8$ FV-infizierte Zellen in den Milzen nachweis-

bar waren. Für alle untersuchten Zellpopulationen (CD8⁺-, CD4⁺-, CD19⁺-, Mac1⁺- und Ter119⁺-Zellen) war die Anzahl an infizierten Milzzellen in den CpG-1668 behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Ein signifikanter Anstieg an FV-infizierten Zellen war nach CpG-ODN Behandlung allerdings nur für CD19⁺-, Ter119⁺- und CD4⁺-Zellen nachweisbar.

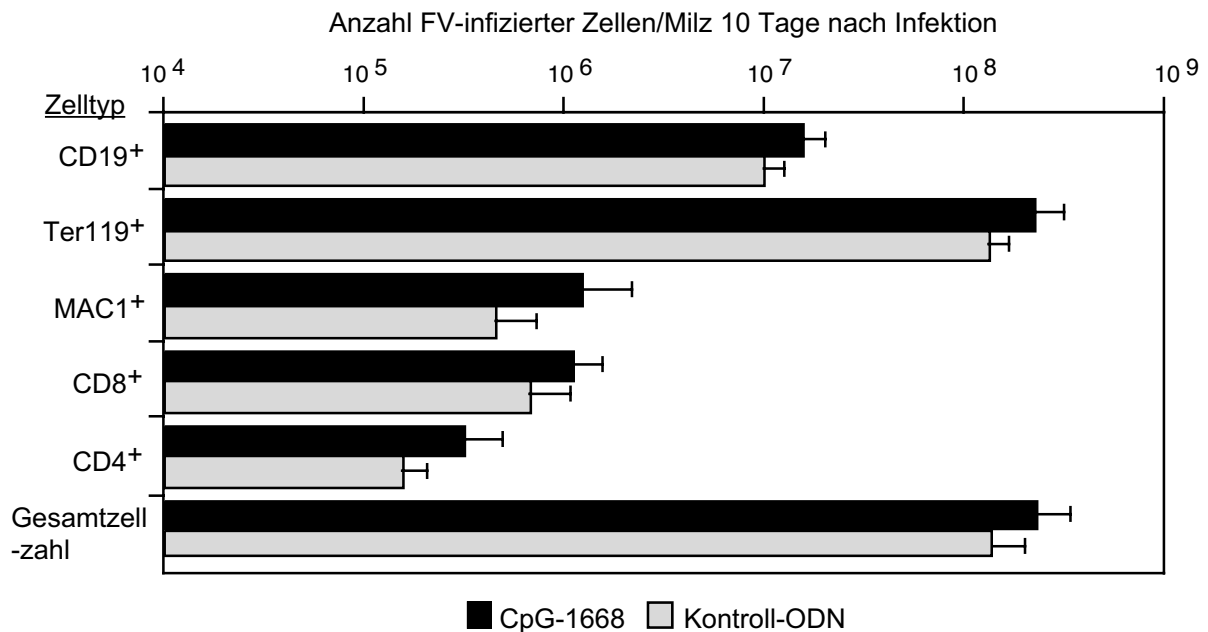


Abbildung 18: Anzahl infizierter Zellen einzelner Zellpopulationen der Milz von FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung

Der Versuchsablauf wurde in Abbildung 13 dargestellt. Zum Zeitpunkt 10 Tage nach FV-Infektion wurden die Mäuse getötet und die Gesamtanzahl an FV-infizierten CD8⁺-, CD4⁺-, CD19⁺-, Mac1⁺- und Ter119⁺-Zellen bestimmt. Der Unterschied zwischen den CpG-1668 und Kontroll-ODN behandelten Mäusen war für CD8⁺-Zellen ($p=0,10$) und für Mac1⁺-Zellen ($p=0,06$) statistisch nicht signifikant, während ein statistisch signifikanter Unterschied für CD19⁺- ($p=0,01$), Ter119⁺- ($p=0,05$) und CD4⁺-Zellen ($p=0,03$) nachgewiesen werden konnte (Mann-Whitney-Test).

Da Erythrozytenvorläuferzellen und B-Zellen die Hauptzielzellen von FV sind (Hasenkrug *et al.*, 1998), ist die signifikante Erhöhung der Viruslast in diesen Zellpopulationen vermutlich ausschlaggebend für die Entstehung einer Erythroleukämie in Y10 Mäusen, die vor der FV Infektion mit CpG-ODN behandelt wurden.

4.3. Therapie der akuten FV-Infektion mit immunstimulativen CpG-ODN

Die Ergebnisse der prophylaktischen CpG-ODN Behandlung vor einer FV-Infektion (Abschnitt 4.2) zeigten, dass diese Behandlung FV-resistente Mäuse suszeptibel gegenüber einer FV-induzierten Erythroleukämie machten. Deswegen sollte untersucht werden, ob sich CpG-ODN eher als Therapeutikum in der akuten Phase einer Virusinfektion einsetzen lässt. Neben der Impfung gegen eine Virusinfektion ist in der Klinik die Therapie eines Virusinfekts von großer Bedeutung.

Um zu testen, ob sich immunstimulative DNA als Therapeutikum in der akuten Phase einer Retrovirusinfektion einsetzen lässt, wurde das Friend Virus Modell verwendet. Suszeptible Mäuse (Y10.A) wurden mit einer lethalen Dosis (>3000 SFFV) FV infiziert und in der akuten Phase der Infektion mit immunstimulativer DNA (CpG-1668) therapiert. Als Kontrolle der Therapie wurden Tiere mit nicht-immunstimulativer DNA (Kontroll-ODN) behandelt. Die Behandlung erfolgte durch 3 intraperitoneale Injektionen zu den Zeitpunkten 4, 9 und 14 Tage nach Infektion.

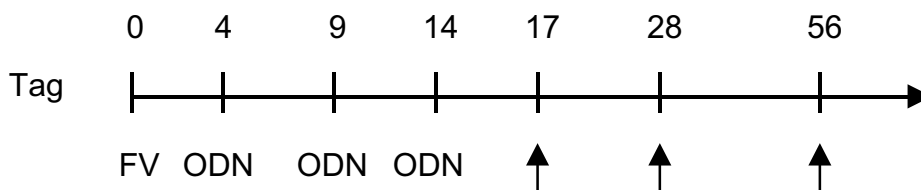


Abbildung 19: Versuchsaufbau der CpG-ODN Therapie in akut FV-infizierten suszeptiblen Mäusen

Suszeptible Mäuse (Y10.A) wurden mit einer lethalen Dosis FV i.v. infiziert. An den Tagen 4, 9 und 14 nach Infektion wurde den Mäusen i.p. 15nmol CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN injiziert. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte nach Infektion an denen immunologische und virologische Tests durchgeführt wurden.

Um zu testen, ob sich CpG-ODN als Therapeutikum gegen eine FV-induzierte Erkrankung verwenden lassen, wurde der FV-induzierte Krankheitsverlauf durch Palpation verfolgt.

Die Palpationsdaten nach der Therapie zeigten, dass 94% der mit Kontroll-ODN behandelten Mäuse 8 Wochen nach Infektion eine Splenomegalie und somit eine Erythroleukämie aufwiesen. Dieses entspricht der Erkrankungsrate von unbehandelten, nur FV-infizierten Mäusen (Chesebro *et al.*, 1990). Diese Tiere sterben an den Folgen der Erythroleukämie etwa 10-12 Wochen nach Infektion (Abbildung 3 +

5). Im Gegensatz dazu wurde ein Rückgang der Splenomegalie bei 74% der CpG-1668 behandelten Mäuse diagnostiziert. Diese Tiere entwickelten keine Leukämie.

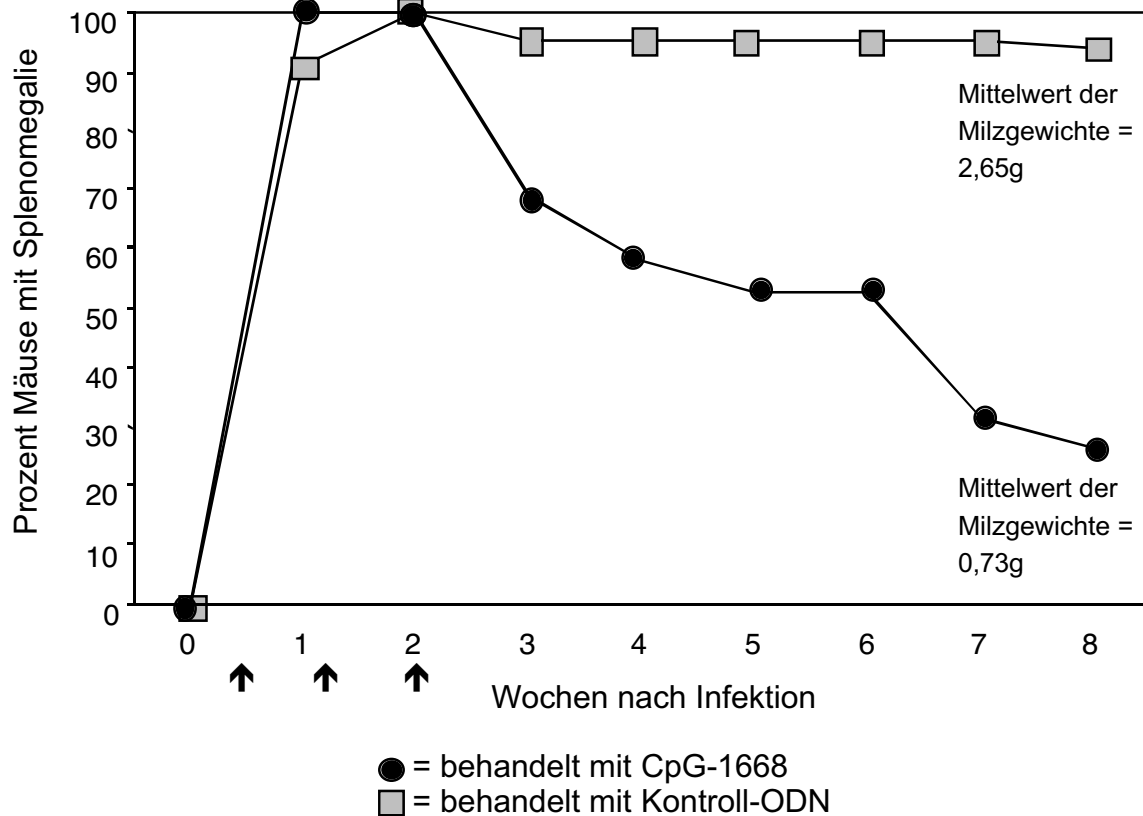


Abbildung 20: Krankheitsverlauf von FV-infizierten, CpG-ODN therapierten Mäusen

Y10.A-Mäuse wurden mit einer lethalen Dosis FV infiziert (Abbildung 19). Zu den Zeitpunkten 4, 9 und 14 Tage nach Infektion wurde den Mäusen CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN i.p. (Pfeile) injiziert. Der FV-induzierte Krankheitsverlauf wurde über 8 Wochen mittels Palpation verfolgt. Die Größe der Gruppe an CpG-1668 behandelten Mäusen betrug n=19 und der Kontroll-ODN behandelten Mäusen n=17 Tiere. Die Mittelwerte der Milzgewichte wurden zum Zeitpunkt acht Wochen nach Infektion erhoben. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, welche vergleichbare Ergebnisse ergaben. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nach dem Fischer's Exakt Test statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

In den ersten zwei Wochen nach Infektion wurde in allen Mäusen der beiden Behandlungsgruppen (CpG-1668 und Kontroll-ODN) eine Splenomegalie festgestellt. Jedoch zeigte sich in den meisten CpG-1668 behandelten Mäusen etwa drei bis vier Wochen nach FV-Infektion ein Rückgang der Splenomegalie. Zum Zeitpunkt 4 Wochen nach Infektion hatten 21 von 30 Tieren in der CpG-1668 behandelten Gruppe eine normale bis leicht vergrößerte Milz (Grad 1 bis 2). Hingegen wiesen zu diesem Zeitpunkt bei den Kontroll-ODN behandelten Mäusen 25 von 27 eine Splenomegalie auf (Grad 3 bis 4).

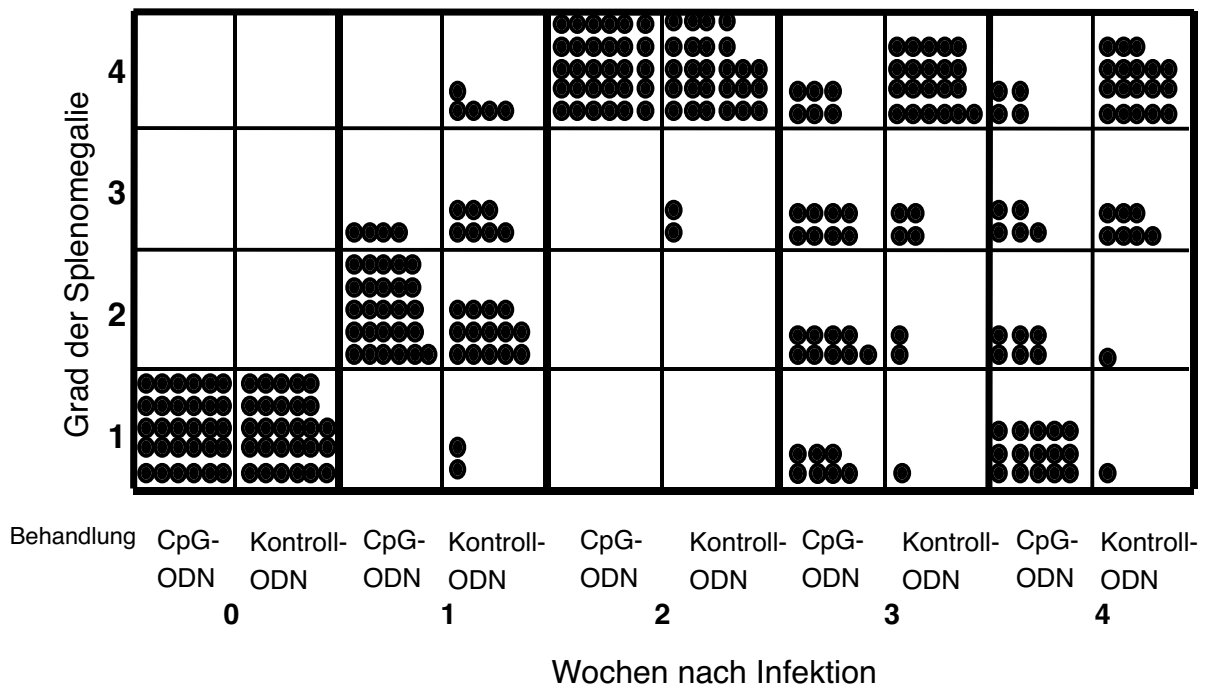


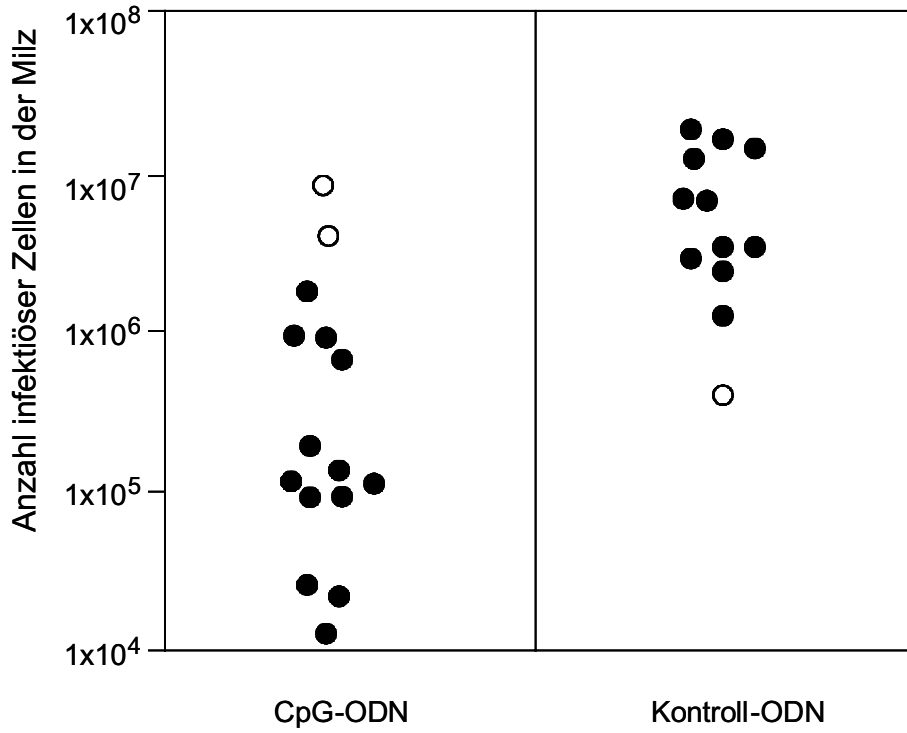
Abbildung 21: Schwere der Splenomegalie von individuellen FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen

Y10.A-Mäuse wurden mit einer lethalen Dosis FV infiziert. Zu den Zeitpunkten 4, 9 und 14 Tage nach Infektion wurde den Mäusen CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN i.p. injiziert (Abbildung 19). Dargestellt ist der Grad der Splenomegalie der einzelnen Tiere bis zu vier Wochen nach Infektion. Die Schwere der Splenomegalie wurde in 4 Stufen von normaler (1) bis extrem vergrößerter Milz (4) eingeteilt (Abbildung 4). Die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Die nachfolgenden virologischen und immunologischen Untersuchungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, zum Zeitpunkt vier Wochen nach Infektion durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da zu dieser Zeit ein deutlicher Unterschied im FV-induzierten Krankheitsverlauf zwischen den CpG-1668 und den Kontroll-ODN behandelten Mäusen zu beobachten war.

Um festzustellen, ob der Rückgang der Splenomegalie in den CpG-ODN behandelten Mäusen mit der Reduzierung der Viruslast korrelierte, wurde die FV-Last im Blut und in der Milz bestimmt. Der Rückgang der Splenomegalie in den CpG-1668 therapierten Mäusen korrelierte mit der Reduktion der Viruslast in der Milz und im Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 22). Vier Wochen nach Infektion wurden in den Kontroll-ODN behandelten Tieren signifikant mehr infektiöse Zellen in der Milz nachgewiesen als in den CpG-1668 behandelten Mäusen. Derselbe signifikante Unterschied wurde auch bei der Anzahl an infizierten Zellen im Blut gemessen.

a)



b)

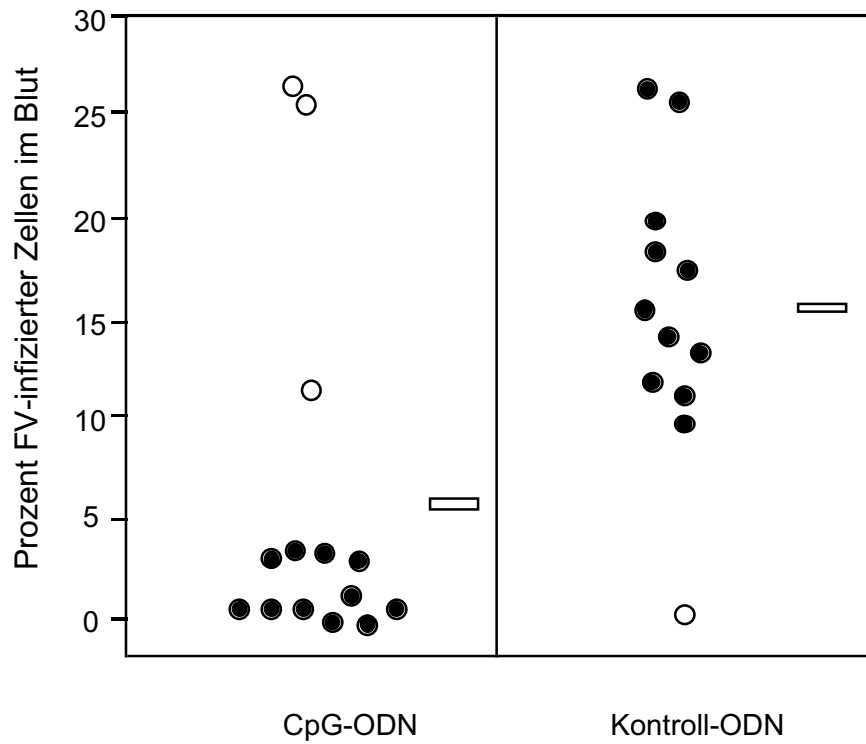


Abbildung 22: Viruslast in der Milz und im Blut von FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen

FV-susceptible Mäuse wurden wie in Abbildung 19 dargestellt mit FV infiziert und mit ODN behandelt. Vier Wochen nach Infektion wurde die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz und die Prozentzahl infizierter Zellen im Blut bestimmt. Jeder Kreis repräsentiert ein individuelles Tier. Die geschlossenen Kreise in der CpG-1668 behandelten Gruppe (links) entsprechen Tieren, in denen der Rückgang der Splenomegalie diagnostiziert wurde. Die offenen Kreise stellen die Tiere mit Splenomegalie dar (Therapieversager). In der Kontrollgruppe (rechts) spiegeln die geschlossenen Kreise Tiere mit Splenomegalie wieder, während offene Kreise Mäuse mit spontanem Rückgang der Splenomegalie darstellen. Die Mittelwerte sind als Rechtecke aufgeführt. Für die Berechnung des Mittelwertes wurden alle Tiere berücksichtigt. a) Der Mittelwert der Anzahl an infektiösen Zellen pro Milz lag bei den CpG-1668 behandelten Mäusen bei $12,2 \times 10^5$ und für die Kontroll-ODN behandelten Tiere bei $77,1 \times 10^5$. Der Unterschied war nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ($p < 0,001$). b) Die Prozentzahl lebender kernhaltiger Zellen im Blut, die das glykolysierte FV Gag-Protein an der Oberfläche exprimierten, wurde mittels Durchflußzytometer bestimmt. Der Mittelwert an infizierten Zellen im Blut lag bei der CpG-1668 Gruppe bei 5,9% und bei der Kontrollgruppe bei 15,5%. Der Unterschied war nach dem Mann-Whitney Test statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Diese CpG-vermittelte Reduktion an infizierten Zellen in den CpG-1668 behandelten Mäusen legte die Vermutung nahe, dass FV-neutralisierende Antikörper beteiligt sein könnten. Denn Davis *et al.* (1998) zeigten, dass durch die CpG-Gabe die Antigen-spezifische Antikörperantwort gegen Hepatitis B Virus erhöht werden kann. Der FV-spezifische neutralisierende Antikörpertiter (Abbildung 23) und der Titer an F-MuLV bindenden Antikörpern (Abbildung 24) in den CpG-1668 und Kontroll-ODN behandelten Mäusen wurden untersucht.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden nur Tiere aus der CpG-1668 behandelten Gruppe mit Therapieerfolg, d.h. Rückgang der Splenomegalie, verwendet. In der Kontrollgruppe wurden die Tiere mit spontaner Milzverkleinerung von den Untersuchungen ausgeschlossen. Die Ergebnisse zeigten keinen Unterschied im Titer von FV-neutralisierenden Antikörpern zwischen CpG-1668 und Kontroll-ODN behandelten Tieren. Die Titerbestimmung wurde für neutralisierenden Gesamtantikörper und IgG durchgeführt. Beim IgG-Titer handelt es sich um die Bestimmung von IgM depletierten (β -Mercaptoethanol) neutralisierenden FV-Antikörpern im Plasma.

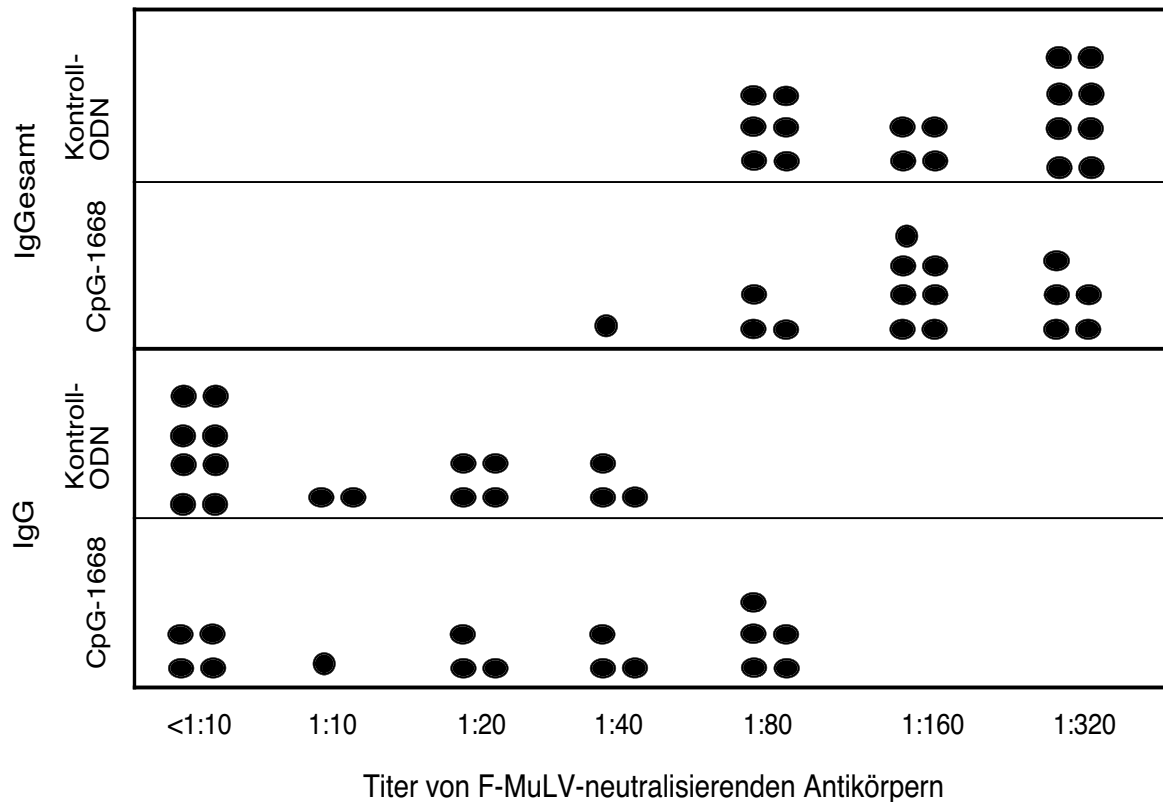


Abbildung 23: FV-neutralisierender Antikörpertiter von FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen

Vier Wochen nach der FV-Infektion wurden Plasmaproben von FV-infizierten und ODN behandelten Tieren gewonnen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 19 dargestellt. Mit den Plasmen wurde ein neutralisierender Antikörpertest durchgeführt. Der neutralisierende Antikörpertiter wird als höchste Verdünnungsstufe, bei der noch 75% des zugefügten Virus neutralisiert wurde, angegeben. Der Titer von Gesamt-FV-neutralisierenden Antikörper und von FV-neutralisierenden IgG ist gezeigt. Der IgG-Titer gibt den Titer an F-MuLV neutralisierenden Antikörpern in IgM depletiertem Plasma wieder. Jeder Punkt zeigt ein individuelles Tier. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den ODN-behandelten Gruppen nachgewiesen werden (Student T-Test $p > 0,05$ für IgGesamt und $p = 0,05$ für IgG).

Davis *et al.* (1998) zeigten, dass die Immunisierung von Mäusen mit HBsAg sowohl zur Bildung von Hepatitis B Virus (HBV) spezifischen IgG1 (Th2-Immunantwort) als auch IgG2a (Th1-Antwort) Antikörpern führte. Wurden jedoch CpG-ODN als Adjuvants für die HBV Immunisierung eingesetzt, wurden hauptsächlich HBV-spezifische IgG2a Antikörper nachgewiesen. Um nun zu untersuchen, ob die CpG-1668 Therapie in der akuten Phase der FV-Infektion zu einer Verschiebung der IgG-Antikörpersubklassen in Richtung IgG2a führte, wurde ein Test auf F-MuLV-bindende Antikörper durchgeführt (Abbildung 24). Mit dem F-MuLV-bindenden Antikörpertest wurden FV-spezifische IgGesamt, IgG1 und IgG2a Antikörper im ELISA bestimmt. Zwischen den CpG-1668 und den Kontroll-ODN behandelten Mäusen wurde kein Unterschied im Titer der FV-spezifischen Antikörper für die drei Immunglobulinklassen festgestellt.

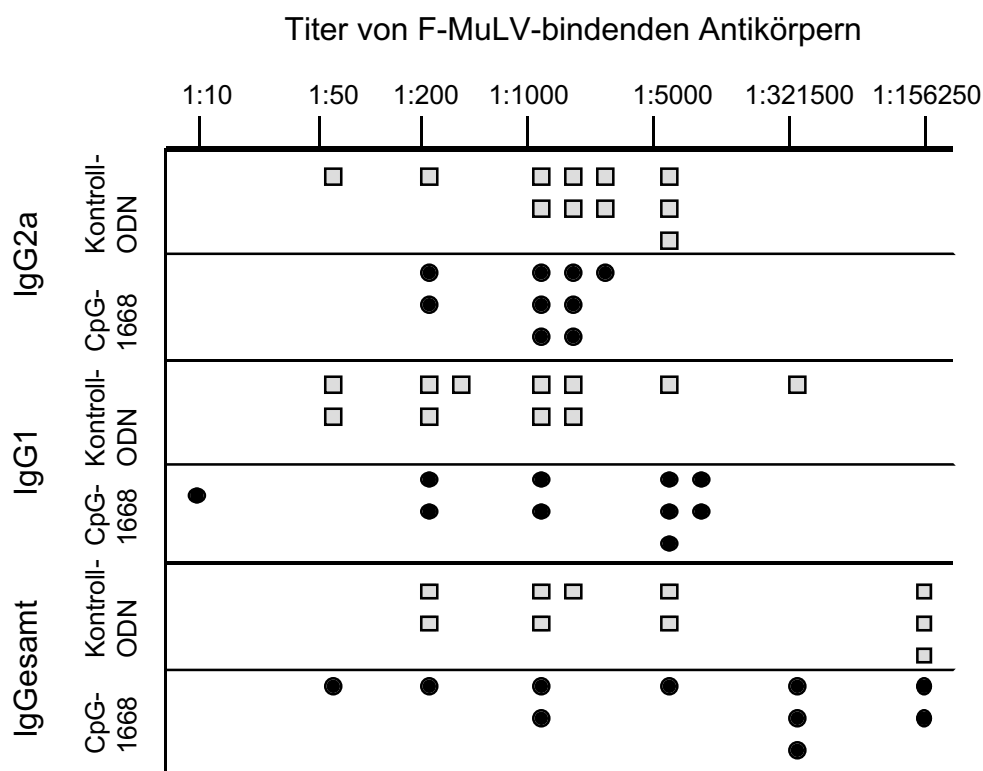


Abbildung 24: FV-bindende Antikörpertiter von FV-infizierten, CpG-ODN therapierten Mäusen

Vier Wochen nach FV-Infektion wurden Plasmaproben von FV-infizierten und ODN behandelten Tieren gewonnen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Plasmen wurden zur Bestimmung der Titer von bindenden F-MuLV-spezifischen Antikörpern verwendet. Zur Bestimmung der Antikörpertiter wurde als Bezugswert der 3fache OD_{490nm} - Absorptionswert von unbehandelten, uninfizierten Tieren verwendet. Jeder Punkt stellt ein individuelles Tier dar. Kein Unterschied zwischen den ODN-behandelten Gruppen wurde im Titer von FV-bindenden IgGesamt, IgG1 und IgG2a Antikörpern nachgewiesen.

Wie in den Abbildungen 23 + 24 dargestellt wurde, konnte kein Einfluß von CpG-ODN auf den Titer von FV-spezifischen, neutralisierenden und F-MuLV-bindenden Antikörpern festgestellt werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass der CpG-Effekt bei der Therapie einer akuten FV-Infektion *in vivo* nicht über die humorale Immunantwort vermittelt wurde. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass CpG-ODN die zelluläre Immunantwort verstärken. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde zuerst das Zytokinmuster der einzelnen ODN behandelten Mäuse untersucht. Eine zelluläre Immunantwort ist durch eine größere Anzahl an IFN γ , IL-2 und Lymphotoxinen charakterisiert. Aus der Literatur war bekannt, dass CpG-ODN *in vivo* eine Th1-dominierte Immunantwort induzieren (Klinman *et al.*, 1996; Krieg *et al.*, 1998). Daher wurde überprüft, welche Zytokine bei der Therapie einer akuten FV-Infektion mit CpG-ODN induziert wurden (Abbildung 25). Dazu wurde die Produktion verschiedener Zytokine auf mRNA Level quantitativ mittels eines "RNA Protection

Assays" untersucht. In diesem immunologischen Test wurde die aus Milzzellen von ODN behandelten Mäusen isolierte total RNA eingesetzt. Bei den untersuchten Zytokinen handelte es sich um IL-4, -5, -10, -13, -15, -9, -2, -6 und IFN γ . In den CpG-1668 behandelten Mäusen wurde eine signifikant höhere Prozentzahl IFN γ und IL-2 im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen. Für die anderen untersuchten Zytokine wurde zwischen den ODN behandelten Mausgruppen kein Unterschied in der Prozentzahl festgestellt.

Da IFN γ eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der FV-Infektion spielt (Peterson *et al.*, 2000), wurde die IFN γ -Expression zusätzlich auf Proteinebene untersucht (Abbildung 26). Die Milzzellen der CpG-1668 behandelten Mäuse produzierten eine 7,6fach höhere Menge (Mittelwert) an IFN γ nach Mitogenstimulation im Bezug zur Kontrollgruppe.

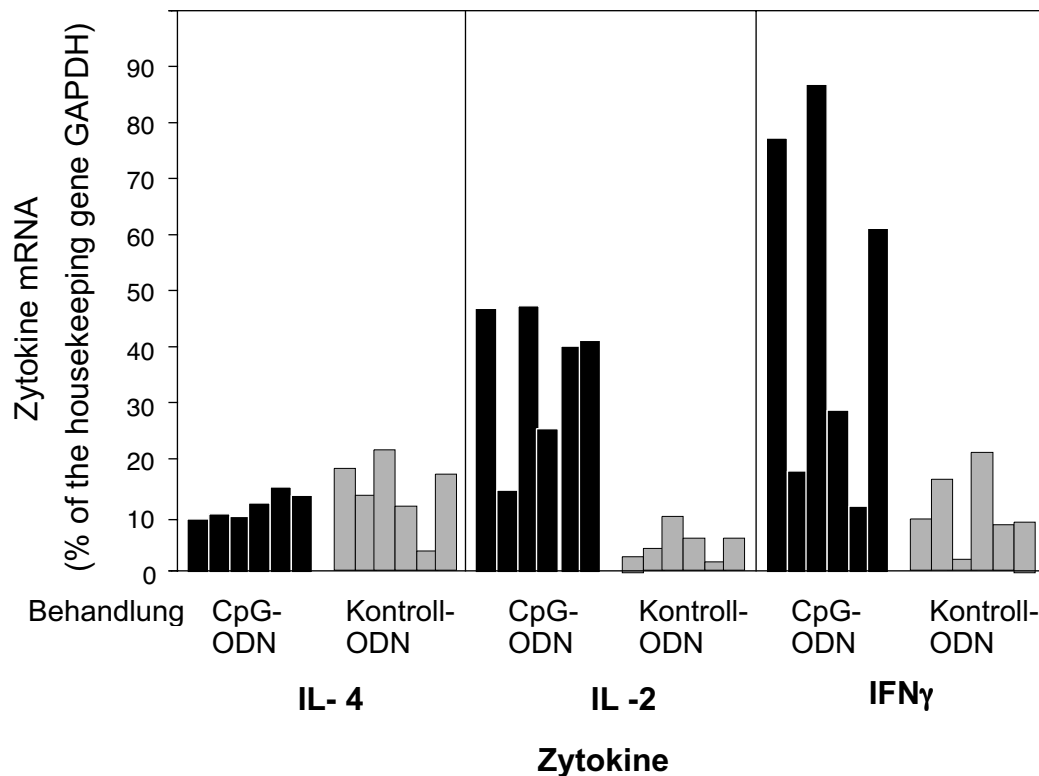


Abbildung 25: Zytokinproduktion von Milzzellen auf mRNA-Ebene aus FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen

FV-susceptible Mäuse wurden mit FV infiziert und mit ODN behandelt (Abbildung 19). Jeder Balken repräsentiert eine individuelle Maus. Die Menge an Zytokintranskripten in Milzzellen von CpG-1668 behandelten (schwarzen Balken) und Kontroll-ODN behandelten Mäusen (grauen Balken) wurden mittels eines "RNA Protection Assays" verglichen. Die Bandenstärke der spezifischen Zytokine ist angegeben als Prozentzahl im Vergleich zu der Bandenstärke des internen "Housekeeping genes" GAPDH. Es sind nur die typischen Th1/Th2-Typ Zytokine (IL-4, IL-2 und IFN γ) dargestellt. Der Unterschied in den Zytokin mRNA-Mengen der ODN behandelten Mäuse ist nach dem Mann-Whitney-Test für IL-2 ($p < 0,005$) und IFN γ ($p < 0,01$) aber nicht für IL-4 ($p > 0,05$) statistisch signifikant.

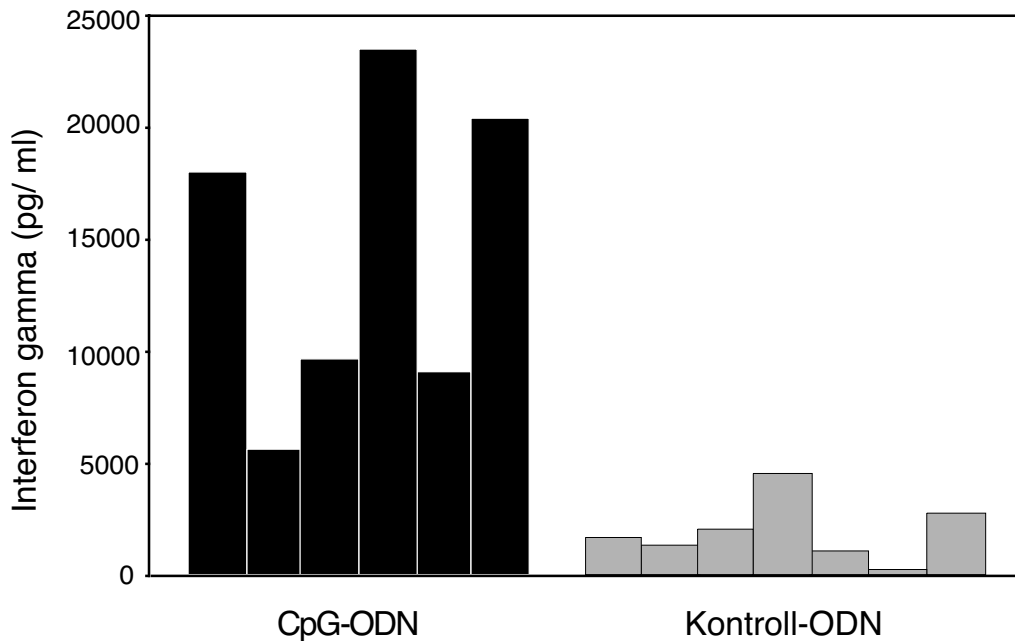


Abbildung 26: IFN γ -Produktion auf Proteinebene von CpG-ODN therapierten, FV-infizierten Mäusen

FV-suszeptible Mäuse wurden mit FV infiziert und mit ODN behandelt (Abbildung 19). Jeder Balken repräsentiert eine individuelle Maus. Die IFN γ -Produktion der Milzzellen von FV-infizierten und CpG-1668 behandelten Mäusen (schwarzen Balken) und Kontroll-ODN Mäusen (grauen Balken) wurde verglichen. Der Unterschied in der IFN γ Produktion zwischen den beiden ODN behandelten Mausgruppen war nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ($p < 0,005$).

Ein Th1-dominiertes Zytokinmuster, welches durch hohe Mengen an IFN γ und IL-2 charakterisiert ist, deutet in der Regel auf eine starke zelluläre Immunantwort hin. CpG-1668 induziert, wie oben gezeigt, dieses Zytokinmuster. Daher wurde in den folgenden Experimenten der Frage nachgegangen, ob der Therapieeffekt von CpG-1668 durch FV-spezifische T-Zellen vermittelt wird. Dafür wurde die Anzahl an IFN γ -produzierenden Milzzellen nach Stimulation mit FV-infizierten Zellen mittels ELISPOT-Test bestimmt. Peterson *et al.* (2000) konnten mit diesem immunologischen Test FV-spezifische CD8 $^+$ - und CD4 $^+$ -Zellen quantitativ nachweisen. In CpG-1668 behandelten Mäusen wurden statistisch signifikant mehr FV-spezifische IFN γ -produzierende Zellen als in der Kontrollgruppe gefunden (Abbildung 27). Da auch NK-Zellen IFN γ produzieren können, konnte im verwendeten ELISPOT-Test der Nachweis von NK-Zellen produzierten IFN γ nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde ein direkter Nachweis von FV-spezifischen CD8 $^+$ -Zellen mittels Tetramer-Klasse I-Technik durchgeführt. Die verwendeten Tetramere waren spezifisch für das immundominante FV *gag* CD8 $^+$ Epitop gPr80^{gag}85-93 (Chen *et al.*, 1996). Die Tetramerfärbung wurde mit Milzzellen von ODN behandelten Mäusen

zwei Wochen nach FV-Infektion durchgeführt. In den Kontroll-ODN behandelten Mäusen wurden bei den vier untersuchten Mäusen 2,5%, 2,5%, 2,7% und 2,9% CD8⁺-Zellen, welche Tetramer positiv waren, nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten in drei von vier CpG-1668 behandelten Mäusen mehr als 5,5% CD8⁺/Tetramer⁺-Zellen gemessen werden (Abbildung 28). Die Einzelwerte der CD8⁺/Tetramer⁺-Zellen in den CpG-1668 behandelten Mäusen lag bei 2,6%, 5,5%, 7,1% und 5,6%. Diese Erhöhung von FV-spezifischen CD8⁺-Zellen in 75% der CpG-1668 therapierten Mäusen entspricht dem prozentualen Anteil an Therapieerfolg nach CpG-1668 Behandlung (Abbildung 21). Wie bei den Kontroll-ODN behandelten Mäusen konnte in unbehandelten, nur FV-infizierten Mäusen nie mehr als 3% CD8⁺/Tetramer⁺-Zellen zwei Wochen nach Infektion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

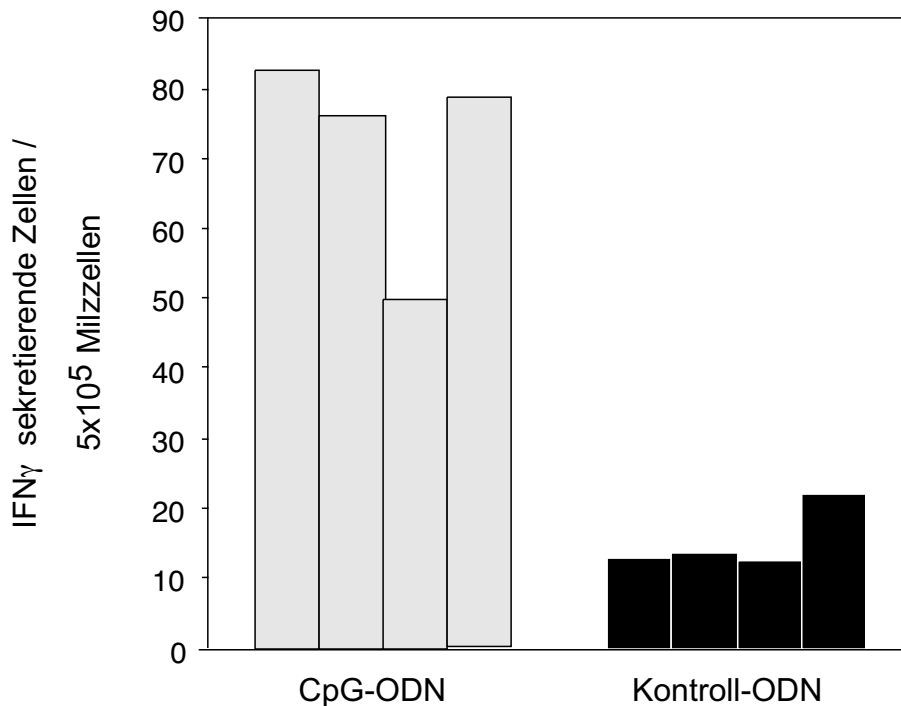


Abbildung 27: Anzahl Virus-spezifischer IFN γ -produzierender Milzzellen von CpG-ODN therapierten, FV-infizierten Mäusen

Y.10A-Mäuse wurden mit FV infiziert und mit CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN behandelt (Abbildung 19). Die Anzahl von IFN γ -produzierenden Milzzellen von CpG-1668 therapierten Mäusen 4 Wochen nach Infektion sind als schwarze Balken dargestellt, die der Kontroll-ODN behandelten Mäuse als graue Balken. Jeder Balken repräsentiert ein individuelles Tier. Die Anzahl an IFN γ produzierenden Zellen zwischen den CpG-1668 und Kontroll-ODN behandelten Tieren war nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ($p < 0,05$).

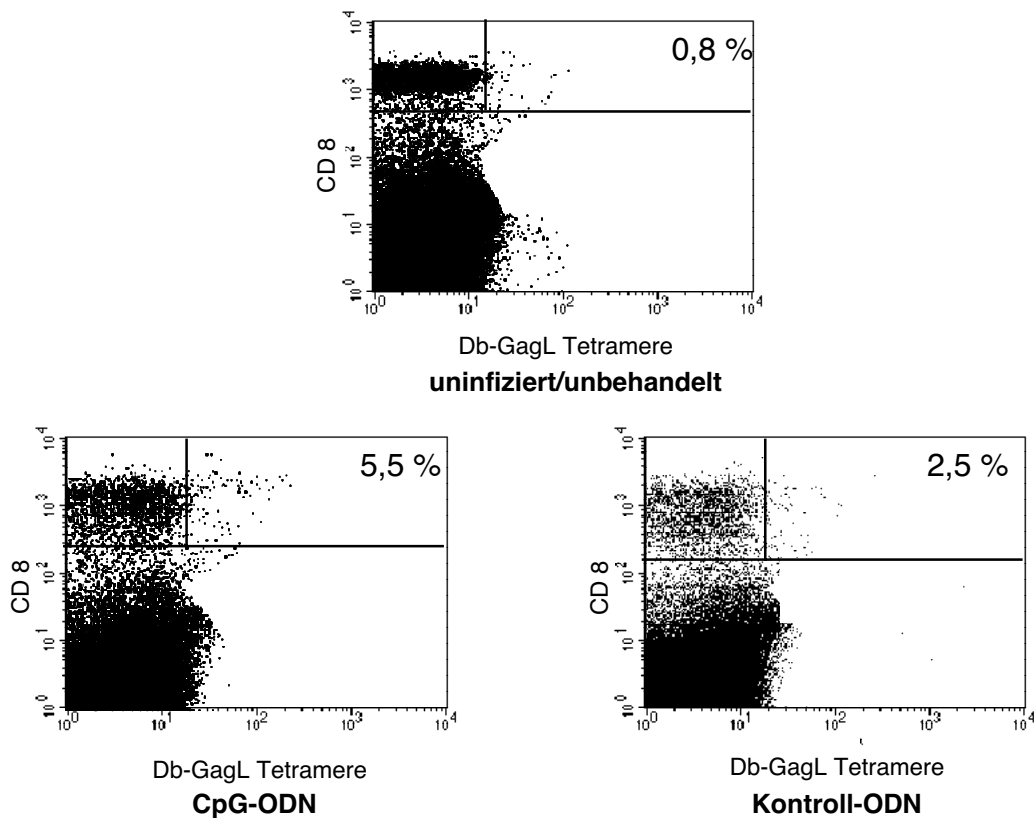


Abbildung 28: Quantifizierung FV-spezifischer CD8⁺-Zellen von CpG-ODN therapierten, FV-infizierten Mäusen

Die Mäuse wurden wie in Abbildung 19 mit FV infiziert und mit CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN behandelt. Gezeigt sind repräsentative durchflußzytometrische Bilder von FV-spezifischen CD8⁺-Zellen von CpG-1668 und Kontroll-ODN behandelten Mäusen. Lebende, kernhaltige Milzzellen wurden mit α -CD8 Antikörpern und D^b-GagL Tetrameren zwei Wochen nach Infektion gefärbt. Die Prozentzahl im oberen rechten Quadranten der einzelnen Bilder gibt die Prozent CD8⁺/Tetramer⁺-Zellen der CD8⁺-Zellen an. Der Hintergrund an CD8⁺/Tetramer⁺ Zellen in unbehandelten und uninfizierten Mäusen betrug 0,5-1%.

Um zu beweisen, dass Virus-spezifische CD8⁺-Zellen für den CpG-1668 induzierten Therapieeffekt verantwortlich waren, wurden CD8⁺-Zellen *in vivo* depletiert (Abbildung 29). Die Depletion wurde während der akuten Phase der FV-Infektion und der CpG-1668 Gabe durchgeführt. Da ein Einfluß von NK-Zellen beim CpG-ODN induzierten Therapieerfolg nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde parallel zur CD8⁺-Zell-Depletion eine NK⁺-Zell-Depletion in CpG-1668 behandelten Mäusen durchgeführt.

Ergebnisse

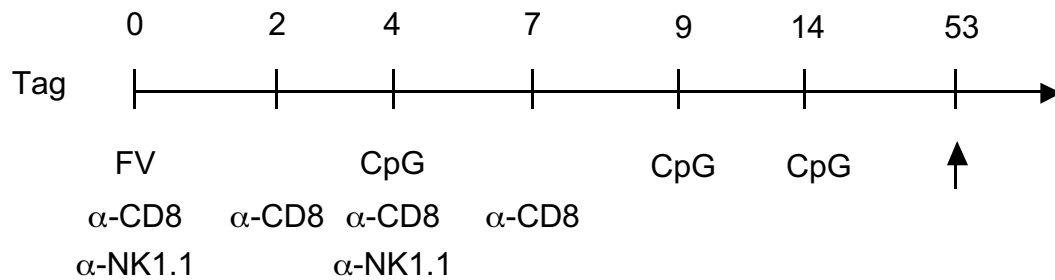


Abbildung 29: Versuchsablauf der CpG-ODN Therapie mit gleichzeitiger CD8⁺- bzw. NK⁺-Zell-Depletion

FV-suszeptible Mäuse wurden mit einer lethalen Dosis FV i.v. infiziert. An den Tagen 4, 9 und 14 nach Infektion wurden den Mäusen i.p. 15nmol CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN injiziert. An den Tagen 0, 2, 4 und 7 nach Infektion wurden CD8-spezifische monoklonale Antikörper (AK169.4) i.p. verabreicht. Der Depletionserfolg wurde mittels Durchflußzytometrie bestätigt. 73,4% der CD8⁺-Zellen waren 2 Wochen nach Infektion in der Milz depletiert. Einer anderen Gruppe von Tieren wurde zum Zeitpunkt der FV-Infektion und der ersten ODN-Gabe NK1.1⁺-spezifische monoklonale Antikörper i.p. verabreicht. 80,8% der NK-Zellen waren 2 Wochen nach Infektion in der Milz depletiert. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt des Versuchsabbruchs an.

Bei den CpG-1668 behandelten und CD8⁺-Zell-depletierten FV-infizierten Mäusen entwickelte sich eine schwere Erythroleukämie (Abbildung 30). Dies zeigte, dass CD8⁺-T-Zellen an dem CpG-1668 induzierten Rückgang der Splenomegalie in FV-suszeptiblen Mäusen entscheidend beteiligt waren. Anders sieht das Ergebnis bei der NK⁺-Zell-Depletion aus. So konnte anhand des Depletionsexperiments ausgeschlossen werden, dass der CpG-Effekt durch NK-Zellen vermittelt wurde. NK-Zell-depletierte Mäuse zeigten nach FV-Infektion und CpG-1668 Therapie denselben CpG-ODN induzierten Rückgang der Splenomegalie wie undepletierte, FV infizierte Mäuse nach CpG-ODN Behandlung (Abbildung 30).

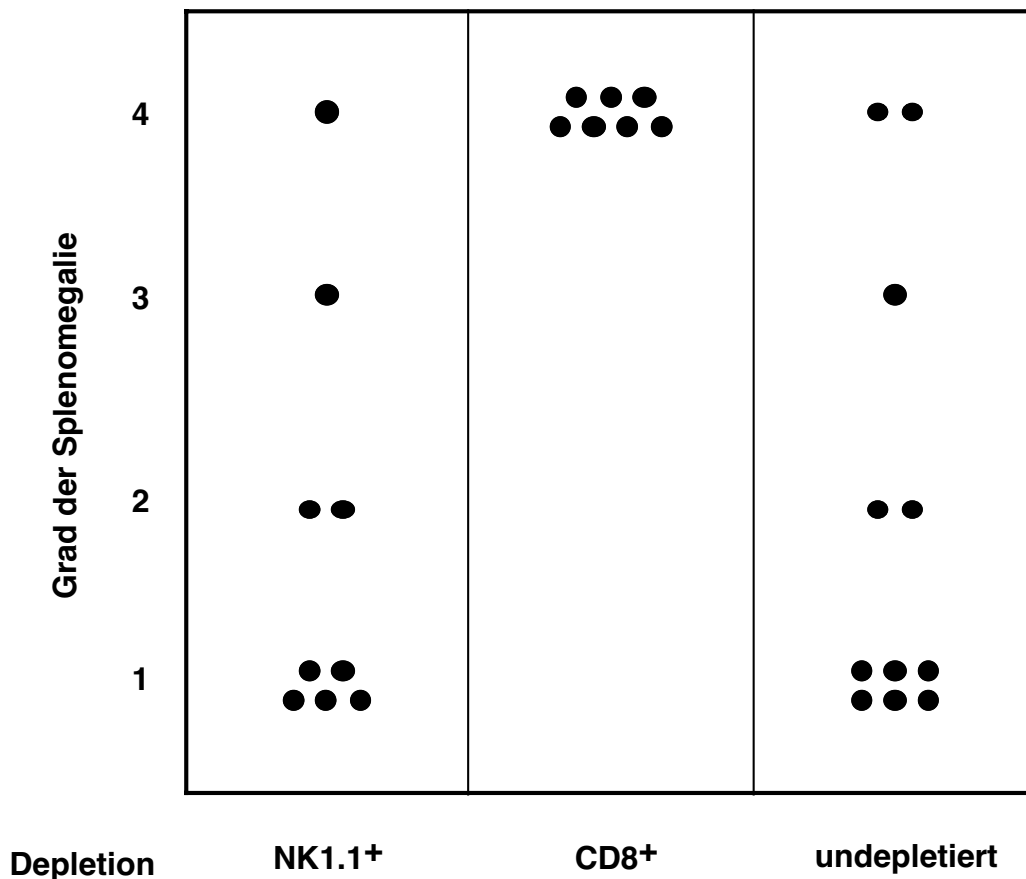


Abbildung 30: Schwere der Splenomegalie bei CpG-ODN behandelten, FV-infizierten Mäusen nach NK⁺- bzw. CD8⁺-Zelldepletion

Y10.A-Mäuse wurden mit FV infiziert und mit CpG-1668 behandelt (Abbildung 29). Die Depletion wurde in der akuten Phase der Infektion durchgeführt. Es wurden NK1.1⁺- bzw. CD8⁺-Zellen depletiert oder als Kontrolle keine Depletion durchgeführt. Dargestellt ist die Schwere der Splenomegalie in den einzelnen Gruppen 5 Wochen nach Infektion. Jeder Punkt symbolisiert ein individuelles Tier. Die Schwere der Splenomegalie ist von 1 (normale Milzgröße) bis 4 (starke Vergrößerung der Milz) eingeteilt (Abbildung 4).

Zusammenfassend konnte anhand dieser Experimente gezeigt werden, dass eine CpG-1668 Therapie in der akuten Phase der FV-Infektion 3/4 der Mäuse vor einer Erythroleukämie schützten. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der CpG-ODN vermittelte Rückgang der Splenomegalie durch Virus-spezifische CD8⁺-Zellen und nicht durch Virus-spezifische Antikörper oder NK-Zellen induziert wurde.

Die CpG-1668 Therapie schützte die Mäuse jedoch nicht vor einer persistierenden Infektion mit FV. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die erfolgreiche CpG-1668 Therapie einen lebenslangen Schutz vor der Entstehung einer FV-induzierten Erythroleukämie induzierte. Dazu wurden FV-suszeptible Mäuse mit FV infiziert und mit CpG-1668 therapiert (Abbildung 19). In allen Tieren mit Therapieerfolg lag das FV acht Wochen nach Infektion persistent vor. Diese Mäuse

hatten eine Milzgröße der Skala 1 (Abbildung 4). Die Milzgröße der Tiere wurde über einen Zeitraum von 1 Jahr und 2 Monaten nach Infektion durch Palpation verfolgt. Bis zum Zeitpunkt 4 Monate nach Infektion zeigte keine Maus einen Ausbruch einer Erythroleukämie. Bis zum Abbruch des Langzeitexperimentes waren immer noch 3 von 7 Tieren vor dem Auftreten einer Erythroleukämie geschützt (Abbildung 31). Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt 1 Jahr und 5 Monate alt. Die erste Maus erkrankte an der Erythroleukämie 4 Monate nach Infektion, die zweite Maus 6 Monate, die dritte Maus 8 Monate und die vierte Maus 10 Monate nach Infektion. Die an der Erythroleukämie erkrankten Mäuse wurden getötet und das Milzgewicht bestimmt. Das Milzgewicht lag zwischen 1,84g und 2,59g.

Durch die CpG-1668 Behandlung akut FV-infizierter Mäuse konnte die Lebenserwartung der Tiere drastisch erhöht werden. Nicht-therapierte Tiere starben durch die FV-induzierte Erythroleukämie ca. 10 Wochen nach Infektion. Einige erfolgreich mit CpG-ODN behandelte Tiere waren lebenslang vor dem Auftreten der Erythroleukämie geschützt.

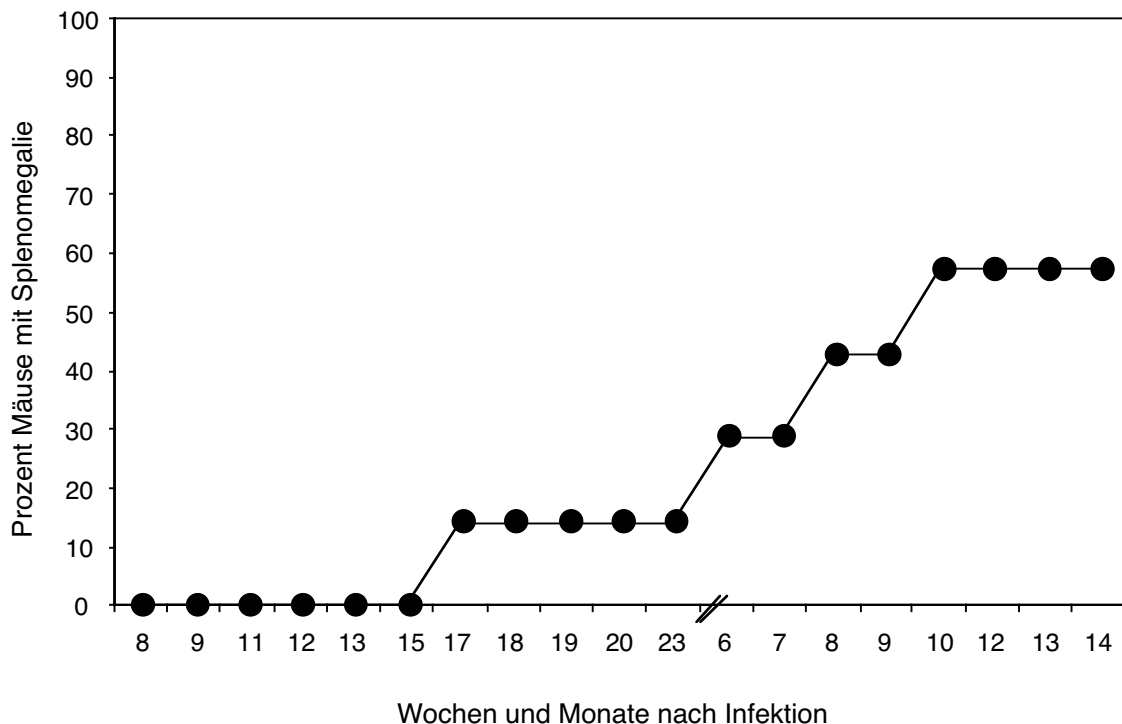


Abbildung 31: Krankheitsverlauf von FV-infizierten, CpG-ODN therapierten Mäusen über 14 Monate

FV-susceptible Mäuse wurden mit einer lethalen Dosis an FV infiziert und in der akuten Phase der Infektion mit CpG-1668 behandelt (Abbildung 19). In erfolgreich therapierten Mäusen (n=7) wurde der FV-induzierte Krankheitsverlauf mittels Palpation verfolgt. Die Milzgrößen der Tiere wurde über 1 Jahr und 2 Monate verfolgt.

4.4. CpG-ODN Therapie einer FV-induzierten Leukämie

Im Abschnitt 4.3 wurden die Ergebnisse der erfolgreichen CpG-1668 Therapie von FV-suszeptiblen Mäusen in der akuten Phase der FV-Infektion gezeigt. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob sich FV-infizierte Mäuse nach Ausbildung einer Erythroleukämie noch erfolgreich mit CpG-1668 therapieren lassen. Der Versuch wurde so konzipiert, dass die CpG-ODN Behandlung vier Wochen nach FV-Infektion durchgeführt wurde. Die Tieren, welche zu diesem Zeitpunkt eine starke Splenomegalie (Grad 3 und 4) aufwiesen, also an einer Erythroleukämie erkrankt waren, wurden für die Experimente eingesetzt (Abbildung 5).

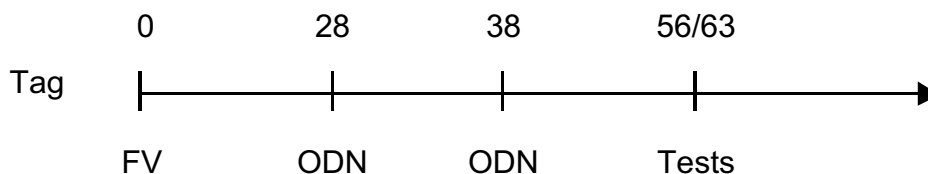


Abbildung 32: Versuchsaufbau der Leukämitherapie mit CpG-ODN

Y.10A-Mäuse wurden mit einer lethalen Dosis FV infiziert. Vier Wochen nach Infektion wurde den Mäusen, die eine schwere Splenomegalie aufwiesen, 15nmol CpG-1668 bzw. Kontroll-ODN i.p. injiziert. Die ODN-Gabe wurde nach 10 Tagen wiederholt. Zum Zeitpunkt 8 und 9 Wochen nach Infektion wurden die Tiere getötet und verschiedene immunologische sowie virologische Tests durchgeführt.

Über einen Zeitraum von 8 bis 9 Wochen nach Infektion wurde der FV-induzierte Verlauf der Leukämie in den ODN behandelten Mäusen untersucht. Als Kontrolle der CpG-1668 Behandlung wurde Mäusen Kontroll-ODN injiziert. Bei 7 von 9 CpG-1668 behandelten Tieren kam es nach Infektion zu einer signifikanten Verkleinerung der Milzgröße im Vergleich zu den Kontrollen. Es zeigte sich, dass 5 von 9 Mäuse aus der Gruppe der CpG-1668 behandelten Tiere ein Milzgröße der Stufen 1 oder 2 aufwiesen, während in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt 6 von 7 Tiere eine Splenomegalie der Stufe 3 und 4 hatten. In den CpG-1668 behandelten Mäusen zeigte sich außerdem eine signifikante Reduktion des Milzgewichtes im Vergleich zu den Kontrollen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Milzgewichte von Mäusen nach der CpG-ODN Leukämie therapie

	CpG-1668	Kontroll-ODN
	0,7g	3,4g
	1,9g	2,8g
	0,7g	2,8g
	0,6g	1,6g
	0,8g	3,0g
	2,0g	3,0g
	0,6g	0,7g
	1,0g	
	0,9g	
Mittelwert	1,02g	2,46g

Der Versuchsaufbau der Leukämie therapie ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Mäuse wurden 8 oder 9 Wochen nach Infektion getötet und die Milzgewichte bestimmt. In normaler Schriftstärke sind die Milzgewichte der einzelnen Tiere aufgelistet. In fettgedruckten Zahlen sind die jeweiligen Mittelwerte der Milzgewichte aufgeführt. Der Unterschied zwischen den ODN behandelten Tieren ist statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test $p=0,0079$).

Da die FV-induzierten Leukämiezellen das Virusantigen auf der Zelloberfläche tragen, konnte mit dem IC-Test die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt werden (Abbildung 33). In den CpG-1668 behandelten Tieren kam es im Vergleich zu den Kontrollen zu einer Reduktion der Anzahl an infektiösen Zellen in der Milz. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Test $p=0,0549$).

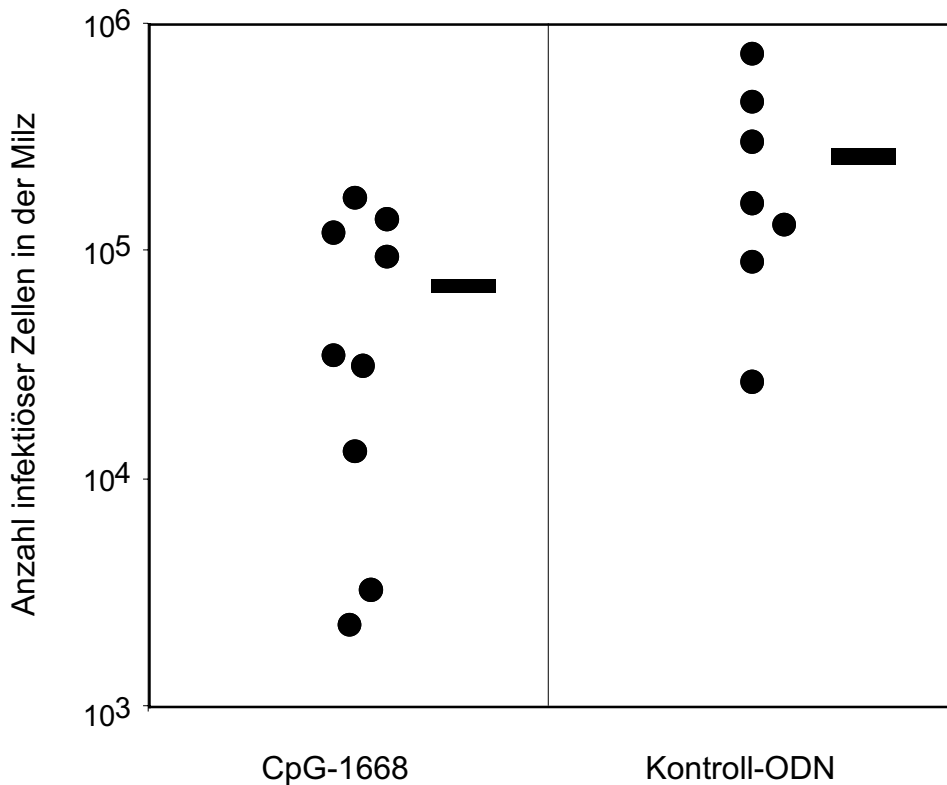


Abbildung 33: Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz nach Leukämietherapie mit CpG-ODN

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 32 dargestellt. Die Tiere wurden 8 oder 9 Wochen nach Infektion getötet und die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die Ergebnisse eines individuellen Tieres. Der Mittelwert (schwarzer Balken) lag bei den CpG-1668 behandelten Mäusen bei $6,9 \times 10^4$ infektiöse Zellen/Milz und in der Kontrollgruppe bei $28,5 \times 10^4$.

Die Ergebnisse der Leukämietherapie mit CpG-ODN zeigten eine signifikante Reduktion des Milzgewichtes in den CpG-ODN behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen (Tabelle 11). Die Reduktion der Milzgröße und der Anzahl an infektiösen Zellen in der Milz in den CpG-1668 behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen, legte die Vermutung nahe, dass es zu einer CpG-ODN vermittelten Reduktion der FV-induzierten Leukämiezellen kam. Mit diesem Ergebnis soll in Zukunft eine Krebstherapie mit CpG-ODN aufgebaut werden.

4.5. Verwendung von immunstimulativen CpG-ODN als Adjuvants bei einer transkutanen Immunisierung

Beignon *et al.* (2002) zeigten, dass sie Mäuse mittels einer transkutanen Immunisierung vor einer Belastungsinfektion mit Influenza schützen konnten. Der Impfstoff wurde dazu auf die Haut aufgetragen und bestand aus einem Gemisch von CpG-ODN, Cholera Toxin und Influenza Virus Peptiden (Abschnitt 3.1.5).

Es stellte sich daher die Frage, ob eine transkutane Immunisierung gegen Retroviren angewendet werden kann. Als Modell für diese Vakzinestudie wurde die Friend Virus Infektion in der Maus verwendet. FV-suszeptible Mäuse (Y10.A) wurden mit einem Cocktail aus CpG-ODN, Cholera Toxin (CT) und Friend spezifischen T-Zell-Peptiden immunisiert.

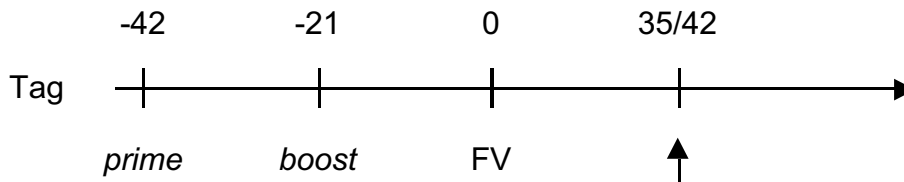


Abbildung 34: Versuchsablauf der transkutanen Immunisierung

FV-suszeptible Mäuse (Y10.A) wurden zu den Zeitpunkten -42 und -21 Tage vor der Belastungsinfektion mit dem Friend Virus transkutan immunisiert. Der Impfstoff bestand aus einem Gemisch von ODN, Cholera Toxin (CT) und FV-spezifischen T-Zell-Peptiden. Die Vakzine wurde auf die Haut im Bereich des Abdomens aufgetragen. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen nur mit CpG-1826 und CT immunisiert. Der Pfeil markiert die Zeitpunkte von immunologischen und virologischen Tests.

Im folgenden werden transkutane Immunisierungsgemische aus CpG-1826, CT und FV-spezifischen T-Zell-Peptiden als Peptid-Vakzine bezeichnet. Als Negativkontrolle wurde zur Immunisierung nur CpG-1826 und CT eingesetzt. Dieser Immunisierungscocktail wurde Kontroll-Vakzine genannt.

Für die Überprüfung der Effektivität der Peptid-Vakzine wurde der Krankheitsverlauf in den Peptid- und Kontroll-Vakzine behandelten Mäusen nach der FV-Belastungsinfektion durch Palpation verfolgt. In beiden Gruppen entwickelten die Mäuse 2 Wochen nach Infektion eine Splenomegalie der Stufe 4 (Abbildung 4). Bis zum Zeitpunkt 5 Wochen nach Infektion bildete sich in 88,9% aller Peptid immunisierten Mäusen die FV-induzierte Splenomegalie zurück (Abbildung 35). Bei den Kontrollen wiesen zu diesem Zeitpunkt dagegen noch 87,5% aller Mäuse eine Splenomegalie auf.

Die Peptid-Vakzine konnten zwar keinen Schutz vor einer FV-induzierten akuten Splenomegalie induzieren, jedoch die Ausbildung einer Erythroleukämie in fast 90% der Mäuse verhindern.

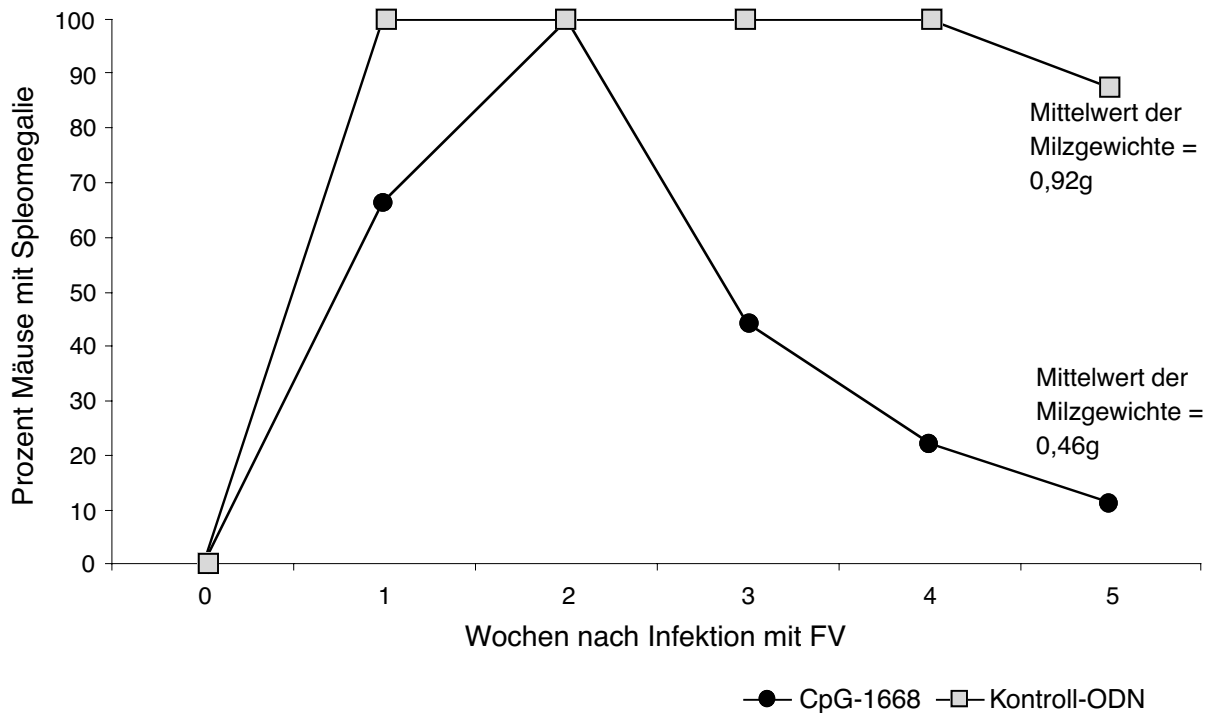


Abbildung 35: FV-induzierter Krankheitsverlauf in transkutan immunisierten Mäusen nach Belastungsinfektion

Y10.A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -42 und -21 Tage vor der FV-Belastungsinfektion mit Peptid- oder Kontroll-Vakzinen immunisiert (Abbildung 34). Der FV-induzierte Krankheitsverlauf wurde über einen Zeitraum von 5 Wochen durch Palpation verfolgt. Peptid-immunisierte Mäuse n=9; Kontrolltiere n=8. Der Unterschied in der Splenomegalie zwischen den beiden Gruppen war nach dem Fisher's Exakt Test statistisch signifikant p=0,0055.

Um festzustellen, ob der Rückgang der Splenomegalie in den Impfungen mit der Reduktion der Viruslast korrelierte, wurde die FV-Last im Blut und in der Milz untersucht (Abbildung 36). Die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz lag bei den Peptid-immunisierten Mäusen im Mittel bei $3,4 \times 10^4$ infektiösen Zellen/Milz und bei den Kontroll-immunisierten Tieren bei $4,3 \times 10^5$ infektiöser Zellen/Milz. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test; p=0,004). Eine signifikante Reduktion der Viruslast durch die Peptid-Immunsierung konnte auch in der Prozentzahl infizierter Zellen im Blut gemessen werden. Im Blut wurden in den Peptid-Vakzine behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen 3,1mal weniger infizierter Zellen gemessen.

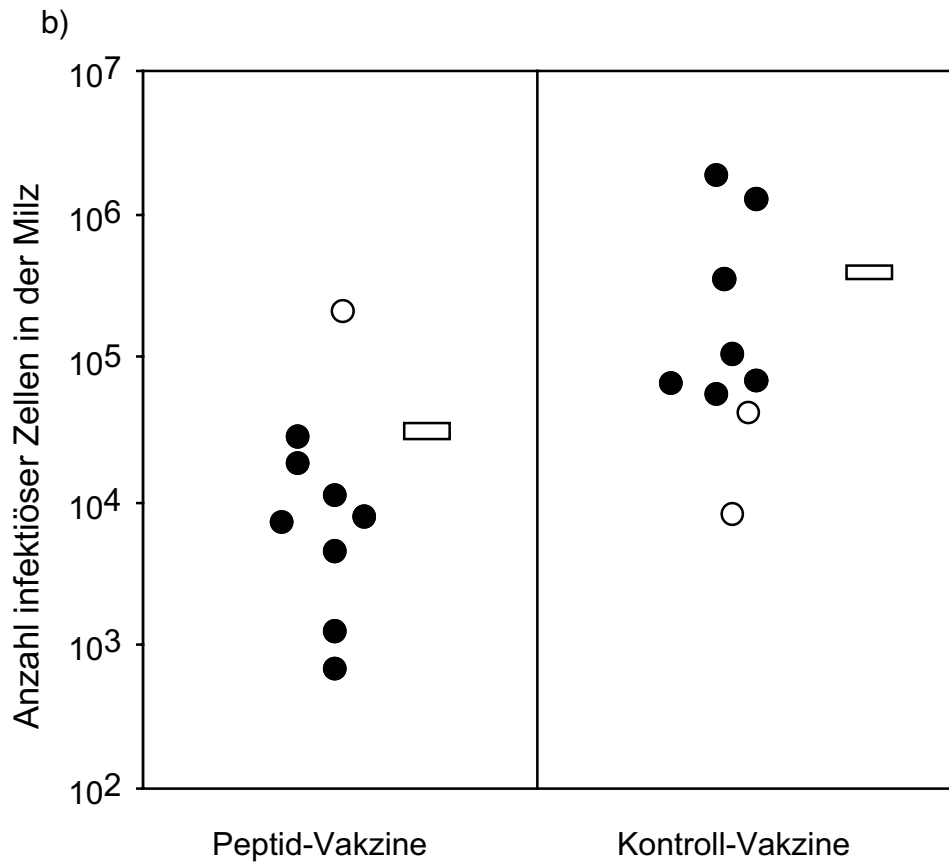
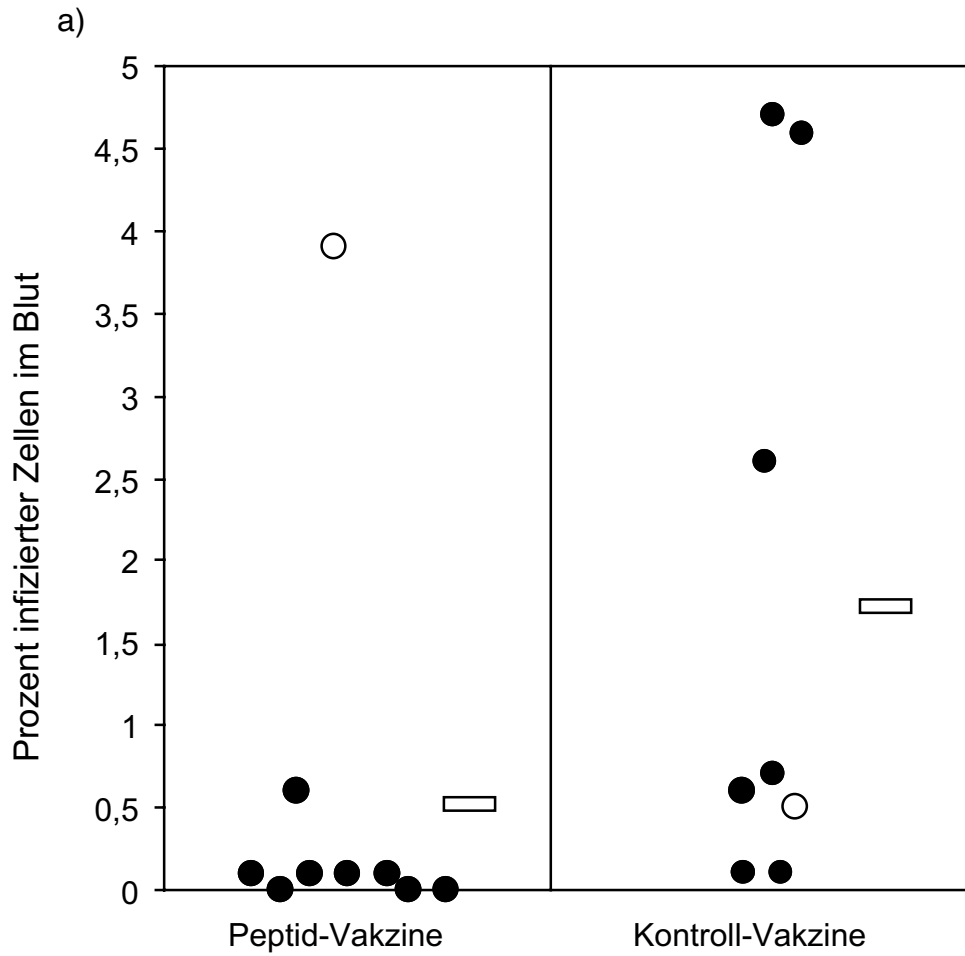


Abbildung 36: Viruslast in der Milz und im Blut von immunisierten, FV-belasteten Mäusen

Y10.A-Mäuse wurden zu den Zeitpunkten -42 und -21 Tage vor der FV-Belastungsinfektion mit Peptid-Vakzine oder Kontroll-Vakzine immunisiert (Abbildung 34). Zum Zeitpunkt 5 Wochen nach Infektion wurde die Viruslast in der Milz und im Blut bestimmt. Jeder Kreis repräsentiert ein individuelles Tier. Die geschlossenen Kreise in der Peptid-Vakzine Gruppe (links) entsprechen Tieren, in denen der Rückgang der Splenomegalie diagnostiziert wurde. Die offenen Kreise stellen die Tiere mit Splenomegalie dar. In der Kontroll-Vakzine Gruppe (rechts) spiegeln die geschlossenen Kreise Tiere mit Splenomegalie wieder, während offene Kreise Mäuse mit spontanem Rückgang der Splenomegalie symbolisieren. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als Rechtecke aufgeführt. Für die Berechnung des Mittelwerts wurden alle Tiere berücksichtigt. a) Anzahl infektiöser Zellen in der Milz. Der Unterschied war nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ($P < 0,004$). b) Prozentzahl infizierter Zellen im Blut. Die Prozentzahl lebender kerntragender Zellen im Blut, die das glykolysierte FV-Gag-Protein an der Oberfläche exprimierten, wurde mittels Durchflußzytometer bestimmt. Der Mittelwert an infizierten Zellen im Blut lag bei den Peptid-Vakzine behandelten Mäusen bei 0,56% und bei der Kontrollgruppe bei 1,74%. Der Unterschied war nach dem Mann-Whitney Test statistisch signifikant ($P < 0,036$).

Nachdem eine Reduktion der Viruslast in der Milz und im Blut sowie ein Peptid-Vakzine vermittelter Rückgang der FV-induzierten Splenomegalie festgestellt wurde, stellte sich die Frage, welche Zellen des Immunsystem diesen protektiven Effekt auslösten.

Untersuchungen zeigten, dass bei der FV-neutralisierenden Antikörperantwort in den Peptid- und Kontroll-Vakzine behandelten Mäusen zwei Wochen nach Infektion kein Unterschied festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Also war für den Schutz vor einer Leukämie nicht die humorale sondern eher die zelluläre Immunantwort verantwortlich. Daher wurde ein Zell-Transferexperiment durchgeführt, um durch die transkutane Immunisierung induzierte spezifische CD8⁺- und CD4⁺-Zellen nachzuweisen. Ein besonderer Vorteil dieses Tests ist, dass gleichzeitig spezifische CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen gemessen werden konnten.

Bei dem Transferexperiment wurden aus den Milzen von Peptid- und Kontroll-immunisierten C57Bl/6, die das T-Lymphozytenoberflächenmolekül THY1.2 tragen, Milzszell suspensionen hergestellt (Abbildung 37). Die C57Bl/6 mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül THY1.2, werden im folgenden als THY1.2 bezeichnet. Diese Milzzellen wurden in C57Bl/6 mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül THY1.1, (THY1.1), transferiert. Die transferierten T-Zellen können im Durchflußzytometer aufgrund ihres Oberflächenmoleküles THY1.2 von den endogenen T-Zellen der Empfängermause THY1.1⁺, unterschieden werden. Nach dem Transfer wurden die Mäuse mit FV infiziert. 10 Tage nach dem Transfer und der anschließenden FV-Infektion wurden mittels Durchflußzytometrie die Prozentzahl an CD4⁺/THY1.2⁺-Zellen der ge-

samten CD4-Zellpopulation in den Empfängertieren gemessen. Dasselbe wurde auch für die Prozentzahl CD8⁺/THY1.2⁺-Zellen durchgeführt. So konnte die Expansion von FV-spezifischen T-Zellen nach der Infektion mit FV verfolgt werden (Abbildung 38).

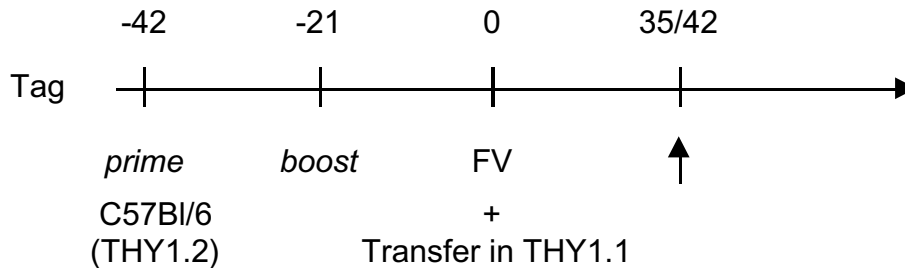


Abbildung 37: Versuchsaufbau eines Zell-Transferexperiments zum Nachweis von Virus-spezifischen T-Zellen

C57Bl/6-Mäuse mit dem T-Lymphozytenoberflächenmolekül (THY1.2) wurden zu den Zeitpunkten -6 und -3 Wochen mit der Peptid-Vakzine oder der Kontroll-Vakzine immunisiert. Drei Wochen nach der Auffrischungsimpfimmunisierung wurden die Milzzellen dieser THY1.2-Mäuse in THY1.1-Mäuse transferiert (Abschnitt 3.1.9) und die Empfängertiere mit FV infiziert. 10 Tage nach Transfer und Infektion wurde die Anzahl der transferierten CD4⁺ und CD8⁺-THY1.2-Zellen in der Milz der C57Bl/6(THY1.1)-Mäuse durchflußzytometrisch bestimmt. Der Pfeil markiert die Zeitpunkte von immunologischen und virologischen Tests.

Das Transferexperiment zeigte, dass in den transkutan Peptid-immunisierten Mäusen 3,1mal mehr FV-spezifische CD8⁺-Zellen und 2,4mal mehr FV-spezifische CD4⁺-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar waren (Abbildung 38). Der Unterschied in der Prozentanzahl der CD4⁺-Zellen war in den Peptid immunisierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Test $p=0,0574$) für die CD8⁺-Zellen hingegen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden (Mann-Whitney-Test $p=0,0286$).

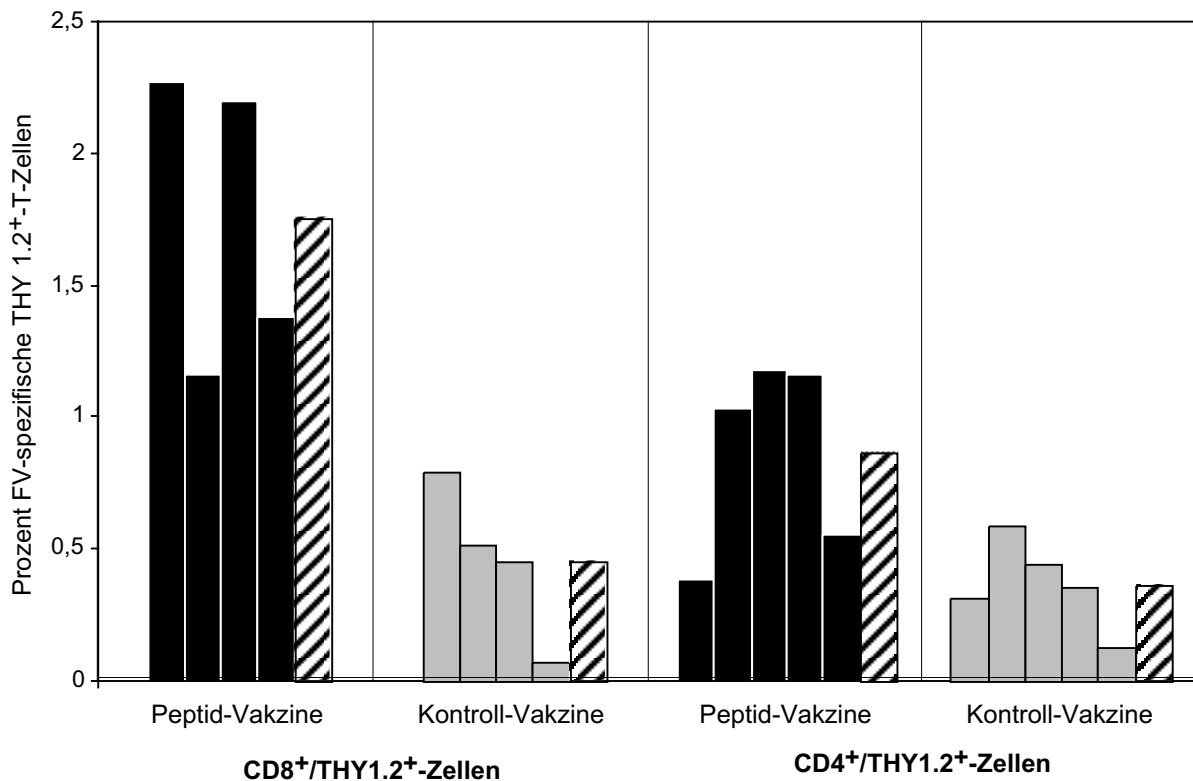


Abbildung 38: Nachweis von Virus-spezifischen T-Zellen in einem Zelltransferexperiment

THY1.2-Mäuse wurden, wie in Abbildung 37 dargestellt, transkutan immunisiert und die Milzzellen in THY1.1-Mäuse transferiert. 10 Tage nach dem Transfer und der FV-Infektion wurde die Prozentzahl an CD4⁺/THY1.2⁺-Zellen im Bezug zu allen CD4⁺-Zellen (THY1.1⁺- und THY1.2⁺-Zellen) ausgewertet. Dasselbe wurde für CD8⁺/THY1.2⁺-Zellen durchgeführt. Die Balken mit den Schrägstreifen geben die Mittelwerte der einzelnen Gruppen wieder.

Zusammenfassend war festzustellen, dass die transkutane Immunisierung von FV-suszeptiblen Mäusen mit FV-Peptiden die Mäuse vor der Entstehung einer Erythroleukämie schützen konnte. Die Immunisierung schützte jedoch nicht vor einer FV-induzierten vorübergehenden Splenomegalie und somit nicht vor einer FV-Infektion und Persistenz des Virus. Der durch die Peptid-Vakzine induzierte Schutz vor der Erythroleukämie wurde wahrscheinlich durch eine FV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort vermittelt.

5. Diskussion

Virusinfektionen stellen auch heutzutage noch ein großes Problem dar. Allein in Deutschland versterben z.B. jährlich 7000-15000 Menschen an den Folgen einer Influenzainfektion (www.roche.de). Einen wirksamen Schutz gegen Virusinfektionen bieten meistens nur Impfungen, wobei es für eine Reihe von Viren z.B. HIV, Hepatitis C Virus und Ebola bis heute noch keine wirksamen Vakzinen gibt. Die meisten heute verfügbaren antiviralen Medikamente sind für die HIV-Therapie zugelassen. Die antiviralen Medikamente können den HIV-Infizierten nicht heilen, da sie das Virus nicht vollständig eliminieren können, während der Einnahme jedoch kurzfristig die Viruslast verringern. Für viele andere Virusinfektionen gibt es dagegen bis heute keine Medikamenten-Therapie.

Das Immunsystem von Infizierten ist in der Lage eine Virus-spezifische Immunantwort auszubilden. Ist diese Immunantwort jedoch zu schwach oder zu langsam kommt es zu Virus-induzierten Erkrankungen. Daher ist die Immuntherapie eine interessante antivirale Behandlung von Infizierten. Ziel einer Immuntherapie, bei der immunstimulative Agenzien (z.B. Zytokine) eingesetzt werden, ist es, die antivirale Immunantwort des Infizierten so zu verstärken, dass keine klinischen Symptome mehr auftreten. Am günstigsten wären unspezifische Agenzien, welche gegen verschiedene Virusinfektionen eingesetzt werden können und dann eine Verstärkung der Virus-spezifischen Immunantwort bewirken. Eine recht aufwendige und kostenintensive klinische Immuntherapie (Typ1 Interferone) wird z.B. bei der Eliminierung von chronischen Hepatitis C Virusinfektionen eingesetzt.

Ein neues immunstimulatives Agens tritt seit Mitte der 90er Jahre verstärkt in den Blickpunkt des Interesses. Dabei handelt es sich um synthetische Oligodesoxynukleotide mit CpG-Motiv (CpG-ODN). CpG-ODN induzieren *in vivo* eine "unspezifische" Aktivierung von immunologischen Zellen (z.B. B-Zellen und APC) und ein Th1-dominiertes Zytokinmuster. Da aus Untersuchungen von verschiedenen Virusinfektionen bekannt war, dass eine antivirale Abwehr mit einer Th1-dominierten Immunantwort in Verbindung steht (Ramshaw *et al.*, 1997), war das Ziel dieser Arbeit, den Einsatz von CpG-ODN als Immuntherapie gegen Virusinfektionen zu etablieren.

5.1. Anwendung von immunstimulativen CpG-ODN zur Paraimmunisierung bzw. Immuntherapie einer Retrovirusinfektion

Wie schon von Sparwasser *et al.* (1998) gezeigt, führte die einmalige Gabe von synthetischen Oligodesoxynukleotiden mit CpG-Motiv (CpG-ODN) in uninfizierten Mäusen zu einer transienten Splenomegalie (Milzvergrößerung). Die Splenomegalie wurde durch die CpG-ODN induzierte Proliferation von hämatopoetischen Zellen verursacht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich dabei vor allem um den drastischen Anstieg von Ter119⁺-Erythrozytenvorläuferzellen handelte (Abb. 15). Neben der Proliferation der Milzzellen konnte, wie in der Literatur beschrieben (Krieg *et al.*, 2002), die Aktivierung (CD69⁺ und MHCII) von CD8⁺-, CD4⁺-, CD19⁺-, NK1.1⁺- und Mac1⁺-Zellen in der Milz gezeigt werden.

Nachdem der immunstimulative Effekt des CpG-ODN *in vivo* nachgewiesen werden konnte, wurde das ODN für die antivirale Therapie verwendet. Dazu wurde in FV-suzzeptiblen Mäusen eine Paraimmunisierung mit CpG-1668 vor Infektion mit einer lethalen Dosis FV durchgeführt. Anders als in den publizierten *L. major* Mausstudien (Stacey *et al.*, 1996; Lipford *et al.*, 2000) zeigten die Untersuchungsergebnisse im FV-Modell keinen CpG-ODN vermittelten Schutz vor der Virus-induzierten Erkrankung. In den prophylaktisch CpG-ODN behandelten, FV-infizierten Mäusen entwickelte sich stattdessen ein schwerer Virus-induzierter Leukämieverlauf. Die Ergebnisse deuteten daraufhin, dass durch die CpG-ODN Behandlung das FV seine Zielzellen effektiver infizierte und sich dadurch schneller vermehren konnte. Das FV benötigt für eine effiziente Infektion und Vermehrung einen Pool an aktivierten Zielzellen (Kost *et al.*, 1981). Diese Zielzellen sind vor allem Erythrozytenvorläuferzellen und B-Zellen (Hasenkrug *et al.*, 1998). Wie in Abbildung 11 und 12 gezeigt und von Sparwasser *et al.* (1998) sowie Krieg *et al.* (1995) publiziert, induziert CpG-ODN *in vitro* und *in vivo* die Aktivierung und Proliferation von gerade diesen Zielzellen.

Um zu untersuchen, ob die CpG-ODN vermittelte Proliferation der Ter119⁺- und B-Zellen eine FV-Infektion verstärken kann, wurden FV-resistente Mäuse vor der Infektion mit CpG-ODN behandelt. Das Immunsystem von FV-resistenten Mäusen ist nach einer vorübergehenden Splenomegalie in der Lage die FV-Replikation zu kontrollieren. Durch der Paraimmunisierung mit CpG-ODN war jedoch in 70% der FV-resistenten Mäuse keine Kontrolle der Virusreplikation mehr nachweisbar (Abb.14). In diesen Mäusen war eine extrem schwere Splenomegalie feststellbar, die vermut-

lich durch eine Erythroleukämie verursacht wurde. Es kam durch die prophylaktische CpG-ODN Gabe zu einem signifikanten Anstieg der Infektion von Zielzellen (Ter119⁺- und B-Zellen) des FV. Der starke Anstieg an infizierten Zielzellen implizierte, dass die Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen und der B-Zellen die Ursache für die verstärkte Infektion der Mäuse war.

Obwohl die prophylaktische Behandlung mit CpG-ODN einen Schutz gegen Belastung mit Tumorzellen oder *L. major* induzieren kann, hat diese Behandlung einen gegenteiligen Effekt bei C-Typ Retroviren. Die prophylaktische CpG-ODN Gabe vor einer retroviralen Belastungsinfektion machte sogar resistente Mäuse suszeptibel gegenüber der FV-induzierten Erkrankung (Abschnitt 4.2). Vor allem Retroviren aber auch andere Viren infizieren hämatopoetische Zellen. Für diese Viren ist die Infektion und Replikation erleichtert, wenn ihre Zielzellen aktiviert sind und proliferieren. Da die prophylaktische CpG-ODN Behandlung die Aktivierung und Proliferation der hämatopoetischen Zellen induziert, kann es somit zu einer schnelleren Virusvermehrung und damit zu einer verstärkten Virus-induzierten Erkrankung kommen. Gegen Viren, welche keine hämatopoetischen Zellen infizieren, kann durch die prophylaktische CpG-ODN Behandlung ein Schutz vor der Virusinfektion induziert werden, wie neuste Daten von Harandi *et al.* (2003) zeigten.

Im weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von CpG-ODN in einer ablaufenden antiviralen Immunantwort untersucht. Dazu wurden FV-suszeptible Mäuse mit einer lethalen Dosis FV infiziert und in der akuten Phase der Infektion mit CpG-ODN therapiert.

Die CpG-ODN Behandlung in der akuten Phase vermittelte in 74% der FV-suszeptiblen Mäuse einen Schutz vor der Virus-induzierten Leukämie (Abb. 20). Der therapeutische Effekt von CpG-ODN im FV-Modell bestätigt die positiven Behandlungsergebnisse in Allergie- (Kline *et al.*, 2002) und in experimentellen Krebsmodellen in der Maus (Ballas *et al.*, 2001; Heckelsmiller *et al.*, 2002) sowie bei infektiösen Erregern (Zimmermann *et al.*, 1998). Der CpG-ODN vermittelte Effekt hing mit der Reduktion der Viruslast in der Milz und im Blut zusammen. Die Virusreduktion im FV-Modell wurde durch FV-spezifische CD8⁺-Zellen vermittelt (Abb. 28). Das CD8⁺-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der FV-Replikation spielen, konnte auch in Vakzinestudien gezeigt werden. So schützten Vakzine induzierte CD8⁺-FV-spezifische T-Zellen Mäuse vor einer FV-induzierten Leukämie (Dittmer *et al.*, 1999a;

Dittmer *et al.*, 1999b). Nicht nur in der Immunität gegen FV spielen CD8⁺-spezifische T-Zellen eine entscheidende Rolle, sondern auch bei anderen retroviralen Infektionen, wie HIV und HTLV1. Daher ist der Einsatz von CpG-ODN als Immuntherapie auch bei humanpathogenen Viren interessant.

Andererseits wurde von Dittmer *et al.* (1999) und Hasenkrug *et al.* (1995) gezeigt, dass auch FV-neutralisierende Antikörper wichtig für die Viruskontrolle *in vivo* sind. Obwohl von CpG-ODN bekannt ist, dass es in B-Zellen die Antikörperproduktion stimulieren kann (Krieg *et al.*, 1995), konnte keine Erhöhung des Antikörpertiters in FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen festgestellt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass durch die CpG-1668 Therapie in der akuten Phase der Infektion vor allem der zelluläre und nicht der humorale Arm des Immunsystems verstärkt wurde.

Die spezifische CD8⁺ T-Zellantwort wird durch Zytokine der Typ1 T-Helferzellantwort (wie IL-2 und IFN γ) gesteigert. Solche Zytokine werden vorwiegend von Leukozyten der Milz nach CpG-ODN Gabe *in vivo* produziert (Klinman *et al.*, 1996). Untersuchungen des Zytokinmusters von Splenozyten aus FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen zeigten, dass die Zytokine IL-2 und IFN γ im Vergleich zu den Kontrollen verstärkt produziert wurden. Da die meisten Virusinfektionen über eine Th1-dominierte Immunantwort kontrolliert werden, bieten CpG-ODN ein großes Potenzial, um vor Virus-induzierten Erkrankungen zu schützen. Das NK-Zellen von CpG-ODN stimuliert werden können wurde von Ballas *et al.* (2001) gezeigt. In dieser Arbeit konnte für den Therapieerfolg des CpG-1668 in der akuten Phase der FV-Infektion aber keine entscheidende Rolle der NK-Zellen nachgewiesen werden.

Zwar verhinderte die CpG-ODN Therapie nicht die persistierende Infektion mit FV, dennoch verlängerte diese Therapie die Lebenserwartung der Tiere deutlich. In einem Teil der therapierten Tiere wurde sogar ein lebenslanger Schutz vor einer FV-induzierten Erythroleukämie nachgewiesen (Abb. 31).

Die Ergebnisse der erfolgreichen CpG-ODN Behandlung einer akuten Retrovirusinfektion im Mausmodell zeigten, dass CpG-ODN eine interessante Immuntherapie für HIV oder andere Virusinfektionen, welche über eine Th1-dominierte Immunantwort kontrolliert werden, darstellt. Gerade in der Behandlung von HIV-Infektionen wird von Forschern und Klinikern versucht, Therapien zu entwickeln, welche das HIV-spezifische Immunsystem verstärken. In den letzten Jahren gab es Hinweise, dass eine starke HIV-spezifische Immunantwort ohne den Einsatz von Medikamenten in

der Lage ist eine HIV induzierte Erkrankung zu unterdrücken (Spring *et al.*, 2001; Harrer *et al.*, 1996; Rosenberg *et al.*, 1997).

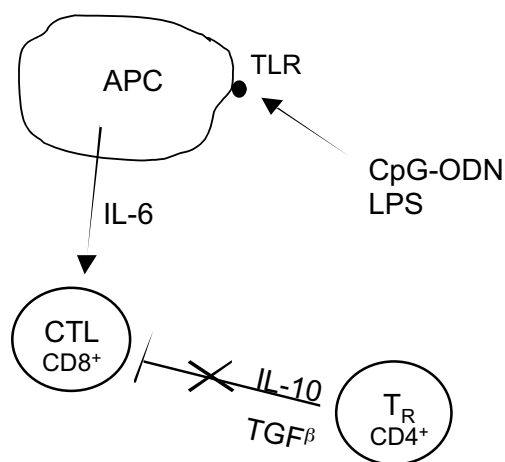
Die Induktion einer starken Immunantwort gegen HIV durch CpG-ODN während der akuten Infektion könnte daher dazu führen, dass das Immunsystem des Infizierten zumindest zeitweise das Virus kontrollieren könnte. Das hätte den Vorteil, dass auf die HAART-Therapie verzichtet werden könnte, oder diese erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion eingesetzt werden müsste. Dieser spätere Einsatz der HAART-Therapie würde für den Infizierten, aufgrund der hohen Nebenwirkungen der Therapie, eine höhere Lebensqualität und -erwartung bedeuten. Eine andere Möglichkeit wäre die CpG-ODN Behandlung mit der HAART-Therapie zu kombinieren, was womöglich die Immunantwort gegen das Virus verbessern und somit ein Absetzen der HAART-Therapie ermöglichen könnte.

CpG-ODN Sequenzen weisen eine Speziespezifität auf, aus diesem Grund lässt sich die in dieser Arbeit erfolgreich verwendete CpG-ODN Sequenz, CpG-1668, nicht im Menschen oder Affen verwenden. CpG-ODN Sequenzen, welche das Immunsystem von Menschen und Affen stimulieren können, sind von Hartmann *et al.* (2000) veröffentlicht worden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur zukunftssträchtigen Immuntherapie mit CpG-ODN gegen infektiöse Erreger, werden von den neusten Veröffentlichungen von Pyles *et al.* (2002) und Sethi *et al.* (2002) untermauert. Pyles *et al.* (2002) zeigten im Herpes simplex virus-2 (HSV-2) Modell in der Maus, dass die CpG-ODN Behandlung in der akuten Phase der HSV-2 Infektion die Anzahl der Tiere, die Krankheitssymptome entwickelten und starben, signifikant reduzierte. Pyles *et al.* (2002) zeigten außerdem, dass CpG-ODN keine direkte antivirale Aktivität hatte, sondern eine starke Th1-dominierte Immunantwort induzierte. Die Verlängerung der Lebenserwartungen von Mäusen durch den immuntherapeutischen Einsatz von CpG-ODN wurde von Sethi *et al.* (2002) im Prionen-Modell gezeigt.

Für die Wirkung der CpG-ODN auf molekularer Ebene sind zwei verschiedene Mechanismen beschrieben. CpG-ODN wirken hauptsächlich auf antigenpräsentierende Zellen. Zum einen verstärken die CpG-ODN die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der APC (Sparwasser *et al.*, 1998 + 2000; Jakob *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Die APC können dadurch die T-Helferzell- oder CTL-Antwort effizient stimulieren. Zum anderen zeigen neuste Daten von Pasare und Medhitov

(2003), dass CpG-ODN den suppressiven Effekt von regulatorischen T-Zellen ($CD4^+ CD25^+$ -T-Zellen, T_R) blockieren können (Abbildung 39). Die IL-6 Produktion von APC nach einer CpG-ODN Stimulation verhindert dabei die Funktion der T_R auf CTLs. Durch die Blockierung der T_R -Funktion kommt es zu einer verbesserten Virus-spezifischen CTL-Antwort. Iwashiro et al. (2001) zeigten, dass eine FV-Infektion die Anzahl an T_R erhöhen kann und das diese Zellen die Funktion von $CD8^+$ -Zellen hemmen. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurde die T_R -Funktionen vermutlich durch die CpG-1668 Behandlung in FV-infizierten Mäusen blockiert, wodurch es zu einer Verbesserung der FV-spezifischen CTL-Antwort kam.



T_R = regulatorische T-Helferzelle
 $TGF\beta$ = "transforming growth factor- β "

Abbildung 39: Schematische Darstellung des indirekten Einflusses von CpG-ODN auf regulatorische T-Zellen

Nachdem verschiedene Arbeitsgruppen berichteten, dass sie CpG-ODN erfolgreich in Tumormodellen eingesetzt haben (Ballas *et al.*, 2001; Heckelsmiller *et al.*, 2002), wurde der Frage nachgegangen, ob mit CpG-1668 die FV-induzierte Erythroleukämie therapiert werden kann. Eine Leukämie entsteht 4 Wochen nach Infektion in FV-suszeptiblen Mäusen. Zur Untersuchung wurden Mäuse nach Entstehung der Erythroleukämie mit CpG-ODN behandelt und der Krankheitsverlauf durch Palpation verfolgt. Es zeigte sich, dass die CpG-ODN Behandlung zu einer Reduktion der Milzgröße und der Anzahl an leukämischen Zellen in der Milz führte. Eine vollständige Eliminierung des Tumors bis zum Zeitpunkt 8 oder 9 Wochen nach Infektion konnte mit der verwendeten CpG-ODN Sequenz (CpG-1668) allerdings nicht nachgewiesen werden. Neuste Publikationen aus der Tumorforschung zeigen, dass der Erfolg einer

CpG-ODN Tumorthherapie von der Beschaffenheit des Tumors abhängig ist (Krieg, 2002). Dabei spielt die Art der ODN-Applikation eine entscheidende Rolle (Hecksmiller *et al.*, 2002). So zeigten Hecksmiller *et al.* (2002) im Colonkarzinom-Mausmodell (C26 Zellen), dass die Injektion von CpG-ODN direkt in den Tumor zu einer Eliminierung des Tumors führte, während eine i.p. Applikation der CpG-ODN ohne Wirkung auf den Tumor blieb. Außerdem wird seit der Veröffentlichung von Ballas *et al.* (2001) immer deutlicher, dass die chemische Modifikation der ODN und die flankierenden Sequenzen der ODN-Sequenz unterschiedliche Ergebnisse in der Tumorthherapie bewirkt. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten der Therapie einer FV-induzierten Leukämie mit CpG-ODN und die neusten Erkenntnisse der CpG-Therapie in anderen Tumormodellen, könnten es in Zukunft ermöglichen eine effektivere Therapie gegen Virus-induzierte Leukämien aufzubauen.

Die Daten dieser Arbeit zeigten zusammenfassend, dass die Immuntherapie mit CpG-ODN in der akuten Phase der FV-Infektion die Virus-spezifische zelluläre Immunantwort signifikant erhöht und so vor einer Retrovirus-induzierten Erkrankung schützen konnte. Außerdem zeigte die Leukämie-therapie mit CpG-ODN erste erfolgreiche Ergebnisse. Da CpG-ODN eine Virus-spezifische Th1-dominierte Immunantwort verstärken können, ist die CpG-ODN Therapie erfolgversprechend für die Bekämpfung einer Vielzahl von Virusinfektionen.

5.2. Verwendung von CpG-ODN als Adjuvants bei der transkutanen Immunisierung

Entwicklung von Vakzinen gegen Viren, vor allem gegen Retroviren wie HIV, ist nach wie vor ein wichtiges Ziel der biomedizinischen Forschung. Neben dem Ziel einen effektiven Impfstoff zu entwickeln ist es aber auch wichtig günstige und einfach zu applizierende Vakzinen zu haben. Die meisten Vakzinen müssen bis jetzt jedoch noch mittels einer Nadelinjektion appliziert werden, was vor allem in den Entwicklungsländern ein Problem darstellen kann (Abschnitt 1.9). Hinzukommt, dass die Applikation von Totimpfstoffen über eine Nadelinjektion nur eine humorale, aber keine zelluläre Immunantwort induziert (Chen *et al.*, 2001). Die zelluläre Immunantwort spielt jedoch bei der Abwehr vieler Viren eine wichtige Rolle (Ramshaw *et al.*, 1997). Die transkutane Immunisierung stellt dabei eine neue zukunftssträchtige Vakzinierungsmöglichkeit da.

Bei der transkutanen Immunisierung wird das Vakzinegemisch, welches aus Cholera Toxin, CpG-ODN und Virus-Peptide(n) besteht, auf die Haut aufgetragen und induziert eine starke humorale sowie zelluläre Immunantwort (Chen *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2001, Breignon *et al.*, 2002). Die starke zelluläre Immunantwort wird durch die Aufnahme der Viruspeptide in das Zytosol von Langerhanszellen vermittelt, wodurch die Viruspeptide über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden können (Chen *et al.*, 2001).

Anhand dieser Ergebnisse sollte nun in dieser Arbeit geprüft werden, ob sich Mäuse nach einer transkutanen Immunisierung mit FV-Peptiden vor einer FV-Infektion schützen lassen. Dazu wurden FV-suszeptible Mäuse vor einer FV-Belastungsinfektion zwei mal mit FV-spezifischen T-Helferzell und CTL-Peptiden transkutan immunisiert. Diese Immunisierung schützte die Tiere vor einer FV-vermittelten Leukämie (Abb. 35), dennoch konnte kein Schutz vor einer persistierenden FV-Infektion durch die Vakzine induziert werden. Die Anzahl an FV-spezifischen CD8⁺-Zellen wurde durch die transkutane Immunisierung signifikant erhöht, wodurch vermutlich die Virusvermehrung kontrolliert wird. Anders als von Breignon *et al.* (2002) in ihrem Influenzamodelle in der Maus gezeigt, konnte trotz der Verwendung von virus-spezifischen T-Helferzell-Peptiden keine signifikante Erhöhung von virus-spezifischen CD4⁺-Zellen festgestellt werden. Die zwei beschriebenen FV T-Helferzell-Epitope sind möglicherweise nicht immundominant, so dass durch die Peptide keine messbare Virus-spezifische CD4⁺-Zellantwort induziert wurde. Da in der FV-Vakzinestudie nur CD8- und CD4-T-Zellepitope verwendet wurden, konnten erwartungsgemäß keine neutralisierenden FV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Für das FV wurde bis jetzt kein B-Zell-Epitop beschrieben. Das B-Zellen nicht nur wichtig für die Kontrolle der FV-Infektion sind (Dittmer *et al.*, 1999; Hasenkrug *et al.*, 1995), sondern auch für den Aufbau einer effektiven Vakzine, wurde in dem Friend Virus Modell bereits gezeigt. Für die Entwicklung einer effektiven Vakzine gegen Retroviren wäre es daher wichtig auch die humorale Immunantwort zu induzieren. Daher wäre zu untersuchen, ob sich DNA-Vakzinen, welche komplette Strukturproteingene des Virus tragen, für eine transkutane Immunisierung verwenden lassen. Mit Hilfe solcher Konstrukte könnte vermutlich eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Virus induziert werden, die den Impfschutz verbessern sollte.

6. Literatur

Abbas, A.K., Murphy, K.M. und Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. **383**:787-793.

Agrawal, S. und Kandimalla, E.R. (2002). Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trends Mol Med*. **8**:114-121.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J. und Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. **274**:94-96.

Ancelle, R., Bletry, O., Baglin, A.C., Brun-Vezinet, F., Rey, M.A. und Godeau, P. (1987). Long incubation period for HIV-2 infection. *Lancet*. **1**:688-689.

Ballas, Z.K., Krieg, A.M., Warren, T., Rasmussen, W., Davis, H.L., Waldschmidt, M. und Weiner, G.J. (2001). Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol*. **167**:4878-4886.

Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L. und Krieg, A.M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol*. **157**:1840-1845.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautquet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. und Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. **220**:868-871.

Beignon, A.S., Briand, J.P., Muller, S. und Partidos, C.D. (2002). Immunization onto bare skin with synthetic peptides: immunomodulation with a CpG-containing oligodeoxynucleotide and effective priming of influenza virus-specific CD4⁺ T cells. *Immunology*. **105**:204-212.

Bird, A.P. (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res*. **8**:1499-1504.

Branda, R.F., Moore, A.L., Mathews, L., McCormack, J.J. und Zon, G. (1993). Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1. *Biochem Pharmacol*. **45**:2037-2043.

Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Montagnier, L., Chamaret, S., Gruest, J., Barre-Sinoussi, F., Geroldi, D., Chermann, J.C., McCormick, J., Mitchell, S., et al. (1984). Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science*. **226**:453-456.

Chen, D., Endres, R.L., Erickson, C.A., Weis, K.F., McGregor, M.W., Kawaoka, Y. und Payne, L.G. (2000). Epidermal immunization by a needle-free powder delivery technology: immunogenicity of influenza vaccine and protection in mice. *Nat Med*. **6**:1187-1190.

Chen, D., Weis, K.F., Chu, Q., Erickson, C., Endres, R., Lively, C.R., Osorio, J. und Payne, L.G. (2001). Epidermal powder immunization induces both cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses to protein antigens of influenza and hepatitis B viruses. *J Virol.* **75**:11630-11640.

Chen, W., Qin, H., Chesebro, B. und Cheever, M.A. (1996). Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. *J Virol.* **70**:7773-7782.

Chesebro, B., Britt, W., Evans, L., Wehrly, K., Nishio, J. und Cloyd, M. (1983). Characterization of monoclonal antibodies reactive with murine leukemia viruses: use in analysis of strains of Friend MCF and Friend ecotropic murine leukemia virus. *Virology* **127**:134-148

Chesebro, B., Miyazawa, M. und Britt, W.J. (1990). Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu Rev Immunol.* **8**:477-499.

Chesebro, B., Wehrly, K., Cloyd, M., Britt, W., Portis, J., Collins, J. und Nishio, J. (1981). Characterization of mouse monoclonal antibodies specific for Friend murine leukemia virus-induced erythroleukemia cells: friend-specific and FMR-specific antigens. *Virology.* **112**:131-144.

Chesnut, R.W. und Grey, H.M. (1986). Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. *Adv Immunol.* **39**:51-94.

Chuang, T.H., Lee, J., Kline, L., Mathison, J.C. und Ulevitch, R.J. (2002). Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J Leukoc Biol.* **271**:538-44.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* **233**:343-346.

Coffin, J.M. (1992). Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* **176**:143-164.

Coffin, J.M., Hughes, S. und Varmus, H. (1997). *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Cowdery, J.S., Chace, J.H., Yi, A.K. und Krieg, A.M. (1996). Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol.* **156**:4570-4575.

Cunningham, J.M. (1992). Cellular Entry by murine Retroviruses. *Semin. Virol.* **3**:85-89.

D'Andrea, A.D. (1992). The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv.* **15**:19-36.

Davis, H.L., Suparto, I., Weeratna, R., Jumintarto, Iskandriati, D., Chamzah, S., Ma'ruf, A., Nente, C., Pawitri, D., Krieg, A.M., Heriyanto, Smits, W. und Sajuthi, D.D. (2000). CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine*. **18**:1920-1924.

Davis, H.L., Weeratna, R., Waldschmidt, T.J., Tygrett, L., Schorr, J. und 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.

Dittmer, U. und Hasenkrug, K.J. (2001). Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections. *Curr Mol Med*. **1**:431-436.

Dittmer, U., Brooks, D.M. und Hasenkrug, K.J. (1999). Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection. *Nat Med*. **5**:189-193.

Dittmer, U., Race, B. und Hasenkrug, K.J. (1999). Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus. *J Virol*. **73**:8435-8440.

Dittmer, U., Race, B., Peterson, K.E., Stromnes, I.M., Messer, R.J. und Hasenkrug, K.J. (2002). Essential roles for CD8+ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression. *J Virol*. **76**:450-454.

Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F. Jr., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. und Paul, W.E. (1990). Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*. **8**:303-833.

Friend, C. (1957). Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* **105**:307.

Gallo, R.C. (1986). HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS. *Med Oncol Tumor Pharmacother*. **3**:265-267.

Greaves, M.F., Owe, J.J.T. und Raff, M.C. (1973). T and B Lymphocytes: Origins, properties and Poles in Immune Response. *Experpta Medica*, Amsterdam.

Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G.B. und 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.

Han, J., Hsu, C., Zhu, Z., Longshore, J.W. und Finley, W.H. (1994). Overrepresentation of the disease associated (CAG) and (CGG) repeats in the human genome. *Nucleic Acids Res*. **22**:1735-1740.

Harandi, A.M., Eriksson, K. und Holmgren, J. (2003). A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J Virol*. **77**:953-962.

Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S.A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R.P., El-beik, T., Feinberg, M.B., Buchbinder, S.P. und Walker, B.D. (1996). Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J Immunol.* **156**:2616-2623.

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. und Krieg, A.M. (2000). Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo *J. Immunol.* **164**:1617-1624.

Hasenkrug, K.J. und Chesebro, B. (1997). Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:7811-7816.

Hasenkrug, K.J., Brooks, D.M. und Chesebro, B. (1995). Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:10492-10495.

Hasenkrug, K.J., Brooks, D.M. und Dittmer, U. (1998a). Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *J Virol.* **72**:6559-6564.

Hasenkrug, K.J., Brooks, D.M., Robertson, M.N., Srinivas, R.V. und Chesebro, B. (1998b). Immunoprotective determinants in friend murine leukemia virus envelope protein. *Virology.* **248**:66-73.

Heckelsmiller, K., Rall, K., Beck, S., Schlamp, A., Seiderer, J., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Rothenfusser, S., Endres, S. und Hartmann, G. (2002). Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol.* **169**:3892-3899.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. und Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* **408**:740-745.

Hoatlin, M.E., und Kabat, D. (1995). Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol.* **3**:51-57.

Hunter, E. und Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* **157**:187-253.

Iwashiro, M., Messer, R.J., Peterson, K.E., Stromnes, I.M., Sugie, T. und Hasenkrug, K.J. (2001). Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:9226-9230.

Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C. und Vogel, J. C. (1998). Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* **161**:3042-3049.

- Kabat, D.** (1989). Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr Top Microbiol Immunol.* **148**:1-42.
- Karlin, S., Doerfler, W. und Cardon, L.R.** (1994). Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses? *J Virol.* **68**:2889-2897.
- Kline, J.N., Kitagaki, K., Businga, T.R. und Jain, V.V.** (2002). Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **283**:L170-179.
- Kline, J.N., Waldschmidt, T.J., Businga, T.R., Lemish, J.E., Weinstock, J.V., Thorne, P.S. und Krieg, A.M.** (1998). Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol.* **160**:2555-2559.
- Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J. und Krieg, A.M.** (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:2879-2883.
- Kobayashi, H., Horner, A.A., Takabayashi, K., Nguyen, M.D., Huang, E., Cinman, N. und Raz, E.** (1999). Immunostimulatory DNA pre-priming: a novel approach for prolonged Th1-biased immunity. *Cell Immunol.* **198**:69-75.
- Kong, L.I., Lee, S.W., Kappes, J.C., Parkin, J.S., Decker, D., Hoxie, J.A., Hahn, B.H. und Shaw, G.M.** (1988). West African HIV-2-related human retrovirus with attenuated cytopathicity. *Science.* **240**:1525-1529.
- Kost, T.A., Koury, M.J. und Krantz, S.B.** (1981). Mature erythroid burst-forming units are target cells for Friend virus-induced erythroid bursts. *Virology.* **108**:309-317.
- Krieg, A.M.** (1996). An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med.* **128**:128-133.
- Krieg, A.M.** (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* **20**:709-760.
- Krieg, A.M., Gause, W.C., Gourley, M.F. und Steinberg, A.D.** (1989). A role for endogenous retroviral sequences in the regulation of lymphocyte activation. *J Immunol.* **143**:2448-2451.
- Krieg, A.M., Hartmann, G. und Yi, A.K.** (2000). Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol.* **247**:1-21.
- Krieg, A.M., Love-Homan, L., Yi, A.K. und Harty, J.T.** (1998a). CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol.* **161**:2428-2434.
- Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D. und Davis, H.L.** (1998b). Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:12631-12636.

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

Kuramoto, E., Yano, O., Kimura, Y., Baba, M., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T. und Tokunaga, T. (1992). Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn J Cancer Res.* **83**:1128-1131.

Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M. und Oshiro, L.S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* **225**:840-842.

Liang, B., Wang, J.Y. und Watson, R.R. (1996). Murine AIDS, a key to understanding retrovirus-induced immunodeficiency. *Viral Immunol.* **9**:225-239.

Lipford, G.B., Sparwasser, T., Bauer, M., Zimmermann, S., Koch, E.S., Heeg, K. und Wagner, H. (1997). Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol.* **27**:3420-3426.

Lipford, G.B., Sparwasser, T., Zimmermann, S., Heeg, K., und Wagner, H. (2000). CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol.* **165**:1228-35.

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

Macfarlane, D.E., und Manzel, L. (1998). Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol.* **160**:1122-1131.

Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O'Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G.B., Vabulas, R.M. und Wagner, H. (2002). CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol.* **32**:2356-2364.

Messina, J.P., Gilkeson, G.S. und Pisetsky, D.S. (1991). Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol.* **147**:1759-1764.

Messina, J.P., Gilkeson, G.S. und Pisetsky, D.S. (1993). The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens. *Cell Immunol.* **147**:148-157.

Miyazawa, M., Fujisawa, R., Ishihara, C., Takei, Y.A., Shimizu, T., Uenishi, H., Yamagishi, H. und Kuribayashi, K. (1995). Immunization with a single T helper cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukemia development. *J Immunol.* **155**:748-758.

Miyazawa, M., Nishio, J. und Chesebro, B. (1988). Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukemia virus envelope antigen. Identification of class II loci of the H-2 as immune response genes. *J Exp Med.* **168**:1587-1605.

Moloney, J.B. (1960). Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sacroma 537 I. Origin and introductory investigations. *J Natl Cancer Inst* **24**:933.

Mosmann, T.R. und Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* **7**:145-173.

Parnes, J.R. (1989). Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol.* **44**:265-311.

Pasare, C. und Medzhitov, R. (2003). Toll Pathway-Dependent Blockade of CD4⁺ CD25⁺ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells. *Science.* **299**:1033-1036.

Peterson, K.E., Iwashiro, M., Hasenkrug, K.J. und Chesebro, B. (2000). Major histocompatibility complex class I gene controls the generation of gamma interferon-producing CD4(+) and CD8(+) T cells important for recovery from friend retrovirus-induced leukemia. *J Virol.* **74**:5363-5367.

Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. und Gallo, R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* **224**:497-500.

Pyles, R.B., Higgins, D., Chalk, C., Zalar, A., Eiden, J., Brown, C., Van Nest, G. und Stanberry, L.R. (2002). Use of immunostimulatory sequence-containing oligonucleotides as topical therapy for genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol.* **76**:11387-11396.

Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J., Karupiah, G., Rolph, M.S., Mahalingam, S. und Ruby, J.C. (1997). Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev.* **159**:119-135.

Rankin, R., Pontarollo, R., Ioannou, X., Krieg, A.M., Hecker, R., Babiuk, L.A. und van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2001). CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **11**:333-340.

Rauscher, F. (1962). A virus-induced disease of mice characterized by erythropoiesis and lymphoid leukemia. *J Natl Cancer Inst* **192**:515-543.

Robertson, M.N., Miyazawa, M., Mori, S., Caughey, B., Evans, L.H., Hayes, S.F. und Chesebro, B. (1991). Production of monoclonal antibodies reactive with a denatured form of the Friend murin leukemia virus gp70 envelope protein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and western blotting. *J.Virol. Methodes* **34**:255-271.

Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalam, S.A. und Walker, B.D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science.* **278**:1447-1450.

Rous P. (1911). A sacroma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* **13**: 397-399.

- Ruscetti, S.K.** (1995). Erythroleukaemia induction by the Friend spleen focus-forming virus. *Baillieres Clin. Haematol.* **8**:225-247.
- Seder, R.A. und Paul, W.E.** (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol.* **12**:635-673.
- Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H. und Kretzschmar, H.** (2002). Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet.* **360**:229-230.
- Shpaer, E.G. und Mullins, J.I.** (1990). Selection against CpG dinucleotides in lentiviral genes: a possible role of methylation in regulation of viral expression. *Nucleic Acids Res.* **18**:5793-5797.
- Sourvinos, G., Tsatsanis, C. und Spandidos, D.A.** (2000). Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia. Biol. (Praha)* **46**:226-232.
- Sparwasser, T. und Lipford, G.B.** (2000). Consequences of bacterial CpG DNA-driven activation of antigen-presenting cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* **247**:59-75.
- Sparwasser, T., Hultner, L., Koch, E.S., Luz, A., Lipford, G.B., und Wagner, H.** (1999). Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J Immunol.* **162**:2368-2374.
- Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W. und Wagner, H.** (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells *Eur. J. Immunol.* **28**:2045-2054.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K. und Wagner, H.** (1997a). Bacterial DNA causes septic shock. *Nature.* **386**:336-337.
- Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K. und Wagner, H.** (1997b). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. *Eur J Immunol.* **27**:1671-1679.
- Spring, M., Stahl-Hennig, C., Stolte, N., Bischofberger, N., Heeney, J., ten Haaf, P., Tenner-Racz, K., Racz, P., Lorenzen, D., Hunsmann, G. und Dittmer, U.** (2001). Enhanced cellular immune response and reduced CD8(+) lymphocyte apoptosis in acutely SIV-infected Rhesus macaques after short-term antiretroviral treatment. *Virology.* **279**:221-232.
- Stacey, K.J., Sweet, M.J. und Hume, D.A.** (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol.* **157**:2116-2122.
- Stoye, J.P.** (1998). Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Rev. Sci. Tech.* **17**:269-277.

Stromnes, I.M., Dittmer, U., Schumacher, T.N., Schepers, K., Messer, R.J., Evans, L.H., Peterson, K.E., Race, B. und Hasenkrug, K.J. (2002). Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of Friend retrovirus infection in mice. *J Virol.* **76**:2225-2232.

Sun, S., Beard, C., Jaenisch, R., Jones, P. und Sprent, J. (1997). Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J Immunol.* **159**:3119-3125.

Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., et al. (1984). Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physico-chemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* **72**:955-962.

Tokunaga, T., Yano, O., Kuramoto, E., Kimura, Y., Yamamoto, T., Kataoka, T. und Yamamoto, S. (1992). Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol.* **36**:55-66.

Toyoshima, K. und Vogt, P.K. (1969). Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology.* **38**:414-426.

Wild, J.S. und Sur, S. (2001). CpG oligonucleotide modulation of allergic inflammation. *Allergy.* **56**:365-376.

Yamamoto, S., Kuramoto, E., Shimada, S. und Tokunaga, T. (1988). In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res.* **79**:866-873.

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

Yi, A.K., Klinman, D.M., Martin, T.L., Matson, S. und 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.

Zimmermann, S., Egeter, O., Hausmann, S., Lipford, G.B., Rocken, M., Wagner, H. und Heeg, K. (1998). CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol.* **160**:3627-3630.

7. Anhang

7.1. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wird zum ersten Mal der therapeutische Einsatz von immunstimulativer DNA mit CpG-Motiv (CpG-ODN) bei einer akuten Virusinfektion beschrieben. Als experimentelles Modell wurde das Friend Virus (FV), ein muriner Retroviruskomplex, verwendet. Das FV kann in Mäusen eine tödlich verlaufende Erythroleukämie induzieren. Durch die Immuntherapie mit CpG-ODN in der akuten Phase einer FV-Infektion konnten 74% der Mäuse vor der Entstehung der Virus-induzierten Leukämie geschützt werden. Dieser Schutz ging einher mit der Reduktion der Viruslast im Blut und in der Milz der Tiere und wurde durch CpG-ODN induzierte FV-spezifische CD8⁺-Zellen vermittelt. FV-neutralisierende Antikörper und natürliche Killerzellen waren dagegen am CpG-ODN induzierten Schutz nicht beteiligt.

Der Einsatz von CpG-ODN als Paraimmunisierung (unspezifische Immunisierung vor einer Infektion) verursachte hingegen einen schwereren FV-induzierten Leukämieverlauf als in infizierten Mäusen ohne vorherige Behandlung. Die prophylaktische CpG-ODN Gabe führte sogar dazu, dass FV-resistente Mäuse empfänglich für eine FV-vermittelte Leukämie wurden. Der negative Effekt der prophylaktischen ODN-Behandlung wurde durch die CpG-ODN induzierte Proliferation der wichtigsten Zielzellen des FV (Ter119⁺- Erythrozytenvorläuferzellen und B-Zellen) verursacht. Durch die Stimulierung dieser Zellen konnte das Virus schneller replizieren, so dass das Immunsystem der Mäuse nicht mehr in der Lage war das Virus zu kontrollieren.

Untersuchungen zum therapeutischen Einsatz von CpG-ODN in der späten, leukämischen Phase der Infektion zeigten, dass sich CpG-ODN auch für die Bekämpfung von FV-induzierten Tumorzellen einsetzen lassen.

Das die CpG-ODN Behandlung von viralen Infektionen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Die CpG-ODN Behandlung stellte einerseits eine effektive Immuntherapie gegen die FV-induzierte Erkrankung dar, andererseits konnte sie die Viruserkrankung auch verstärken. Essentiell für den Erfolg der ODN-Behandlung war der richtige Behandlungszeitpunkt nach Infektion. Da viele Virusinfektionen durch eine CD8⁺ CTL-Aktivität kontrolliert werden und CpG-ODN Virus-spezifische CTL Antworten verstärken, ist

der Einsatz von CpG-ODN für Behandlungen von Virusinfektionen im allgemeinen sehr interessant.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine transkutane Vakzinierung (Impfung über die Haut) gegen Retrovirus-induzierte Erkrankungen etabliert werden. CpG-ODN dienten dabei als starkes Adjuvants zur Induktion einer zellulären Immunantwort. Für die Impfung wurden FV-spezifische T-Zell-Epitope (CTL- und T-Helferzell-Peptide) als Antigene eingesetzt. Die transkutane Immunisierung schützte Mäuse vor einer FV-induzierten Leukämie. Der durch die Vakzine vermittelte Schutz reichte jedoch nicht aus, um eine persistierende Infektion mit FV zu verhindern. Die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen zeigten, dass der Impfschutz von FV-spezifischen CD8⁺-Zellen vermittelt wurde. Die Studie belegt, daß eine nicht invasive Impfung durchaus in der Lage ist, einen Schutz gegen eine Retrovirus-induzierte Erkrankung zu vermitteln.

7.2. Summary

In this study immunostimulatory DNA containing unmethylated CpG motifs (CpG-ODN) was described as a new therapeutic approach against an acute virus infection. Friend virus (FV), a murine retrovirus complex, was used as experimental model. This virus can induce a lethal erythroleukemia in mice. The CpG-ODN therapy increased recovery from FV-induced leukemia from 6% in the control group to 74% in the CpG-treated group. CpG-mediated recovery was associated with a significant reduction of viral loads in the blood and spleens of treated mice compared to those of control animals. The treatment promoted Th1-type cytokine production by splenocytes of FV-infected mice and augmented FV-specific cytotoxic T-cell responses but no influence on the virus-specific neutralizing antibody response or NK-cells were observed. FV-specific CD8⁺ T-cells were critical for effective treatment with CpG-ODN, since *in vivo* depletion of these cells from treated mice prevented their recovery.

In stark contrast to the success of post-exposure treatments CpG-treatment of susceptible mice prior to FV-infection accelerated the development of virus-induced erythroleukemia. Furthermore, 70,8% of mice that are resistant to FV-induced leukemia developed disease after inoculation of CpG-ODN before infection. The CpG pre-

treatment of these mice enhanced viral loads in their spleens and blood compared to controls that received ODN without CpG motifs. The main target cells of Friend virus, erythroid precursor cells and B-cells, proliferated after CpG-ODN inoculation and provided an enlarged target population for viral infection. These findings demonstrate that CpG-ODN treatment of viral infections may be a double-edged swart that can result in an effective therapy but also in an acceleration of disease progression depending on the time point of treatment.

Taken together, CpG-ODN therapy can significantly enhance virus-specific cellular immune responses and prevent retrovirus-induced disease, when given after virus infection. These findings may have implications for antiviral therapy in general. In addition, successful CpG-treatment of mice with fully established, FV-induced erythro-leukemia implies that CpG-ODN are also interesting molecules for the therapy of virus-induced cancers.

The goal of the second part of this work was to establish a transcutan immunisation against retrovirus-induced disease. Here CpG-ODN were used as a strong adjuvants to induce a cellular immune response. As antigenes FV-specific T-cell epitops (CTL- and T-helper-cell-peptides) were utilized. The transcutan immunisation protected mice against FV-induced erythro-leukemia. However, the vaccines were not protected from persistent FV infection. FV-specific CD8⁺ T-cells were induced by the transcutan immunisation. These findings demonstrate the potential of the bare skin immunisation (a non-invasive route) against retroviral infections.

7.3 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
μ	Mikro
α	anti
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AIDS	"acquired immunodeficiency syndrom"
AK	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen
APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
APS	Ammoniumpersulfat
bzw.	beziehungsweise
CD	Lymphozytendifferenzierungsgruppe
CpG-ODN	Oligodesoxynukleotide mit CpG-Motiv
CTL	zytotoxische T-Zellen
CyChr	Cy-Chrome
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	"Enzyme-linked Immunosorbent Assay"
Env	Hüllprotein
FACS	"fluorescence activated cell scanner" (Durchflußzytometer)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F-MuLV	"Friend murine leukemia virus"
FV	Friend Virus
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAART	"highly active antiretrovirale therapy"
HIV-1	"Human immunodeficiency virus typ 1"
HIV-2	"Human immunodeficiency virus typ 2"

Abkürzung	Bedeutung
HRP	Horse Radish Peroxidase
HTLV-1	"Human T-cell leukemia virus-1"
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MuLV	Murines Leukämievirus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotid
OPD	o-Phenylenediamine
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PE	Phycoerythrin
pH	$-\log [H^+]$
PMA	Phorbol-12-Myristate 13-Acetate
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SFFU	"Spleen focus forming units"
SIV	"Simian immunodeficiency virus"
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
T _R	regulatorische T-Zellen
U	Units
Y.10A-Mäuse	(B.10xA.BY)F1-Generation
Y.10-Mäuse	(B10xA.BY)F1-Generation

7.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aufbau von Typ-C Retroviren bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV	4
Abb. 2:	Genomorganisation von einfachen und komplexen Retroviren	5
Abb. 3:	Zeitlicher Verlauf der Viruslast und der Immunantwort nach einer FV-Infektion	13
Abb. 4:	Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splenomegalie nach FV-Infektion (Hasenkrug <i>et al.</i> , 1998)	14
Abb. 5:	Schematische Darstellung des FV-induzierten Krankheitsverlaufs in FV-suszeptiblen Mäusen	15
Abb. 6:	Aufbau der Kernsequenz von CpG-ODN (Krieg <i>et al.</i> , 2000)	19
Abb. 7:	Schematische Darstellung von CpG-ODN Effekten auf Zellen des Immunsystems (Agrawal und Kandimalla, 2002)	20
Abb. 8:	Schematische Darstellung des CpG-DNA Signaltransduktionsweges (Wild und Sur, 2001)	23
Abb. 9:	Schematische Darstellung des adoptiven Transfers von Milzzellen	39
Abb. 10:	Versuchsablauf der ODN-Applikation in naiven Mäusen	51
Abb. 11:	Gesamtzellzahl einzelner Zellpopulationen der Milz nach ODN-Injektion	53
Abb. 12:	Prozentualer Anteil an aktivierten Milzzellen nach CpG-ODN Gabe	53
Abb. 13:	Versuchsablauf der prophylaktischen CpG-ODN Gabe vor FV-Infektion suszeptibler Mäuse	54
Abb. 14:	FV-induzierter Krankheitsverlauf in FV-resistenten Mäusen nach prophylaktischer ODN-Behandlung	56
Abb. 15:	Durchflußzytometrische Analyse der Erythrozytenvorläuferzellen in FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung	57
Abb. 16:	Anzahl FV-infektöser Zellen in der Milz von FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung	58
Abb. 17:	Prozentzahl FV-infizierter Zellen im Blut von FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung	59
Abb. 18:	Anzahl infizierter Zellen einzelner Zellpopulationen der Milz von FV-infizierten Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Behandlung	60
Abb. 19:	Versuchsaufbau der CpG-ODN Therapie in akut FV-infizierten suszeptiblen Mäusen	61
Abb. 20:	Krankheitsverlauf von FV-infizierten, CpG-ODN therapierten Mäusen	62
Abb. 21:	Schwere der Splenomegalie von individuellen FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen	63
Abb. 22:	Viruslast in der Milz und im Blut von FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen	64

Abb. 23:	FV-neutralisierender Antikörpertiter von FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen	66
Abb. 24:	FV-bindende Antikörpertiter von FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen	67
Abb. 25:	Zytokinproduktion auf mRNA-Ebene von Milzzellen aus FV-infizierten, CpG-ODN behandelten Mäusen	68
Abb. 26:	IFN γ -Produktion auf Proteinebene von CpG-ODN therapierten, FV-infizierten Mäusen	69
Abb. 27:	Anzahl Virus-spezifischer IFN γ -produzierender Milzzellen von CpG-ODN therapierten, FV-infizierten Mäusen	70
Abb. 28:	Quantifizierung FV-spezifischer CD8 $^+$ -Zellen von CpG-ODN therapierten, FV-infizierten Mäusen	71
Abb. 29:	Versuchsablauf der CpG-ODN Therapie mit gleichzeitiger CD8 $^+$ - bzw. NK $^+$ -Zell-Depletion	72
Abb. 30:	Schwere der Splenomegalie bei CpG-ODN behandelten, FV-infizierten Mäusen nach NK $^+$ - bzw. CD8 $^+$ -Zelldepletion	73
Abb. 31:	Krankheitsverlauf von FV-infizierten, CpG-ODN therapierten Mäusen über 14 Monate	74
Abb. 32:	Versuchsaufbau der Leukämietherapie mit CpG-ODN	75
Abb. 33:	Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz nach Leukämietherapie mit CpG-ODN	77
Abb. 34:	Versuchsablauf der transkutanen Immunisierung	78
Abb. 35:	FV-induzierter Krankheitsverlauf in transkutan immunisierten Mäusen nach Belastungsinfektion	79
Abb. 36:	Viruslast in der Milz und im Blut von immunisierten, FV-belasteten Mäusen	80
Abb. 37:	Versuchsaufbau eines Zelltransferexperiments zum Nachweis von Virus-spezifischen T-Zellen	82
Abb. 38:	Nachweis von Virus-spezifischen T-Zellen in einem Zelltransferexperiment	83
Abb. 39:	Schematische Darstellung des indirekten Einflusses von CpG-ODN auf regulatorische T-Zellen	89

7.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Taxonomie der <i>Retroviridae</i>	6
Tab. 2:	Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme	17
Tab. 3:	Puffer und Medien	30
Tab. 4:	Antikörper für die Durchflußzytometrie	32
Tab. 5:	sonstige Antikörper	33

Anhang

Tab. 6:	F-MuLV Peptide	34
Tab. 7:	CpG-ODN Sequenzen	34
Tab. 8:	Verwendung von Antikörpern für die Durchflußzytometrie	45
Tab. 9:	Milzgewichte von Mäusen nach CpG-ODN Injektion	52
Tab.10:	Milzgewichte von FV-suszeptiblen Mäusen nach prophylaktischer CpG-ODN Gabe und anschließender FV-Infektion	55
Tab.11:	Milzgewichte von Mäusen nach der CpG-ODN Leukämietherapie	76

7.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Würzburg, den

Anke Olbrich

7.7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am: 01.05.1974
Geburtsort: Hameln
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule, Hameln
1984-1986 Orientierungsstufe, Hameln
1986-1994 Albert-Einstein-Gymnasium, Hameln
06/1994 Abitur

Studium:

10/1994-09/1996 Studium der Biologie an der Technischen Universität
Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
09/1996 Abschluß: Vordiplomsprüfungen
10/1996-03/2000 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität
Göttingen mit Schwerpunkt: Mikrobiologie, Immunologie
und organische Chemie
10/1998 Diplomprüfung
11/1998-03/1999 Auslandspraktikum am Karolinska Institut, Stockholm
(Schweden), Institut für Onkologie und Pathologie (Prof.
Dr. Peter Biberfeld)
03/1999-03/2000 Diplomarbeit an der Georg-August-Universität
Göttingen, Abteilung Virologie
Thema der Arbeit: Untersuchung der Phosphorylierung
des großen Hepatitis B Virus Hüllproteins und Herstellung
sowie Charakterisierung einer Core-Gen-Mutante mit ab-
erranter Nukleokapsidumhüllung
03/2000 Abschluß: Diplom

Promotion:

ab 05/2000 Promotionsstudium an der Bayrischen Julius-Maximilians
Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbio-
logie (Prof. Dr. Ulf Dittmer)
Thema: Die Rolle von bakteriellen DNA-Sequenzen (CpG)
bei der Immuntherapie von retroviralen Infektionen

Würzburg, den

Anke Olbrich

7.8 Publikationsliste

Olbrich, A.R., Schimmer, S. und Dittmer, U. (2003). Pre-infection treatment of resistant mice with CpG oligodeoxynucleotides renders them susceptible to Friend retrovirus induced leukemia. *Manuskript eingereicht*

Olbrich, A.R., Schimmer, S., Heeg, K., Schepers, K., Schumacher, T.N. und Dittmer, U. (2002). Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs. *J Virol.* **76**:11397-11404.

Strestik, B.D., Olbrich, A.R., Hasenkrug, K.J. und Dittmer, U. (2001). The role of IL-5, IL-6 and IL-10 in primary and vaccine-primed immune responses to infection with Friend retrovirus (Murine leukemia virus). *J Gen Virol.* **82**:1349-1354.

Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulf Dittmer, der die Betreuung meiner Promotion übernommen hat und die Entwicklung der Arbeit stets mit großem Interesse verfolgt hat. Durch viele nützliche Anregungen und Hinweise hat er maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Ich danke PD. Dr. Ivaylo Gentshev für die Bereitschaft, die Zweitkorrektur zu übernehmen, und für sein Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen bedanke ich mich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern Ton Schumacher, Koen Schepers, Klaus Heeg und Kim Hasenkrug.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen (auch ehemaligen) Mitarbeitern der Labore 050-052 für die sehr gute und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Simone Schimmer für ihre praktischen und moralischen Unterstützungen. Mögen wir in Essen genauso viel Spaß im Labor haben wie in Würzburg.

Bei Catharina Jürgens möchte ich mich für die kritische Durchsicht der Arbeit bedanken.

Diese Arbeit wurde in den letzten zwei Jahren durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Dafür möchte ich mich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir mein Studium ermöglicht haben und auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich immer verlassen konnte.

Von ganzen Herzen möchte ich Christian Kraft danken, dass Du mich die letzten Wochen ertragen hast, für alle Geduld und Unterstützung, die Du mir gegeben hast- Danke!

