

Aus dem Zentrallabor der Stiftung Juliusspital  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg  
Chefarzt: Professor Dr. med. Tino F. Schwarz

---

**Wirkmechanismus neuartiger Adjuvantien bei einer  
Herpes-Virus-Vakzine:  
Welche Rolle spielen NK-Zellen?**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Philip Eisermann**  
aus Hagen

Würzburg, März 2012

Referent: Professor Dr. med. Tino F. Schwarz

Koreferent: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2013

Der Promovend ist Arzt

## **Experimenteller Teil**

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde von Mai 2008 bis März 2009 im Centre for Virus Research am Westmead Millennium Institute in Westmead, NSW, Australien unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Anthony Cunningham durchgeführt.

Frau Dr. Min Kim aus der HSV Immunopathogenesis Group betreute dort diese Arbeit.

## **Förderung des Projektes**

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Reisekostenstipendium des Boehringer Ingelheim Fonds und durch ein Auslandsstipendium für Abschlussarbeiten des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) gefördert.

## **Sprachkonvention**

Bei einigen im wissenschaftlichen Sprachgebrauch vorkommenden englischen Fachausdrücken wurde auf eine künstlich wirkende Übersetzung ins Deutsche verzichtet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Herpes-Simplex-Virus .....	1
1.1.1 Aufbau .....	1
1.1.2 HSV-Infektion .....	1
1.1.3 Die humane Immunantwort auf HSV .....	2
1.1.3.1 Glykoprotein D.....	3
1.2 Natürliche Killerzellen.....	4
1.3 Toll-like-Rezeptoren .....	6
1.3.1 TLR2.....	9
1.4 Perspektiven hinsichtlich einer Herpes-simplex-Vakzine .....	10
1.5 Adjuvantien.....	11
1.5.1 2,3-Dipalmitoyl-S-Glycerylcystein .....	12
1.5.2 MF59 und die Adjuvantien der AS-Reihe.....	13
1.6 Fragestellung.....	13
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Material.....	15
2.1.1 Pam24-4, Pam30-5 und Pam30-5-FITC .....	19
2.2 Methoden .....	20
2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	20
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	20

2.2.3	Einfrieren von Zellen.....	21
2.2.4	Auftauen von Zellen .....	21
2.2.5	Isolation von Monozyten .....	21
2.2.6	Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten.....	22
2.2.7	Isolation von natürlichen Killerzellen .....	22
2.2.7.1	NK Cell Isolation Kit .....	23
2.2.7.2	EasySep Human NK Cell Enrichment Kit.....	23
2.2.7.3	FACSVantage SE Cell Sorter .....	24
2.2.8	Bestimmung der NK-Zellreinheit.....	25
2.2.9	Inkubation mit Pam-Lipopeptiden.....	26
2.2.9.1	NK-Zellinkubation mit Pam24-4 .....	27
2.2.9.2	NK-Zellinkubation mit Pam30-5 .....	27
2.2.9.3	Inkubation von NK-Zellen und MDDCs mit Pam30-5-FITC.....	27
2.2.10	Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellen.....	28
2.2.10.1	CD69-, HLA-DR- und TLR2-Expression auf der Zelloberfläche ....	28
2.2.10.2	Intrazellulärer TLR2-Assay.....	28
2.2.11	PCR.....	29
2.2.11.1	RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-PCR.....	29
2.2.11.2	Quantitative Real-Time-PCR .....	30
2.2.12	Konfokale Mikroskopie .....	30
2.2.12.1	Zellfixation .....	31
2.2.12.2	Cytospinning .....	31
2.2.12.3	Zellfärbung .....	31
2.2.13	Statistische Auswertung .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Expression von TLR2 und HLA-DR auf NK-Zellen nach Pam24-4-Stimulation .....	33
3.2	Intrazelluläre TLR2-Expression nach Pam24-4- und Pam30-5-Stimulation...	35
3.3	Expression von CD69 auf NK-Zellen nach Pam24-4-Stimulation.....	38
3.4	TLR2- und HLA-DR-Expression auf CD56 <sup>bright</sup> - und CD56 <sup>dim</sup> -NK-Zellen....	39
3.5	Aufnahme von Pam30-5 in die NK-Zelle.....	43

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit .....	45
4.2	Einflüsse von Pam24-4 und Pam30-5 auf NK-Zellen .....	45
4.2.1	Die TLR2-Expression.....	45
4.2.2	Die HLA-DR-Expression .....	48
4.2.3	Die CD69-Expression.....	50
4.3	Aufnahme von Pam30-5 in die NK-Zelle.....	51
4.4	Einschränkungen und Ausblick .....	51
4.5	Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Forschung .....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>

**Danksagung**

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Ausschnitt der Aminosäuresequenz von gD2 (56).....	4
Abbildung 1.2: Schema der frühen und späten immunregulatorischen Funktionen der CD56 <sup>bright</sup> -NK-Zellen (31) .....	5
Abbildung 1.3: Die TLR-Signalkaskade anhand von TLR2 als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 (74).....	8
Abbildung 1.4: Chemische Struktur des Lipopeptides Pam2Cys .....	12
Abbildung 2.1: Überprüfung der NK-Zellreinheit .....	26
Abbildung 3.1: TLR2-Oberflächenexpression nach Pam24-4-Stimulation .....	34
Abbildung 3.2: HLA-DR-Oberflächenexpression nach Pam24-4-Stimulation.....	35
Abbildung 3.3: Intrazelluläre TLR2-Expression nach Pam24-4-Stimulation.....	36
Abbildung 3.4: Relative TLR2-mRNA-Expression in Monozyten und NK-Zellen .....	37
Abbildung 3.5: CD69-Oberflächenexpression nach Pam24-4-Stimulation .....	38
Abbildung 3.6: Oberflächenphänotypisierung von CD56 <sup>dim</sup> - und CD56 <sup>bright</sup> -NK-Zellen auf HLA-DR und TLR2 nach Inkubation mit Pam24-4.....	40
Abbildung 3.7: Oberflächenphänotypisierung von unstimulierten CD56 <sup>dim</sup> - und CD56 <sup>bright</sup> -NK-Zellen auf HLA-DR und TLR2 .....	41
Abbildung 3.8: Vergleich der HLA-DR- und TLR2-Expressionsänderung innerhalb der Subpopulationen zwischen unstimulierten (NK-DMSO) und stimulierten (NK-Pam24-4) Zellen .....	42
Abbildung 3.9: Aufnahme von Pam30-5 in NK-Zellen .....	43
Abbildung 4.1: Die mögliche Interaktion zwischen NK- und CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen über HLA-DR.....	50
Abbildung 4.2: Schematische Struktur des in dieser Arbeit verwendeten Lipopeptides und eines verzweigten Lipopetides mit Pam2Cys (111).....	53

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1: Toll-like-Rezeptoren und eine Auswahl bekannter Liganden (46, 74) .....	7
Tabelle 2.1: Geräte .....	15
Tabelle 2.2: Software für die Durchflusszytometrie .....	16
Tabelle 2.3: Software für die quantitative Real-Time-PCR .....	16
Tabelle 2.4: Software für die konfokale Mikroskopie.....	16
Tabelle 2.5: Sonstige Materialien.....	16
Tabelle 2.6: Medien, Puffer, Antibiotika und Reagenzien .....	16
Tabelle 2.7: Monozyten- und Natürliche Killerzellisolation.....	17
Tabelle 2.8: Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	17
Tabelle 2.9: RNA-Extraktion und Reverse Transkriptase-PCR.....	18
Tabelle 2.10: Quantitative Real-Time-PCR .....	18
Tabelle 2.11: Primer für die quantitative Real-Time-PCR.....	19
Tabelle 2.12: Primärantikörper für die konfokale Mikroskopie.....	19
Tabelle 2.13: Sekundärantikörper für die konfokale Mikroskopie.....	19
Tabelle 2.14: Zellmarkierung mit Antikörpern für den FACSVantage SE Cell Sorter .	24

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
AS	Adjuvant System
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GAM	Ziege-anti-Maus
gD	Glykoprotein D
gD2	Glykoprotein D aus HSV-2
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GSK	GlaxoSmithKline
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomvirus
HSV	Herpes-simplex-Virus
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
HSV-2	Herpes-simplex-Virus Typ 2
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

IRAK	IL1-Rezeptor-assoziierte Kinase
I $\kappa$ B	Inhibitor von $\kappa$ B
LPG	Leishmania Lipophosphoglykan
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid-2
MDDC	Monocyte derived dendritic cell
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MPL	Monophosphoryl-Lipid A
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor- $\kappa$ B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Pam24-4	Pam2Cys plus das HSV-2-Peptid 24-4
Pam2Cys	2,3-Dipalmitoyl-S-Glycerylcystein
Pam30-5	Pam2Cys plus das HSV-2-Peptid 30-5
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PE/Cy7	Phycoerythrin-Cyanin-7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PRRs	Pattern recognition receptors
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TAK	Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1
TIR	Toll-/IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Herpes-Simplex-Virus

### 1.1.1 Aufbau

Herpes-simplex-Viren sind große, umhüllte Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom. Sie gehören zur Familie der Herpesviridae. Bei den Herpes-simplex-Viren unterscheidet man zwei eng miteinander verwandte Serotypen: das Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), auch Humanes Herpesvirus 1 genannt und das Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV-2), entsprechend Humanes Herpesvirus 2 genannt.

Das Genom befindet sich in einer ikosaedrischen Proteinstruktur, dem Kapsid. Das Kapsid ist wiederum von weiteren Proteinen umgeben, dem sogenannten Tegument. Die außen anliegende Virushülle wird von einer Lipid-Doppelmembran mit ungefähr 12 unterschiedlichen darin eingebauten Glykoproteinen gebildet, welche das Binden des Virions an eine Wirtszelle ermöglichen. Das virale Genom kodiert unter anderem für Proteine, die es dem Virus ermöglichen, der Immunantwort des Wirtes auszuweichen und so das Überleben und die Ausbreitung von HSV zu ermöglichen (91).

### 1.1.2 HSV-Infektion

HSV-1 und HSV-2 werden normalerweise über die orale oder genitale Schleimhaut aufgenommen. Das Virus infiziert sensorische Nervenzellen und gelangt retrograd über die Axone in die Spinalganglien bzw. bei oraler HSV-1-Infektion in das Trigeminusganlion. Diese Nervenzellen bleiben lebenslang latent infiziert. Eine Reaktivierung der Viren führt zu anterogradem Transport zurück in die peripheren Nerven des betroffenen Dermatoms und weiter bis zu den Keratinozyten der Haut und Schleimhaut, wo das Virus über Körpersekrete ausgeschieden wird (25).

60 % - 80 % der Menschen weltweit sind mit HSV-1 infiziert, die Infektionsrate mit HSV-2 dagegen variiert stark von Land zu Land von 7 % bis zu über 80 % (93). Die Symptomatik von HSV-Infektionen ist vielfältig. Schmerzhafte orale oder genitale Läsionen und Ulzera treten häufig bei einer Reaktivierung des Virus auf. Die Infektion kann aber auch mit dermatologischen, neurologischen und ophthalmologischen

Komplikationen einhergehen oder sogar lebensbedrohliche Enzephalitiden und generalisierte Infektionen bei immuninsuffizienten Patienten und Neugeborenen auslösen (95).

HSV-2 ist der wichtigste Auslöser einer der häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten, Herpes genitalis. Herpes genitalis kann in immunkompetenten Patienten wiederholt durch Reaktivierung des Virus zu schmerzhaften genitalen Läsionen führen. Die Viren können so auch vertikal von einer infizierten Mutter während der Geburt auf das Kind übertragen werden und hier den Herpes neonatorum mit lebensgefährlichen Komplikationen auslösen (42). Des Weiteren ist Herpes genitalis ein Kofaktor bei der Übertragung von und Ansteckung mit HIV. Das Risiko, sich mit HIV zu infizieren ist bei Herpes genitalis-Patienten bis zu dreimal höher, als bei seronegativen Individuen. Die Zerstörung der Schleimhaut durch die Ulzera erleichtert HIV den Eintritt in die Wirtszellen (24, 34, 109).

Außerdem stieg in den letzten Jahren die Rate an genitalen HSV-1-Infektionen in den Industrienationen, besonders bei jungen Erwachsenen, signifikant an (13, 82). Als Gründe sind häufigerer Oralverkehr und vermehrte Erstinfektionen mit HSV-1 im Jugend- und nicht im Kindesalter, und damit eine höhere Ansteckungswahrscheinlichkeit beim Geschlechtsverkehr, zu nennen (43, 110).

### **1.1.3 Die humane Immunantwort auf HSV**

An der Immunreaktion gegen HSV sind das angeborene Immunsystem mit neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), NK-Zellen und Interferonen, sowie das erworbene Immunsystem mit B-Lymphozyten, Antikörpern, T-Lymphozyten und Zytokinen beteiligt (57).

Makrophagen und pDCs phagozytieren das Virus. Auf der Zelloberfläche bindet HSV an Toll-like-Rezeptor (TLR) 2, was zur Ausschüttung von Interleukin (IL)-6 und IL-8 führt (33). Außerdem ist bekannt, dass Interferon (IFN)- $\alpha$  und IFN- $\beta$  eine entscheidende Rolle in der Immunantwort auf HSV spielen. Diese Interferone unterstützen unter anderem Th1-Immunreaktionen des erworbenen Immunsystems (83). Die Produktion von IFN- $\alpha$  wird durch die Interaktion von endosomalem TLR9 mit viraler DNA stimuliert (25). pDCs stellen hier den überwiegenden Teil der IFN- $\alpha$ -bildenden Effektorzellen (92). Das HSV-Genom wiederum kodiert für Proteine, die es

ermöglichen, der IFN-vermittelten Immunantwort auszuweichen. Weiterhin zeigte sich in IFN-Rezeptor-defizienten Tiermodellen eine erhöhte Virulenz des Herpes-simplex-Virus (62). Diese Studien bestätigen die essentielle Stellung von IFN- $\alpha/\beta$  in der Immunreaktion des Wirtes gegen das Virus.

Besonders nach einer Reaktivierung von HSV aus den neuronalen Ganglien sind CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von Bedeutung. Diese Zellen sind für die Antikörperproduktion durch B-Zellen und die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wichtig. Zusätzlich können sie selbst zytotoxische Eigenschaften aufweisen. Darüber hinaus sind Th1 CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, neben CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, NKT-Zellen und den zum angeborenen Immunsystem gehörenden NK-Zellen, wichtige IFN- $\gamma$ -Produzenten (28, 57). IFN- $\gamma$  unterstützt sowohl die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) I-Molekülen und somit die Lyse von infizierten Zellen durch aktivierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, als auch die Ausbildung von MHC II auf Keratinozyten in den Läsionen und folglich die Stimulation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (26, 58). Diese zentralen Funktionen machen IFN- $\gamma$  zu einem der wichtigsten Komponenten in der Kontrolle einer HSV-Infektion.

Antikörper können die Ausbreitung der Viren von Zelle zu Zelle verhindern, allerdings müssen sehr hohe Titer dieser neutralisierenden Antikörper vorliegen, um die Infektion weiterer Zellen zu verhindern (72). Die Th1-Immunantwort scheint also bei der Bekämpfung von HSV eher eine Hauptrolle zu spielen, als eine Th2-Reaktion (27).

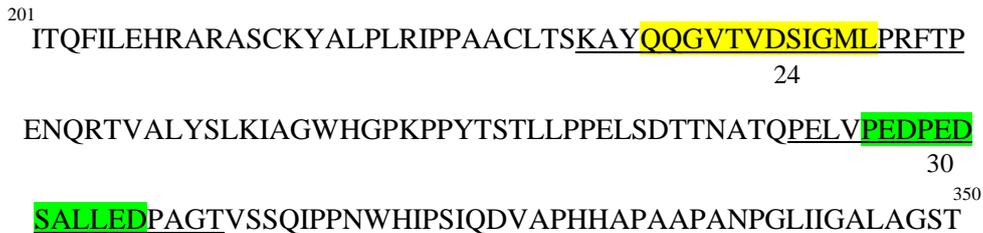
### 1.1.3.1 Gykoprotein D

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen über MHC II-Moleküle der Keratinozyten verschiedene Proteine von HSV-1 und HSV-2, darunter auch das Hüllprotein Glykoprotein D (gD) (70, 71). Die Eigenschaft als Immunogen macht gD für die Forschung attraktiv.

KIM et al. waren in der Lage, mehr als sechs immunodominante Peptid epitope auf gD von HSV-2 (gD2) darzustellen. Vier dieser Peptide mit einer Länge von 20 Aminosäuren (Peptid 2, 24, 30, 34) wurden genauer untersucht. Es zeigte sich, dass sie von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten von HSV-1<sup>+</sup>/HSV-2<sup>-</sup> und HSV-1<sup>-</sup>/HSV-2<sup>+</sup>-Patienten erkannt wurden. Begründen kann man diese Kreuzreaktivität mit der hohen Homologie zwischen gD von HSV-1 und gD von HSV-2. Die vier Peptide wurden weiterhin in jeweils neun kleinere Peptidstrukturen mit je 12 Aminosäuren unterteilt, um minimale immunogene T-Zell-Epitope auf gD2 zu erkennen. Als besonders kreuzreaktiv erwiesen

sich hier die Peptide 24-4 und 30-5, welche auch durch das MHC II-Molekül HLA (Humanes Leukozytenantigen)-DR erkannt wurden und so CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten präsentiert werden konnten (56).

24-4 ist das vierte der neun 12 Aminosäuren-langen Peptide aus Peptid 24 und 30-5 das fünfte aus Peptid 30 (Abbildung 1.1). 24-4 und 30-5 wurden aufgrund der genannten immunogenen Eigenschaften in dieser Arbeit verwendet.



**Abbildung 1.1: Ausschnitt der Aminosäuresequenz von gD2 (56)**

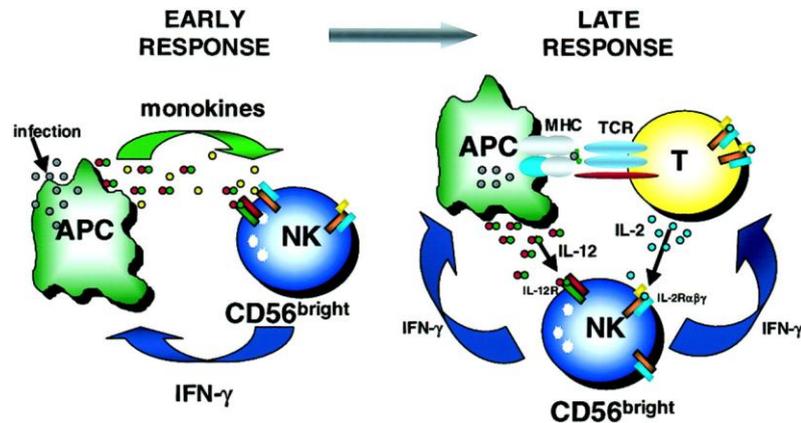
Die unterstrichenen Aminosäuren bilden die Peptide 24 und 30. Sie sind jeweils 20 Aminosäuren lang. Der gelb hervorgehobene Abschnitt ist Peptid 24-4 und der grüne Peptid 30-5. Diese Peptide bestehen aus je 12 Aminosäuren.

## 1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zum angeborenen Immunsystem und machen ungefähr 15 % aller Lymphozyten im Blutssystem aus (21). NK-Zellen können normale Zellen von Tumor- oder infizierten Zellen über die Herabregulierung von MHC I-Molekülen auf den letzteren unterscheiden (3). Die Lyse der Zielzellen erfolgt dann durch komplexe aktivierende und inhibitorische Mechanismen und Zytokine (81, 94).

Humane NK-Zellen werden phänotypisch durch die Expression von CD56 und die fehlende Expression von CD3 definiert. Ferner lassen sich zwei Untergruppen nachweisen, NK-Zellen mit hoher CD56-Expression (CD56<sup>bright</sup>) auf der Zelloberfläche und eine Population mit geringer CD56-Dichte (CD56<sup>dim</sup>). 90 % der NK-Zellen im menschlichen Organismus sind CD56<sup>dim</sup>. Sie sind die klassischen zytotoxischen NK-Zellen (21). CD56<sup>bright</sup>-Zellen dagegen sind nur schwach zytotoxisch, dafür aber in der Lage, wichtige Zytokine, wie das die Th1-Immunantwort unterstützende IFN- $\gamma$ , zu sezernieren und besitzen Rezeptoren für IL-2 und IL-12. Diese Subpopulation stellt den Hauptanteil der NK-Zellen in den Lymphfollikeln der Schleimhäute und den Lymphknoten (31). Dort interagieren sie mit antigenpräsentierenden Zellen und sind in

der Lage, Makrophagen und dendritische Zellen zu primen (14).



**Abbildung 1.2: Schema der frühen und späten immunregulatorischen Funktionen der CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen (31)**

Früh während der angeborenen Immunreaktion werden CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen durch Zytokine (monokines) stimuliert (zum Beispiel IL-12 plus IL-18, IL-15, IL-1β) und schütten daraufhin IFN-γ aus. Später nutzen CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen IL-2 aus T-Zellen (T) und IL-12 der antigenpräsentierenden Zellen (APC), um dann über IFN-γ das erworbene Immunsystem zu beeinflussen. TCR: T-Zell-Rezeptor.

Des Weiteren zeigten sich in mehreren Studien auch antigenpräsentierende Eigenschaften bei NK-Zellen (10, 45, 80). Besonders auf aktivierten Killerzellen ließen sich MHC II-Moleküle, unter anderem HLA-DR, nachweisen (44). Es wurde außerdem gezeigt, dass HLA-DR auf CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen in geringer Konzentration vorhanden ist, während CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen keine HLA-DR-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (64). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass NK-Zellen in der Lage zu sein scheinen, zusätzlich zur IFN-γ-Produktion, direkt durch Zell-zu-Zell-Kontakt T-Lymphozyten zu stimulieren.

Durch die Funktion als „Helferzelle“ und die Produktion von Zytokinen, und nicht als zytotoxische Effektorzelle, erlangt die NK-Zelle, besonders die CD56<sup>bright</sup>-Population, eine wichtige und sehr interessante Bedeutung in der Aktivierung einer erworbenen Immunantwort (20, 22).

NK-Zellen scheinen überdies eine vielleicht sogar essentielle Rolle in der Immunreaktion gegen das Herpes-simplex-Virus zu spielen. In einem Mäusemodell zeigten NK-Zell-defiziente Tiere eine erhöhte Anfälligkeit, symptomatische Herpes-Erkrankungen zu entwickeln. Außerdem waren die NK-Zellen wesentlich daran beteiligt, CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zu aktivieren und konnten sogar einen Verlust von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen kompensieren und deren Helferfunktion übernehmen (77). Diese

Resultate weisen darauf hin, speziell NK-Zellen in therapeutischen und präventiven Strategien, wie die Entwicklung von Impfstoffen, besondere Beachtung zu schenken.

### **1.3 Toll-like-Rezeptoren**

Das Protein Toll wurde 1984 in der Fliege *Drosophila melanogaster* als der essentielle Rezeptor für die dorsoventrale Ausrichtung des Embryos entdeckt (2). Weiterhin spielt Toll in *Drosophila* eine wesentliche Rolle in der Abwehr gegen Pilzbefall (63).

Zu Toll homologe Strukturen findet man in Pflanzen, Nematoden und Wirbeltieren (100). Mitte der neunziger Jahre wurde ein strukturell verwandter Rezeptor entdeckt, der durch Erkennung und Bindung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien an der Immunantwort des Menschen beteiligt ist (68). Dieser Rezeptor wurde später Toll-like-Rezeptor (TLR) 4 genannt.

Bis heute sind beim Menschen zehn verschiedene Toll-like-Rezeptoren identifiziert worden (59). TLRs gehören als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zu der Gruppe der „pattern recognition receptors“ (PRRs). Diese Rezeptoren binden phylogenetisch konservierte molekulare Muster von Mikroorganismen, auch „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) genannt. PAMPs sind zum Beispiel Lipoproteine, Lipopolysaccharide, Peptidoglykane oder Lipoteichonsäuren, die essentiell für das Überleben der Mikroorganismen sind und in vielen Bakterienarten und Virenfamilien vorkommen. Durch die Bindung von PAMPs an PRRs wird eine inflammatorische Reaktion ausgelöst. TLRs bilden somit einen wichtigen Teil der körpereigenen Immunabwehr (67).

TLRs befinden sich auf Zellmembranen (TLR1, 2, 4, 5, 6), zum Beispiel auf Leukozyten und Epithelzellen, oder Zellkompartimenten (TLR3, 7, 8, 9) wie Endosomen und Lysosomen (59). Jeder der zehn verschiedenen menschlichen TLRs bindet, soweit bekannt, mindestens einen oder auch mehrere, oft strukturell nicht verwandte Liganden (Tabelle 1.1).

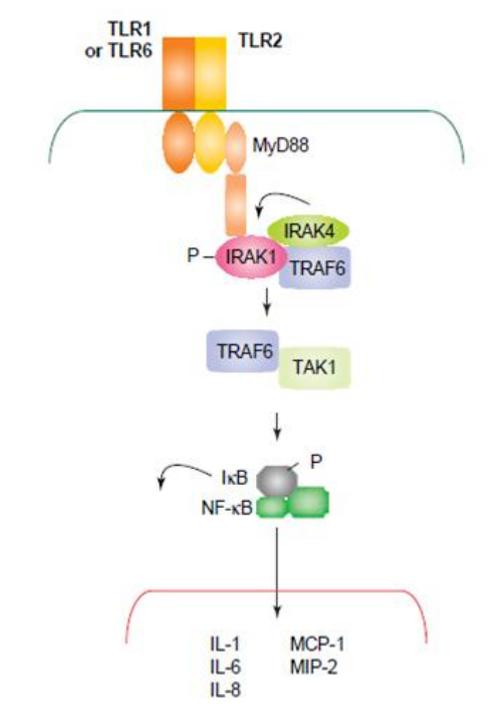
**Tabelle 1.1: Toll-like-Rezeptoren und eine Auswahl bekannter Liganden (46, 74)**

<b>TLR</b>	<b>Liganden (Herkunft)</b>
TLR1	Triacyl-Lipopeptide (Bakterien, Mykobakterien)
TLR2	Hüllproteine (Viren) Proteine/Lipoproteine (Bakterien) Peptidoglykane (Gram-positive Bakterien) Lipoteichonsäuren (Gram-positive Bakterien) Lipoarabinomannan (Mykobakterien) Phenol-lösliches Modulin (Staphylokokkus epidermidis) Glykoinositolphospholipide (Trypanosoma cruzi) Glykolipide (Treponema maltophilum) Porine (Neisseria) Zymosan (Pilze) Hämagglutinin (Masernvirus)
TLR3	Doppelstrang-RNA (Viren)
TLR4	LPS (Gram-negative Bakterien) Fusionsprotein ( Respiratory syncytial virus) Envelope-Proteine Hitzeschockprotein 60 (Chlamydia pneumoniae)
TLR5	Flagellin (Bakterien)
TLR6	Diacyl-Lipopeptide (Mykoplasma)
TLR7	Uracil-reiche ssRNA
TLR8	Uracil-reiche ssRNA
TLR9	CpG-DNA (Bakterien)
TLR10	?

Die Liganden binden an den leucinreichen Anteil der TLRs, der sich auf der Außenseite der Zellmembran bzw. innerhalb eines Zellkompartiments befindet (98). Der zytoplasmatische Teil der TLRs besitzt eine starke Homologie zur IL-1-Rezeptor-Familie und wird deshalb Toll-/IL-1-Rezeptor(TIR)-Domäne genannt (41). Die Signaltransduktionskaskade (Abbildung 1.3), die durch das Binden von PAMPs an den leucinreichen Teil eines TLRs ausgelöst wird, ähnelt stark dem molekularen Ablauf einer IL-1-Rezeptor-Aktivierung. Die TIR-Domäne formt mit dem Adapterprotein Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) einen Komplex, über den die

Signaltransduktion startet und die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) 4 aktiviert wird. IRAK4 phosphoryliert und aktiviert IRAK1, die wiederum mit Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertem Faktor 6 (TRAF6) interagiert. Der IRAK1/TRAF6-Komplex dissoziiert von der TIR-Domäne des TLRs und aktiviert daraufhin die transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1). TAK1 phosphoryliert I $\kappa$ B-Kinasen, die durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen letztendlich die Aktivierung von nukleärem Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) induzieren (97). Aktivierter NF- $\kappa$ B fungiert als Transkriptionsfaktor und trägt zur Regulation vieler Enzyme und besonders zur Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 bei (4, 5).

Die Bedeutung von MyD88 hat sich in Studien mit MyD88-defizienten Mäusen gezeigt. Diese Mäuse zeigten keine Immunreaktion auf verschiedene TLR-Liganden (53, 101). TLR3 und TLR4 weisen jedoch zusätzlich zur MyD88-abhängigen auch eine MyD88-unabhängige Signaltransduktionskaskade auf (1, 54).



**Abbildung 1.3: Die TLR-Signalkaskade anhand von TLR2 als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 (74)**

TLR2 wird auf der Zellmembran exprimiert. Nach Bindung eines PAMPs an den TLR aktiviert MyD88 IRAK4. IRAK4 phosphoryliert daraufhin IRAK1, die, mit TRAF6 einen Komplex bildend, vom Rezeptor dissoziiert. TAK1 wird aktiviert und phosphoryliert I $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B transloziert in den Nucleus und induziert die Bildung proinflammatorischer Zytokine. MCP-1: monocyte chemotactic protein-1. MIP-2: macrophage inflammatory protein-2.

### 1.3.1 Toll-like-Rezeptor 2

Die Expression von TLR2 scheint auf einige Zelltypen des angeborenen Immunsystems beschränkt zu sein. Insbesondere Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen exprimieren TLR2, aber auch auf NK-Zellen ließ sich dieser Rezeptor nachweisen (48, 61, 106). Es zeigte sich weiterhin, dass NK-Zellen direkt auf TLR-Liganden reagieren, über TLR2 aktiviert werden können und daraufhin IFN- $\gamma$  ausschütten (15, 65, 66). Die Konzentration von TLR2-mRNA und TLR2 auf der NK-Zelloberfläche erhöhte sich außerdem nach Stimulation durch den TLR2-Liganden Leishmania Lipophosphoglykan (LPG), welcher die NK-Zelle aktivierte (6).

Das Herpes-simplex-Virus bindet auch an TLR2 und kann eine starke Immunreaktion hervorrufen (88). Dieser Rezeptor ist hierbei einer der wichtigsten Initiatoren dieser Immunantwort (74). Die Aktivierung des Immunsystems kann aber besonders bei Neugeborenen so heftig ausfallen, dass die Krankheit einen lebensgefährlichen Verlauf nimmt (32, 60). Außerdem führen bestimmte TLR2-Mutationen zu schwerwiegenden Krankheitsbildern und höherer Übertragungsfahr einer Herpesinfektion (7). TLR2 scheint also bei der Auslösung einer Immunantwort gegen diese Viruserkrankung eine kritische Rolle zu spielen, die therapeutisch genutzt werden könnte.

TLR2 besitzt ein sehr breites Spektrum an Liganden. Dazu gehören Lipoproteine und Lipopeptide verschiedener Bakterienarten, Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane gram-positiver Bakterien, aus Mykobakterien stammendes Lipoarabinomannan, Glykoinositolphospholipide von *Trypanosoma cruzi*, Phenol-lösliches Modulin von *Staphylokokkus epidermidis* und Zymosan aus Hefepilzen (99).

Andere Studien haben gezeigt, dass TLR2 auch atypische Lipopolysaccharide (LPS) von *Leptospira interrogans* und *Porphyromonas gingivitis* erkennt. Allerdings wurde diese Annahme durch Ergebnisse weiterer Arbeiten entkräftet, die zeigten, dass Proteine und Lipopeptide, die die LPS-Proben kontaminierten, den Rezeptor aktivierten (47).

Doch trotz dieser Erkenntnisse weist TLR2 noch immer die Eigenschaft auf, eine Vielzahl von Liganden zu binden. Dieses Charakteristikum kann man zum Teil durch die Zusammenarbeit von TLR2 mit zumindest zwei weiteren TLRs erklären: TLR1 und TLR6. Diese beiden Rezeptoren sind strukturell miteinander und mit TLR2 verwandt. TLR2 kann mit je einem von ihnen ein Heterodimer bilden und so weitere Moleküle binden. Allgemein lässt sich sagen, dass TLR2/6-Heterodimere auf diazylierte

bakterielle Lipopeptide ansprechen und TLR2/1-Dimere auf triazylierte (102, 103). Neuere Studien deuten aber auf eine nicht so klare Trennung in dieser Bindungsspezifität hin (12). TLR2 ist sogar in der Lage, ohne die Bildung von Heterodimeren Lipopeptide zu binden und eine Signalkaskade auszulösen. Allerdings fällt die Reaktionsstärke ohne Heterodimere weitaus geringer aus (11).

Anzumerken sei noch, dass TLR2 weiterhin mit nicht verwandten Rezeptoren zusammenarbeitet. Dectin-1, ein Rezeptor aus der Lektin-Familie, bindet  $\beta$ -Glucane des Hefepilzzellwandbestandteils Zymosan. Auch TLR2 bindet Bestandteile des Zymosans. Dectin-1 leitet die Phagozytose des Partikels mit ein und unterstützt die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch TLR2, was zu einer effizienteren Immunantwort führt (36).

Die Vielfalt an Liganden, insbesondere das Binden von Lipopeptiden, und die Interaktion mit weiteren Rezeptoren des Immunsystems lassen den Toll-like-Rezeptor 2 zu einem wichtigen Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Impfstoffe werden.

### **1.4 Perspektiven hinsichtlich einer Herpes-simplex-Vakzine**

Die Ausbreitung von HSV-1 und HSV-2 kann aktuell nicht mit antiviraler Therapie oder Schutzmaßnahmen während des Geschlechtsverkehrs, wie Kondome, kontrolliert werden. Zudem wissen viele asymptomatische seropositive Individuen nicht, dass sie infiziert sind und tragen somit unbewusst zur Übertragung der Viren bei (27).

Die Entwicklung eines Impfstoffes, der die Erkrankung an, und wichtiger, die Infektion mit HSV verhindert, würde die Verbreitung der Herpes-Viren maßgeblich eindämmen. Zahlreiche Strategien, um eine wirksame Vakzine zu entwickeln, wurden in den letzten Jahren präsentiert. In Tiermodellen und Phase I-Studien zeigten einige dieser potentiellen Impfstoffe immunogene Eigenschaften, ein bahnbrechender Erfolg blieb allerdings aus (85).

Lediglich Ansätze mit HSV-2-Glykoprotein-Vakzinen wurden in großen Phase III-Studien ausgewertet. Novartis benutzte rekombinantes verkürztes gD2 und Glykoprotein B aus HSV2 mit einem aus Squalen, Polysorbat 80 und Sorbitantrioléat bestehenden Adjuvans (MF59). Leider schützte der Impfstoff nur in 9 % der Fälle vor einer HSV-2-Infektion, eine Verringerung einer symptomatischen Erkrankung mit

HSV-2 wurde nicht erreicht (23). GlaxoSmithKline (GSK) führte zwei weitere große Studien mit einem HSV-2 gD-Fragment und Alum und 3-O-deacylierten Monophosphoryl-Lipid A als Adjuvans (AS04) durch. Diese Vakzine zeigte einen Schutz vor einer Erkrankung an genitalem Herpes von 74 %, allerdings nur bei HSV-1<sup>-</sup>/HSV-2<sup>-</sup> weiblichen Probanden und nicht bei HSV-1<sup>+</sup> weiblichen Individuen. Zudem konnte kein Schutz bei Männern, unabhängig von ihrem HSV-Serostatus, erreicht werden (96). Die Gründe für diese Selektivität sind ungeklärt. Eine auf diese Ergebnisse aufbauende Phase III-Studie, HERPEVAC, wurde daraufhin von GSK initiiert. Evaluiert werden sollten Infektionsraten mit HSV und Herpes-Erkrankungen bei mehr als 8000 HSV-Frauen, weiterhin wurden Antikörpertiter und die zelluläre Immunreaktion gemessen (85). Ende September 2010 veröffentlichten GSK und das National Institute of Allergy and Infectious Diseases der USA eine Stellungnahme zu dem Ergebnis von HERPEVAC. Der Impfstoff erwies sich bei Frauen als wirkungslos, es konnte kein Schutz gegen eine Erkrankung mit HSV aufgebaut werden (79). Eine genaue Auswertung und Veröffentlichung der Ergebnisse bleibt abzuwarten, aber die erfolgversprechenden Resultate der vorangegangenen Studien konnten nicht bestätigt werden.

Die Entwicklung einer Herpes-simplex-Vakzine wird noch einige Zeit in Anspruch nehmen. Neben den genannten sind viele weitere Impfstoffe in Entwicklung, aber selbst die erfolgreichen werden erst in Jahren zur Zulassung anstehen. Die Komplexität der Immunreaktion auf HSV und die Eigenschaft des Virus, eine latente lebenslange Infektion auszulösen, setzen hohe Hürden für die Herstellung einer Vakzine. Zusätzlich sind die Definition und Darstellung weiterer immundominanter Epitope auf HSV und immunogene Adjuvantien essentiell für Fortschritte in der Herpes-Impfforschung.

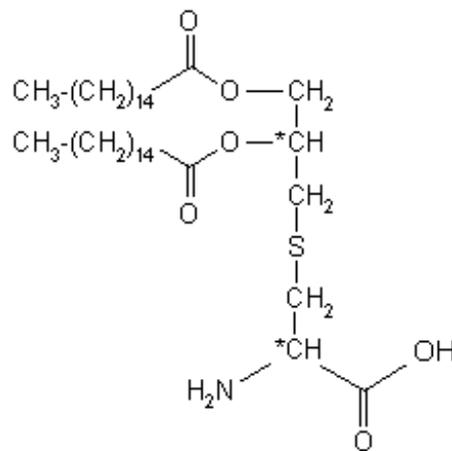
## 1.5 Adjuvantien

Viele der entwickelten Adjuvantien waren für den menschlichen Organismus schädlich, weshalb sie nicht in Impfstoffe eingebaut werden konnten. Klinische Studien zeigten in den letzten Jahren aber, dass synthetisch hergestellte Lipoproteine sich weitaus weniger toxisch verhalten und in der Lage sind, das Immunsystem zu stimulieren. Sie stellen deshalb eine attraktive Alternative zu traditionellen Adjuvantien dar (75). Mehrere

vielversprechende Studien mit lipopeptidbasierten Vakzinen gegen HIV, Hepatitis C, HPV, Malaria, oder Varizella Zoster offenbaren zudem ein weitgefächertes Einsatzgebiet der synthetischen Lipoproteine als Adjuvantien zukünftiger Impfstoffe (16, 17, 35, 78, 89).

### 1.5.1 2,3-Dipalmitoyl-S-Glycerylcystein

2,3-Dipalmitoyl-S-Glycerylcystein (Pam2Cys, Abbildung 1.4) ist ein synthetisches Derivat des Makrophagen aktivierenden Lipopeptides-2 (MALP-2) von *Mycoplasma fermentans* (76). Als Ligand von TLR2 induziert Pam2Cys die Reifung von dendritischen Zellen mit Erhöhung der MHC II-Expression auf der Zelloberfläche und löst eine antikörpervermittelte und zelluläre Immunantwort aus (18, 30, 49, 52). Pam2Cys kann als kraftvolles und nebenwirkungsarmes Impfadjuvans in eine lipopeptidbasierte Vakzine eingebaut werden. Gekoppelt an ein immundominantes Peptidepitop entsteht so ein potenter und sicherer sich selbst-adjuvierender Impfstoff (111).



**Abbildung 1.4: Chemische Struktur des Lipopeptides Pam2Cys**

Zwei Palmitinsäuren sind über einen Glycerolrest mit der Aminosäure Cystein verbunden. Über die OH-Gruppe von Cystein erfolgt die Konjugation mit immundominanten Peptiden.

Pam2Cys wurde in dieser Arbeit als Grundlage für eine mögliche Herpes-Vakzine eingesetzt. Pam2Cys mit dem HSV-2-Peptid 24-4 konjugiert, wird im Folgenden als Pam24-4 und Pam2Cys mit dem HSV-2-Peptid 30-5, als Pam30-5 bezeichnet.

Es gibt durchaus weitere interessante Adjuvansstoffe, von denen einige hier im Hinblick

auf einen Herpesimpfstoff erwähnt werden sollen.

### **1.5.2 MF59 und die Adjuvantien der AS-Reihe**

AS steht für „Adjuvant System“. Es wurden vier AS-Adjuvantien bis jetzt entwickelt. AS01 setzt sich aus Liposomen, dem Saponin QS-21 und Monophosphoryl-Lipid A (MPL) zusammen und wird aktuell in einer Phase III-Studie als Adjuvans einer Malaria-Vakzine eingesetzt (39, 107). AS02, eine Öl-in-Wasser-Emulsion mit QS-21 und MPL, war AS01 als Adjuvans eines Malariainpfstoffes leicht unterlegen, zeigte aber ermutigende Resultate in Arbeiten zur Entwicklung einer HIV-Vakzine und einer Hepatitis B-Vakzine für Patienten, denen aufgrund einer Hepatitis B-Infektion eine Leber transplantiert werden musste (37). Die auf Squalen und  $\alpha$ -Tocopherol basierende Öl-in-Wasser-Emulsion AS03 und das strukturell verwandte MF59 erhöhen signifikant die Zytokin- und Antikörperproduktion, senken den Antigengehalt in Impfstoffen und aktivieren Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen (19, 73). Beide Adjuvantien werden erfolgreich in Influenza-Vakzinen verwendet. AS04, bestehend aus dem TLR4-Agonisten MPL und Aluminiumhydroxid, hat sich als hochpotenter Hilfsstoff in der prophylaktischen Immunisierung gegen humane Papillomviren erwiesen (89). Ein sicherer, umfassender und langwirksamer Schutz wird durch die durch AS04 unterstützte Impfung erreicht (38, 90). Neben den klassischen kanzerogenen HPV-Typen 16 und 18 wurde außerdem eine protektive Wirkung gegen phylogenetisch verwandte HPV-Typen, die nicht im Impfstoff enthalten sind, beobachtet (40). AS04 wurde auch in der Entwicklung einer HSV-Vakzine verwendet. GSK setzte es unter anderem in den bereits erwähnten Phase III-Studien ein (96).

## **1.6 Fragestellung**

Man kann die dargestellten Informationen wie folgt zusammenfassen:

- Herpes-simplex kann lebensbedrohliche Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten und Neugeborenen hervorrufen. Trotz moderner Therapiestrategien breitet sich diese Erkrankung dennoch weltweit aus. Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HSV könnte maßgeblich zur Verringerung der

Neuinfektionen und auch zur Therapie beitragen. Die neu entdeckten kreuzreaktiven Peptidepitope in HSV stellen, an ein Adjuvans gekoppelt, eine potentielle Vakzine dar.

- Pam2Cys ist ein nebenwirkungsarmes und potentes Impfadjuvans. Es bindet an TLR2, erhöht die HLA-DR-Expression auf dendritischen Zellen und kann mit immundominanten Peptidepitopen konjugiert werden. TLR2 befindet sich unter anderem auf NK-Zellen und scheint eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf HSV zu spielen. Außerdem erhöhte sich die TLR2-Konzentration auf der NK-Zelloberfläche nach Stimulation durch einen TLR2-Liganden.
- Um HSV mit einer Impfung wirkungsvoll bekämpfen zu können, muss diese möglichst viele Teile des Immunsystems aktivieren. Hierzu gehören unter anderem NK-Zellen. Sie lassen sich anhand ihrer CD56-Oberflächenexpression in zwei große Gruppen einteilen. Die zytotoxischen und antigenpräsentierenden Eigenschaften der NK-Zellen könnten die Auslösung einer wirksamen Immunantwort auf die Vakzine entscheidend unterstützen. Zudem zeigten Tierstudien, dass NK-Zellen essentiell in der Bekämpfung von HSV sind.
- Es liegen bisher noch keine Arbeiten vor, die die Effekte von Pam2Cys auf NK-Zellen untersucht haben. Pam2Cys, mit einem HSV-Peptid konjugiert, könnte über TLR2 an NK-Zellen binden und dort, wie auf dendritischen Zellen, die HLA-DR-Expression steigern. So könnte eine Verbindung zum erworbenen Immunsystem hergestellt und eine Immunreaktion ausgelöst werden.

Dies führt unter anderem zu diesen Aspekten, die im Folgenden bearbeitet wurden:

- Die Aktivierung von NK-Zellen durch Pam2Cys
- Die Rolle von TLR2 als Rezeptor für Pam2Cys auf NK-Zellen
- Die Expressionsänderung von HLA-DR und TLR2 auf NK-Zellen nach Pam2Cys-Stimulation
- Die Reaktion von CD56<sup>bright</sup>- und CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen auf Pam2Cys
- Die Aufnahme von Pam2Cys in die NK-Zelle

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
<b>Durchflusszytometrie</b>	
FACSCanto Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>Gelelektrophorese</b>	
Mini-Sub Cell GT-Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PowerPac 300 Power Supply-Netzgerät	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Infinity-Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat, Marne-La-Valée, Frankreich
<b>Konfokale Mikroskopie</b>	
Leica TCS SP2	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
<b>PCR</b>	
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotor-Gene 3000 (quantitative Real-Time-PCR)	Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australien
<b>Photometrie</b>	
NanoPhotometer	Implen, München, Deutschland
<b>Zellseparation</b>	
FACSVantage SE Cell Sorter	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Purple EasySep Magnet	StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada
VarioMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
LS (10 <sup>8</sup> markierte Zellen)- oder MS (10 <sup>7</sup> )-Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

<b>Spezielle Zentrifugation</b>	
Shandon Cytospin 4 Cytocentrifuge	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA

**Tabelle 2.2: Software für die Durchflusszytometrie**

CellQuest	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACSDiva	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FlowJo	TreeStar, Ashland, OR, USA

**Tabelle 2.3: Software für die quantitative Real-Time-PCR**

Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7	Corbett Life Science, Concorde, NSW, Australien
-------------------------------------	---

**Tabelle 2.4: Software für die konfokale Mikroskopie**

Leica Confocal Software LCS	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
-----------------------------	--

**Tabelle 2.5: Sonstige Materialien**

Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
----------	--------------------------

**Tabelle 2.6: Medien, Puffer, Antibiotika und Reagenzien**

AB-Human-Serum	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eserserum, 10 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO, Grand Island, NY, USA
Ficoll-Hypaque-Lösung	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Paraformaldehyd, 2 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Penicillin, Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ProLong Gold	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RoboSep Puffer	StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada
RPMI 1640-Medium	GIBCO, Grand Island, NY, USA
Saponin, 0,5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton-X, 0,1 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau, 0,4 %	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 2.7: Monozyten- und Natürliche Killerzellisolation**

CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
EasySep Human NK Cell Enrichment Kit	StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada
NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

**Tabelle 2.8: Antikörper für die Durchflusszytometrie**

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Hersteller
Isotyp	APC	Maus IgG1	MOPC-21	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Isotyp	FITC	Maus IgG1	MOPC-21	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Isotyp	PE	Maus IgG1	MOPC-21	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Isotyp	PerCP	Maus IgG1	MOPC-21	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Isotyp	FITC	Maus IgG2a	UPC-10	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isotyp	PE/Cy7	Maus IgG2a	MOPC-173	BioLegend, San Diego, CA, USA
Isotyp	APC	Maus IgG2b	27-35	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD3	FITC	Maus IgG1	UCHT1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD3	PerCP	Maus IgG1	SK7	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD14	APC	Maus IgG2b	M $\phi$ P9	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD56	PE	Maus IgG1	AF12-7H3	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD69	APC	Maus IgG1	L78	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
HLA-DR	PE/Cy7	Maus IgG2a	L243	BioLegend, San Diego, CA, USA
TLR2	FITC	Maus IgG2a	TL2.1	eBioscience, San Diego, CA, USA

**Tabelle 2.9: RNA-Extraktion und Reverse Transkriptase-PCR**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA

**Tabelle 2.10: Quantitative Real-Time-PCR**

FastStart SYBR Green Master	Roche, Basel, Schweiz
-----------------------------	-----------------------

**Tabelle 2.11: Primer für die quantitative Real-Time-PCR**

Spezifität	Sequenz
β-Actin	(F) 5'- CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT -3' (R) 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'
TLR2	(F) 5'- GGCCAGCAAATTACCTGTGTG -3' (R) 5'- CCAGGTAGGTCTTGGTGTTC -3'

Die Primer wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

**Tabelle 2.12: Primärantikörper für die konfokale Mikroskopie**

Spezifität	Konjugation	Isotyp	Klon	Hersteller
Isotyp	-	Maus IgG1	MOPC-31C	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD56	-	Maus IgG1	HCD56	BioLegend, San Diego, CA, USA

**Tabelle 2.13: Sekundärantikörper für die konfokale Mikroskopie**

Spezifität	Konjugation	Hersteller
GAM647 (Ziege-anti-Maus)	Alexa Fluor 647	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.1 Pam24-4, Pam30-5 und Pam30-5-FITC

Pam24-4, Pam30-5 und Pam30-5-FITC wurden im Labor von Herrn Professor David C. Jackson (Cooperative Research Centre for Vaccine Technology and Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Parkville, VIC, Australien) synthetisiert (50, 69, 111) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Pam2Cys war über zwei Serinreste an das Peptidpitop 24-4 bzw. 30-5 gebunden. Die Lipopeptide waren in DMSO gelöst, die Konzentration betrug 10 mM und wurde für die einzelnen Versuchsansätze entsprechend angepasst.

## **2.2 Methoden**

Alle Laborarbeiten wurden am Centre for Virus Research des Westmead Millennium Institutes in Westmead, NSW, Australien in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt, um eine Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden.

### **2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Vollblutkonserven (~500 ml pro Beutel) wurden von der Blutbank des Roten Kreuzes in Sydney, NSW, Australien zur Verfügung gestellt und stammten von gesunden Spendern. Die mononukleären Zellen (PBMC: peripheral blood mononuclear cells) wurden durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Das Vollblut wurde 1:1 mit PBS verdünnt. In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde dann 40 ml verdünntes Blut mit Hilfe einer Plastikkanüle und einer 60 ml Spritze mit 10 ml Ficoll-Hypaque-Lösung unterschichtet. Die Röhrchen wurden für 20 min bei 1800 U/min ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. So entstehen drei Schichten im Blut: die oberste Schicht besteht aus dem Blutplasma, die mittlere Schicht ist ein schmaler farbloser Ring, sie beinhaltet die PBMCs und in der untersten Schicht befindet sich die Ficoll-Hypaque-Lösung mit dem Erythrozyten- und Granulozytensediment. Die PBMCs wurden dann mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein frisches Röhrchen überführt und drei Mal mit PBS gewaschen, zuerst bei 1800 U/min für 5 min bei Raumtemperatur und dann zweimal bei 1200 U/min für 5 min bei Raumtemperatur.

Die Zellen wurden entweder eingefroren oder sofort weiterverwendet.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Aus einer Zellsuspension wurde ein Volumen von 50 µl steril entnommen und mit 450 µl PBS verdünnt. Hiervon wurden wiederum 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblau gemischt. Es ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 1:20. 10 µl der mit Trypanblau gemischten Zellen wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt und am Lichtmikroskop ausgezählt. Gezählt wurden nur die lebenden, d. h. die nicht mit

Trypanblau gefärbten Zellen. Die Zellen wurden in den vier großen Eckquadraten ausgezählt und daraus ein Mittelwert errechnet. Die Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich aus der Formel: Mittelwert der gezählten Zellen x Verdünnungsfaktor x  $10^4$ .

### **2.2.3 Einfrieren von Zellen**

Zuerst wurde das Einfriermedium vorbereitet. Es besteht aus 90 % fetalem Kälberserum (FCS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen zerstören könnten. Es ist allerdings auch toxisch für stoffwechselaktive Zellen, deshalb muss der Einfriervorgang zügig durchgeführt werden.

Die gezählten Zellen wurden bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert und in dem Einfriermedium in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert. Die Suspension wurde sofort auf Einfrierröhrchen verteilt und diese in eine Einfrierbox überführt. Die Box wurde über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Dann wurden die Röhrchen über flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  bis zur Wiederverwendung gelagert.

### **2.2.4 Auftauen von Zellen**

Die Einfrierröhrchen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und die Zellsuspensionen in einem  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad angetaut. Dann wurden die Suspensionen sofort in RF10-Medium (90 % RPMI 1640-Medium + 10 % FCS) übernommen und drei Mal bei 1200 U/min für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und in das jeweilige Zellmedium überführt.

### **2.2.5 Isolation von Monozyten**

Monozyten wurden mittels positiver Selektion und immunmagnetischer Separation aus PBMCs isoliert. Es wurden CD14 MicroBeads verwendet, mit denen die Monozyten markiert und so in einem magnetischen Feld von den restlichen Zellen getrennt wurden. PBMCs wurden in  $80 \mu\text{l}$  kaltes PBS/ $10^7$  Zellen überführt und mit  $20 \mu\text{l}$  CD14 MicroBeads/ $10^7$  Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann mit kaltem PBS gewaschen und in  $500 \mu\text{l}$  kaltem PBS resuspendiert.

Die Zellen wurden immer kalt gehalten, da es sonst zur Aufnahme der Beads in das Zellinnere kommen könnte. Diese Endozytose kann die Reinheit der Zellen nach der Isolation erheblich herabsetzen.

Nach der Resuspension der PBMCs wurde je nach Zellzahl eine LS- oder MS-Säule in den Magneten des VarioMACS-Separators eingespannt und diese mit 3 ml (LS) bzw. 500 µl (MS) kaltem PBS äquilibriert. Darauf folgend wurden die Zellen appliziert. Die Zellsuspension durchlief nun langsam die Säule und das magnetische Feld. Die markierten Zellen wurden so an die Wand der Säule gebunden, während die unmarkierten Zellen in einem FACS-Röhrchen oder einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurden. Die Säule wurde zusätzlich noch dreimal mit 3 ml (LS) bzw. 500 µl (MS) kaltem PBS gewaschen, um in der Säule verbliebene unmarkierte Zellen auszuspülen. Dann wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, auf ein frisches Zentrifugen- oder FACS-Röhrchen platziert und mit 5 ml (LS) bzw. 1 ml (MS) kaltem PBS gefüllt. Mit einem Spritzenkolben wurde danach sofort die Pufferlösung mit den markierten Monozyten aus der Säule herausgepresst und in dem Röhrchen aufgefangen.

### **2.2.6 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten**

Die über die positive Selektion isolierten Monozyten wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in RF10-Medium resuspendiert. Das Medium wurde mit 7,5 µl Interleukin-4/10 ml RF10 und 0,75 µl GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)/10 ml RF10 versetzt. Die Suspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt und für 6 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (86, 105).

Die so aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen (monocyte derived dendritic cells, MDDCs) wurden gezählt und waren zur weiteren Verwendung bereit.

### **2.2.7 Isolation von natürlichen Killerzellen**

Auch bei den folgenden Isolationsverfahren wurden die Zellen gekühlt, um eine Endozytose der Antikörper und Beads zu verhindern und eine hohe Zellreinheit nach der Isolation zu erreichen.

Natürliche Killerzellen wurden mit drei verschiedenen Methoden aus PBMCs isoliert:

1. Mit dem NK Cell Isolation Kit
2. Mit dem EasySep Human NK Cell Enrichment Kit

Beide Verfahren benutzen die negative Selektion der NK-Zellen mittels immunmagnetischer Separation. Hierbei werden die Nicht-NK-Zellen der PBMCs, also die B-, T-Zellen, Monozyten und Granulozyten, mit Antikörpern und magnetischen Partikeln markiert und dann in einem magnetischen Feld von den NK-Zellen getrennt. Die NK-Zellen verbleiben unmarkiert. Dies hat den Vorteil, dass eine mögliche Aktivierung der Zellen durch das Binden von Antikörpern verhindert wird.

3. Mit dem FACSVantage SE Cell Sorter

Mit dem FACSVantage SE Cell Sorter werden die Zellen durchflusszytometrisch gezählt und phänotypisiert und gleichzeitig die NK-Zellen von den PBMCs getrennt. So kann eine extrem hohe Zellreinheit erreicht werden.

#### **2.2.7.1 NK Cell Isolation Kit**

PBMCs wurden in 40  $\mu\text{l}$  kaltem PBS/ $10^7$  Zellen resuspendiert und mit 10  $\mu\text{l}$  NK Cell Biotin-Antibody Cocktail/ $10^7$  Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 30  $\mu\text{l}$  kaltes PBS/ $10^7$  Zellen hinzugefügt und die PBMCs mit 20  $\mu\text{l}$  NK Cell MicroBead Cocktail/ $10^7$  Zellen für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann mit kaltem PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  kaltem PBS resuspendiert.

Das Isolationsverfahren ist dem der positiven Selektion bis zum Entnehmen der Säule aus dem Magnetfeld gleich (Kapitel 2.2.5). Das Entnehmen der Säule und das Herauspressen der Zellsuspension entfallen, da das Eluat nach dem dreimaligen Waschen die gewünschten unmarkierten NK-Zellen bereits enthält.

#### **2.2.7.2 EasySep Human NK Cell Enrichment Kit**

Für diese Methode wurden 5 x  $10^7$  PBMCs/ml RoboSep Puffer in einem FACS-Röhrchen resuspendiert. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  Human NK Cell Enrichment Cocktail/ml Zellen hinzugegeben. Die Suspension wurde dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurden die EasySep D Magnetic Particles in einer Konzentration von 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Zellen zugefügt. Die Partikel mussten vor Benutzung 30 s verwirbelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Die Suspension

wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde Robosep Puffer bis zu einer Gesamtmenge von 2,5 ml zugegeben.

Das FACS-Röhrchen mit den markierten Zellen wurde in den Purple EasySep Magnet gesetzt und für 2,5 min ruhen gelassen. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Magnet mit dem Röhrchen in einer gleichmäßigen Bewegung invertiert und so die unmarkierten NK-Zellen vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt, während die markierten Zellen durch das magnetische Feld in dem ersten Röhrchen gebunden blieben. Hierauf wurde die Zellzahl der NK-Zellfraktion bestimmt.

### 2.2.7.3 FACSVantage SE Cell Sorter

PBMCs wurden in vier sterilen FACS-Röhrchen in PBS resuspendiert und mit Antikörpern wie folgt markiert.

**Tabelle 2.14: Zellmarkierung mit Antikörpern für den FACSVantage SE Cell Sorter**

FACS-Röhrchen	Antikörper	Antikörpermenge in $\mu\text{l}$	Zellzahl	PBS in ml
Kontrollröhrchen	-	-	$1 \times 10^6$	0,1
Kontrollröhrchen	CD56-PE	4	$1 \times 10^5$	0,1
Kontrollröhrchen	CD3-FITC	5	$1 \times 10^5$	0,1
Probenröhrchen	CD3-FITC CD56-PE	100 200	$2 \times 10^8$	1

Aufgrund der hohen Zellzahl im Probenröhrchen war hier eine große Menge an Antikörpern notwendig, um die Zellen adäquat zu markieren.

Die Zellsuspensionen wurden für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 1200 U/min und 4°C für 5 min gewaschen. Die Zellsedimente in den Kontrollröhrchen wurden in je 500  $\mu\text{l}$  und das Sediment in dem Probenröhrchen in 1 ml kaltem PBS resuspendiert.

Die Zellen im Probenröhrchen wurden anschließend gefiltert, um Zellaggregationen zu vermeiden. Die Filterung wurde mit einem FACS-Röhrchen mit Zellfilterkappe durchgeführt. Durch das Filtern reduzierte sich die Zellzahl um ungefähr 50 %. Die

Zellkonzentration nach der Filterung sollte  $2 \times 10^7$  Zellen/ml PBS sein, deshalb war es wichtig, die PBS-Menge zu berechnen, in der die gefilterten Zellen resuspendiert werden sollten. Von den  $2 \times 10^8$  PBMCs im Probenröhrchen blieben so noch ca.  $1 \times 10^8$  Zellen übrig, die dann in 5 ml kaltem PBS aufgenommen werden mussten, um die gewünschte Konzentration zu erhalten.

Die Suspension wurde anschließend auf drei FACS-Röhrchen aufgeteilt, so dass man drei Probenröhrchen erhielt. Eine kleine Menge (~0,2 ml) zur Parametererstellung und weiteren Einstellung des Cell Sorters wurde in ein viertes Röhrchen gegeben.

Sowohl die Kontroll- als auch das Probenröhrchen wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Des Weiteren wurden mindestens ein frisches FACS-Röhrchen pro Probenröhrchen mit je 0,5 ml FCS vorbereitet, in denen die NK-Zellen aufgefangen wurden.

Die Zellisolation am FACSVantage SE Cell Sorter wurde freundlicherweise von Frau Dr. Maggie Wang (Flow Cytometry Unit, High Tech Centre, Westmead Millennium Institute) durchgeführt. Nach Einstellung der Parameter und Setzen der Zellgates mit Hilfe der Kontrollröhrchen und unter Verwendung der CellQuest-Software wurde das Probenröhrchen in die Maschine eingespannt. Die Maschine isolierte darauf automatisch die gewünschten Zellen, die dann in den vorbereiteten FACS-Röhrchen gesammelt wurden. Zuletzt wurden die Zahl und die Reinheit der isolierten Zellen bestimmt.

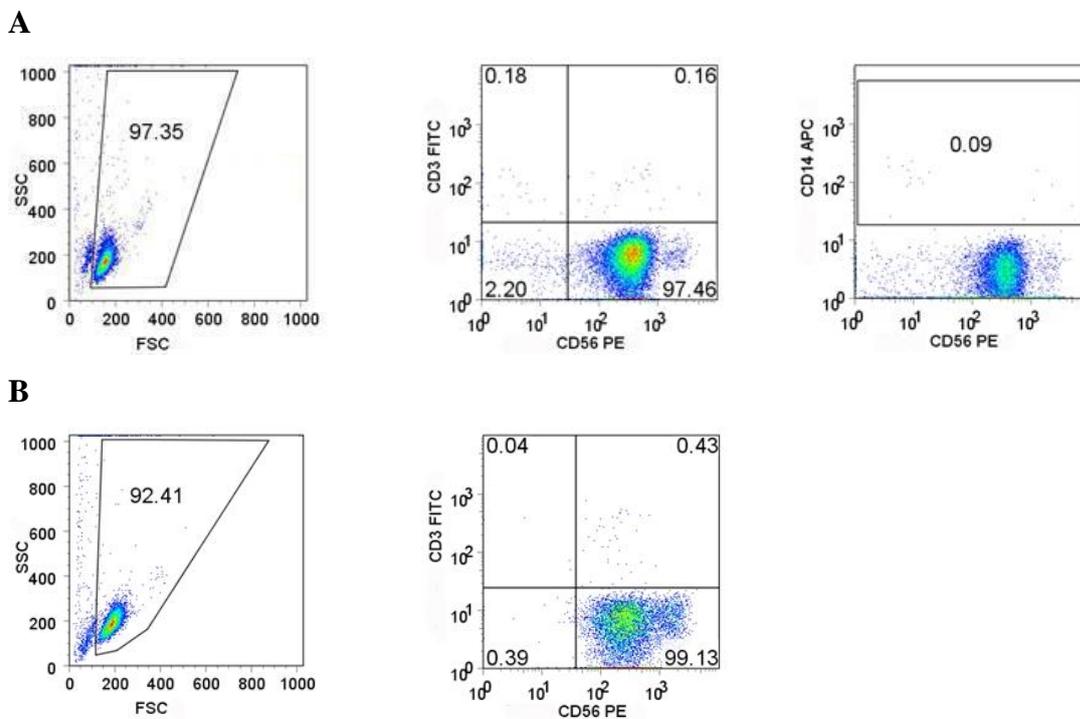
### **2.2.8 Bestimmung der NK-Zellreinheit**

Die Reinheit der NK-Zellen wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers überprüft. Hier wurde das FACSCanto-System und als Auswertungssoftware FACSDiva und FlowJo verwendet.

Für die Bestimmung der Zellreinheit nach der Isolation mit dem NK Cell Isolation Kit oder dem EasySep Human NK Cell Enrichment Kit wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit kaltem PBS bei 1200 U/min und 4°C gewaschen. Dann wurden die Zellen in 50 µl kaltes PBS und jeweils 2 µl CD3-FITC-, CD14-APC- und CD56-PE-Antikörpern oder geeigneten Isotypkontrollen resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Darauf wurden die so markierten Zellen mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Das Durchflusszytometer wurde mit den Isotypkontrollen kalibriert. Bei

sofortiger FACS-Analyse wurde die Zellsuspension nach dem Waschen in 200-300  $\mu$ l kaltes PBS aufgenommen, alternativ wurden die Zellen in 100  $\mu$ l Cytofix/Cytoperm bei 4°C über Nacht gelagert. Die NK-Zell-Reinheit betrug in der Regel 95-97 % (Abbildung 2.1 A).

Für die Überprüfung der Reinheit der mit dem FACSVantage SE Cell Sorter isolierten NK-Zellen wurde eine kleine Menge (200  $\mu$ l) der aufgefangenen Zellsuspension in ein frisches FACS-Röhrchen überführt. Die isolierten Zellen waren bereits mit Antikörpern markiert (Tabelle 2.14) und konnten so direkt mit dem Durchflusszytometer analysiert werden. Die Zellreinheit betrug nach der Isolation mit dem Cell Sorter konstant über 99 % (Abbildung 2.1 B).



**Abbildung 2.1: Überprüfung der NK-Zellreinheit**

Die Bestimmung der Zellreinheit erfolgte durchflusszytometrisch. Ergebnis nach Zellisolation mit dem NK Cell Isolation Kit/EasySep Human NK Cell Enrichment Kit (A) oder dem FACSVantage SE Cell Sorter (B). Bei (A) wurden die isolierten Zellen neben der Färbung mit anti-CD56-PE und anti-CD3-FITC auch mit anti-CD14-APC gefärbt. Es wurde ein Gate um die lebenden Zellen gelegt und CD56 gegen CD14 oder CD3 aufgetragen. Werte in %. FSC: Forward Scatter. SSC: Side Scatter.

## 2.2.9 Inkubation mit Pam-Lipopeptiden

Die NK-Zellen wurden mit den entsprechenden Pam-Lipopeptiden inkubiert und dann durchflusszytometrisch, mit quantitativer Real-Time-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

oder durch konfokale Mikroskopie analysiert.

#### **2.2.9.1 NK-Zellinkubation mit Pam24-4**

Nach der Zellisolation mit dem EasySep Human NK Cell Enrichment Kit oder dem NK Cell Isolation Kit wurden  $1 \times 10^6$  NK-Zellen/ml RF10 resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit  $10 \mu\text{M}$  Pam24-4-Lipopeptid versetzt. Als negative Kontrolle diente eine Probe mit DMSO.

Die Zellsuspensionen wurden dann für 24 h in einem 5 %-CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C gelagert.

#### **2.2.9.2 NK-Zellinkubation mit Pam30-5**

Für die Analyse der Effekte von Pam30-5 auf NK-Zellen wurde die Real-Time-PCR verwendet. Die Zellen wurden zuvor mit dem FACSVantage SE Cell Sorter isoliert und in RH10 (90 % RPMI 1640-Medium + 10 % AB-Human-Serum) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml RH10 resuspendiert. RH10 war 50:1 mit Penicillin und Streptomycin versetzt, um eine Kontamination der Zellen zu verhindern. Die Zellen wurden dann in FACS-Röhrchen überführt und  $10 \mu\text{M}$  Pam30-5 hinzugegeben. Eine mit DMSO versetzte Probe diente als Negativkontrolle.

Die Zellen wurden für 24 h bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C gelagert.

#### **2.2.9.3 Inkubation von NK-Zellen und MDDCs mit Pam30-5-FITC**

Für die Analyse mit dem konfokalen Mikroskop wurden NK-Zellen mit Pam30-5-FITC inkubiert. MDDCs wurden als positive Kontrolle verwendet und in gleicher Weise inkubiert.

Es wurden alle drei in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Isolationsmethoden verwendet.

Zwei Zeitpunkte wurden hier angesetzt. Zur Zellsuspension wurde entweder  $10 \mu\text{M}$  Pam30-5-FITC hinzugegeben und die Zellen direkt darauf mit PBS gewaschen, oder für 2 Stunden mit  $10 \mu\text{M}$  Pam30-5-FITC bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert und dann gewaschen.

### **2.2.10 Durchflusszytometrische Analyse der NK-Zellen**

Die Durchflusszytometrie wurde mit dem FACSCanto-System durchgeführt. Als Auswertungssoftware dienten FACSDiva und FlowJo. Für die Analyse der beiden Haupt-NK-Zellpopulationen, CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>, wurden die Zellen durchflusszytometrisch anhand der CD56-Expression markiert und so getrennt phänotypisiert. Die mit Pam24-4 inkubierten NK-Zellen wurden für die Analyse wie folgt vorbereitet.

#### **2.2.10.1 CD69-, HLA-DR- und TLR2-Expression auf der Zelloberfläche**

Die NK-Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und  $2 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu$ l kaltem PBS resuspendiert. Dann wurden jeweils 2  $\mu$ l CD3-PerCP-, CD56-PE-, CD69-APC-, HLA-DR-PE/Cy7- und TLR2-FITC-Antikörper oder geeignete Isotypkontrollen hinzugefügt.

Die Zellsuspensionen wurden für 30 min bei 4°C inkubiert und danach mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Bei sofortiger durchflusszytometrischer Analyse wurden die NK-Zellen in 200-300  $\mu$ l kaltem PBS resuspendiert, oder es wurde 100  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm hinzugegeben, um die Zellen bei 4°C über Nacht zu lagern.

#### **2.2.10.2 Intrazellulärer TLR2-Assay**

Nachdem die inkubierten NK-Zellen mit kaltem PBS gewaschen wurden, wurden sie in 50  $\mu$ l kaltem PBS mit jeweils 2  $\mu$ l CD56-PE- und CD3-PerCP-Antikörper zur Oberflächenfärbung resuspendiert und für 30 min bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden dann gewaschen, mit 100  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen der NK-Zellen mit kalter Permeabilisierungslösung (PBS mit 2 % FCS und 0,5 % Saponin) wurden sie in 50  $\mu$ l kalter Permeabilisierungslösung und 2  $\mu$ l TLR2-FITC-Antikörpern resuspendiert und bei 4°C für 30 min inkubiert. Vor der Analyse wurden die Zellen ein weiteres Mal mit kalter Permeabilisierungslösung gewaschen und zur sofortigen Verwendung mit 200-300  $\mu$ l kaltem PBS oder zur Lagerung bei 4°C über Nacht mit 100  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm versetzt.

## 2.2.11 PCR

Alle vorbereitenden Schritte zur quantitativen Real-Time-PCR wurden unter DNase- und RNase-freien Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

### 2.2.11.1 RNA-Isolation und Reverse Transkriptase-PCR

Die RNA (Ribonukleinsäure) der mit Pam24-4 oder Pam30-5 inkubierten NK-Zellen wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit isoliert. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben für die RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen. Die Zellen wurden lysiert und die RNA durch selektive Bindung an eine Membran und durch mehrmaliges Waschen von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Der Elutionsschritt der zu isolierenden RNA erfolgte in DNase-/RNase-freiem Wasser.

Mit dem Nanophotometer wurde die RNA spektralphotometrisch auf ihren Nukleinsäuregehalt und auf mögliche Verunreinigungen untersucht. Die Konzentration wurde bei 260 nm bestimmt. Die isolierte RNA wurde auf Eis gelagert und sofort in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Hierzu wurde der AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit und das Mastercycler ep gradient S-System verwendet. 1 µg RNA wurde mit DNase-/RNase-freiem Wasser zu einer Menge von 6 µl vermischt. Die RNA-Suspension wurde dann zu den Reagenzien des Kits hinzugegeben.

#### Ansatz pro Probe:

6 µl	1 µg RNA in DNase-/RNase-freiem Wasser
10 µl	2x cDNA Synthesis Master Mix
3 µl	0,1 µg/µl Random Primer Mix
1 µl	AffinityScript RT/ RNase Block Enzyme Mixture

Die Probenlösungen wurden dann im Mastercycler ep gradient S bei 25°C für 5 min und bei 42°C für 20 min inkubiert, um das Umschreiben der RNA in cDNA durch die im Enzym-Mix enthaltene Reverse Transkriptase zu ermöglichen. Die Reaktion wurde dann bei 95°C für 5 min beendet.

Die gewonnene cDNA wurde 1/10 mit DNase-/RNase-freiem Wasser verdünnt.

Die gleichen Schritte wurden auch mit Monozyten durchgeführt. Die Monozyten-cDNA

wurde als Standard für die Real-Time-PCR verwendet.

Zur Überprüfung des PCR-Produktes wurde darauf folgend eine Gelelektrophorese mit Proben der NK-Zell-cDNA, der Monozyten-cDNA und einer DNA-Leiter als Marker durchgeführt.

Die cDNA lagerte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

#### **2.2.11.2 Quantitative Real-Time-PCR**

Für die quantitative Real-Time-PCR wurden Primer von TLR2 und dem Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin verwendet. Für jede PCR-Reaktion wurden 5  $\mu$ l cDNA mit 12,5  $\mu$ l FastStart SYBR Green Master, 0,75  $\mu$ l 10  $\mu$ M forward- und 10  $\mu$ M reverse-Primer-Mix und 6,75  $\mu$ l DNase-/RNase-freiem Wasser gemischt.

Es wurden jeweils Duplikate bestimmt und eine non-template control-Probe mit 5  $\mu$ l DNase/RNase-freiem Wasser durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe mit Monozyten-cDNA wurde als Standard benutzt.

Die PCR-Röhrchen wurden in das Rotor-Gene 3000-System eingebracht und die PCR programmiert. Auf den einleitenden Schritt bei 50°C für 2 min folgten eine Denaturierung bei 95°C für 10 min, 40 Denaturierungszyklen bei 95°C für je 1 sec und 40 Annealing- und Polymerisierungszyklen bei 60°C für je 60 sec. Danach wurden die Proben auf 99°C erhitzt und die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die Daten wurden mit der Rotor-Gene 6000-Software analysiert und zu den Werten des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin normalisiert.

#### **2.2.12 Konfokale Mikroskopie**

Die Zellen wurden mit dem Leica TCS SP2-System analysiert. Es wurde ein 63X/1.4.N.A.-Objektiv mit einem Pinhole von 1 Airy-Unit benutzt. Die FITC- und GAM647-Bilder wurden sequentiell aufgenommen, um eine Überschneidung der Fluoreszenzen zu vermeiden. Die Aufnahmen wurden mit der Leica Confocal Software LCS ausgewertet.

Die Zellfixation und das Cytospinning wurden mit NK-Zellen und MDDCs durchgeführt, die mit Pam30-5-FITC inkubiert waren. Es wurden nur NK-Zellen mit Antikörpern gefärbt.

### **2.2.12.1 Zellfixation**

Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und gewaschen. Das Zellpellet wurde in PBS mit 2 % Paraformaldehyd in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert und für 20 min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden dann weiterverwendet oder bei 4°C gelagert.

### **2.2.12.2 Cytospinning**

Mittels der Shandon Cytospin 4 Cytozentrifuge wurden die Zellen auf Objektträger aufgebracht.

$5 \times 10^4$  Zellen (50  $\mu$ l) wurden in eine Cytofunnel-Probenkammer überführt, die mit einer Filterkarte auf dem Objektträger befestigt war. Die Zellen wurden dann bei 900 U/min für 3 min zentrifugiert und gelangten durch den Trichter auf den Objektträger, überschüssige Suspensionsflüssigkeit wurde durch den Filter aufgenommen.

Um den Zellspot wurde dann ein Kreis mit dem Dako Pen gezogen, der bei den folgenden Färbeschritten ein Verteilen der Antikörperlösung auf dem Objektträger verhinderte.

### **2.2.12.3 Zellfärbung**

30  $\mu$ l 0,1 % Triton-X wurde zu jedem NK-Zellspot gegeben und die Zellen dann für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellwände zu permeabilisieren. Danach wurden die Zellen ausgiebig in PBS gewaschen. Hierauf folgte das Blocken der Zellen mit 30  $\mu$ l 10 % Eselserum für 30 min bei 37°C. Die Objektträger mit den Zellen wurden nach dem Blocken nicht gewaschen, sondern nur getrocknet.

Die Antikörper wurden mit 10 % Eselserum verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Nach dem Trocknen wurde 30  $\mu$ l aufgereinigter CD56-Antikörper in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml oder eine entsprechende Isotypkontrolle pro NK-Zellspot verwendet. Die Zellen wurden für 45 min bei 37°C inkubiert, ausgiebig gewaschen und getrocknet. Dann wurden 30  $\mu$ l GAM647 als Sekundärantikörper in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml hinzugegeben und die Zellen für 3 min bei 37°C gelagert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser vorsichtig gespült und dann getrocknet. Auf jeden Zellspot wurde dann ein Tropfen ProLong Gold gegeben, um ein Ausbleichen der Färbung zu

verhindern, und das Deckglas darüber gelegt. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt.

Die Objektträger wurden in PBS bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.13 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Microsoft Excel 2010-Software. Es wurde der gepaarte zweiseitige T-Test benutzt. P-Werte unterhalb 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet. Die erhobenen Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

### 3 Ergebnisse

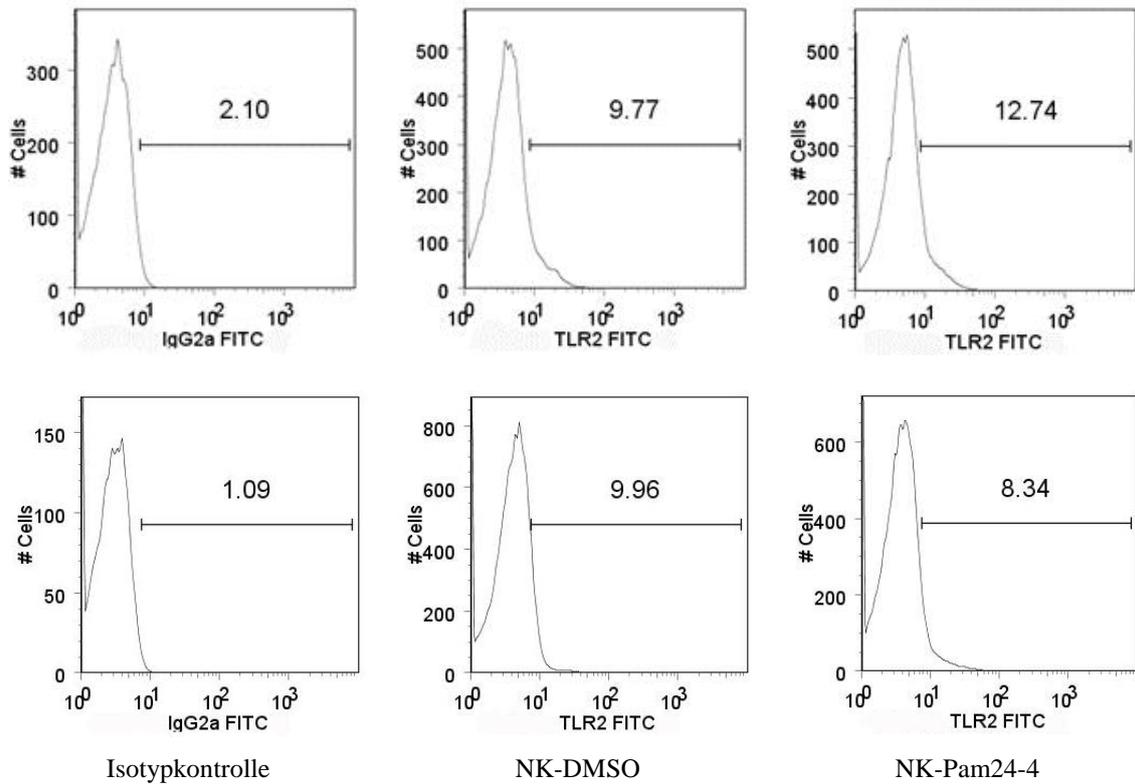
#### 3.1 Expression von TLR2 und HLA-DR auf NK-Zellen nach Pam24-4-Stimulation

Es konnte nachgewiesen werden, dass die TLR2-Expression auf der NK-Zelloberfläche nach Stimulation durch dem TLR2-Liganden LPG anstieg (6). Pam2Cys, hier mit dem Peptid 24-4 konjugiert, bindet auch an TLR2, kann diesen Rezeptor aktivieren und könnte möglicherweise die TLR2-Konzentration auf NK-Zellen erhöhen. HLA-DR wurde in niedriger Anzahl auf NK-Zellen gefunden (44, 64). Pam2Cys aktiviert dendritische Zellen und erhöht signifikant die Ausbildung von HLA-DR auf diesen Zellen (49).

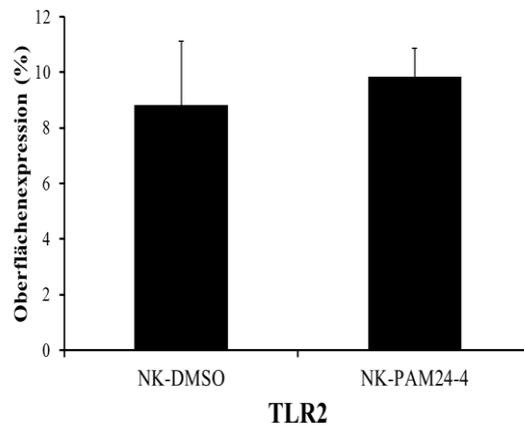
Die TLR2- und HLA-DR-Expression auf der Zelloberfläche wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt. Die mit DMSO inkubierten NK-Zellen wiesen sowohl TLR2 als auch HLA-DR in geringer Dichte auf ihrer Oberfläche auf, was darauf hindeutet, dass auch unstimulierte NK-Zellen diese Rezeptoren ausbilden können. Nach Inkubation für 24 h mit Pam24-4 stieg TLR2 auf den Zellen im Mittel nicht signifikant um 1 % auf  $9,8 \pm 1,0$  % an. Es gab sowohl Proben, die eine erhöhte Rezeptordichte nach Pam24-4-Stimulation zeigten, als auch NK-Zellpopulationen mit einer unveränderten bis leicht erniedrigten Anzahl an TLR2-Molekülen (Abbildung 3.1).

Die Expression von HLA-DR erhöhte sich unter gleichen Inkubationsbedingungen konstant in geringem, aber signifikantem Maße ( $p = 0,040$ ) um 1,5 % auf im Mittel  $4,9 \pm 1,2$  % (Abbildung 3.2). Die Anzahl von HLA-DR-positiven NK-Zellen ist diesen Ergebnissen nach gering. Eine Reaktion auf das Pam-Lipopeptid ist dennoch erkennbar.

A



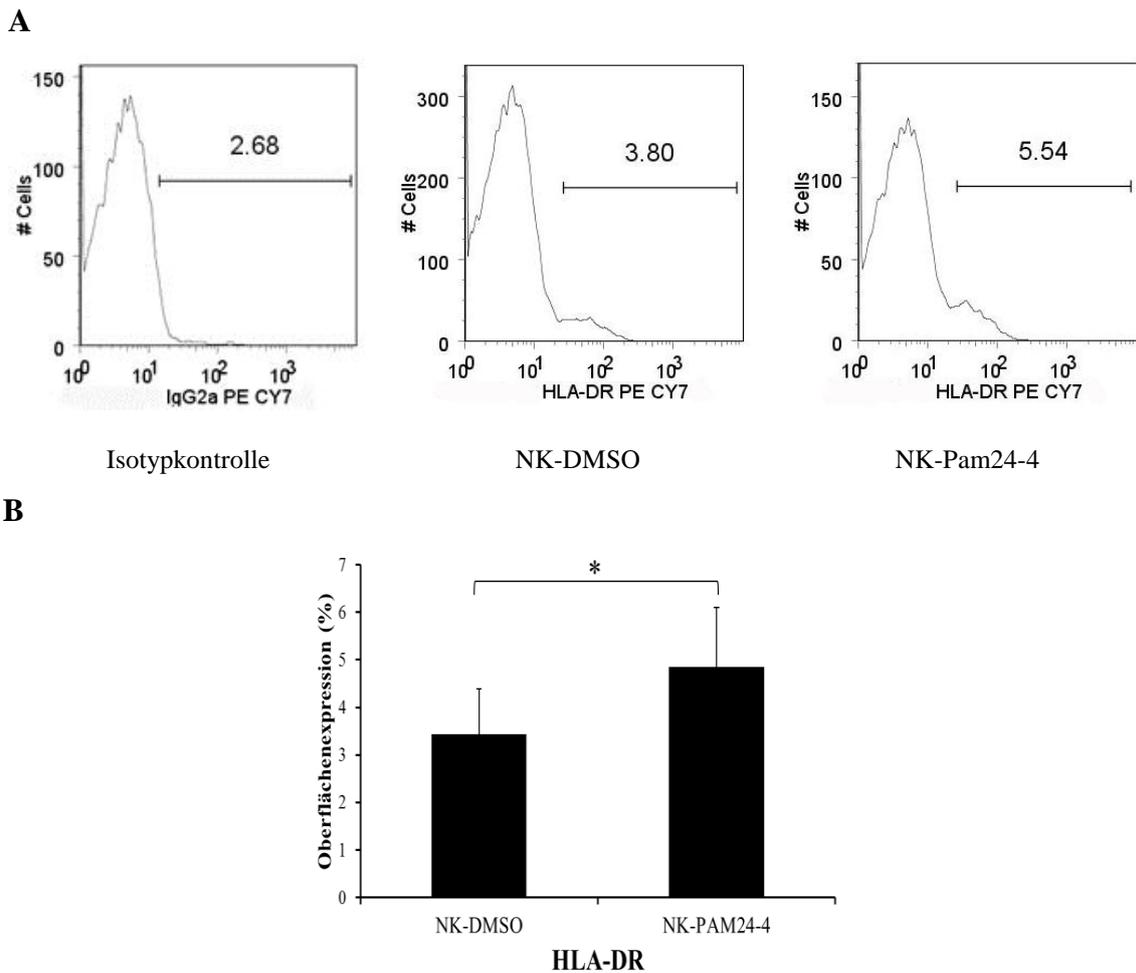
B



**Abbildung 3.1: TLR2-Oberflächenexpression nach Pam24-4-Stimulation**

NK-Zellen wurden für 24 h mit 10  $\mu$ M Pam24-4 inkubiert und mit anti-TLR2-FITC gefärbt. DMSO diente als negative Kontrolle. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Werte in %. Das Ergebnis ist repräsentativ für sechs unabhängige Experimente.

Die Histogramme (A) zeigen zwei exemplarische Ergebnisse. Während die TLR2-Dichte bei dem ersten Spender nach Pam24-4-Inkubation anstieg, fiel sie auf der Oberfläche der NK-Zellen des zweiten Spenders leicht ab. Das Säulendiagramm (B) zeigt Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse.



**Abbildung 3.2: HLA-DR-Oberflächenexpression nach Pam24-4-Stimulation**

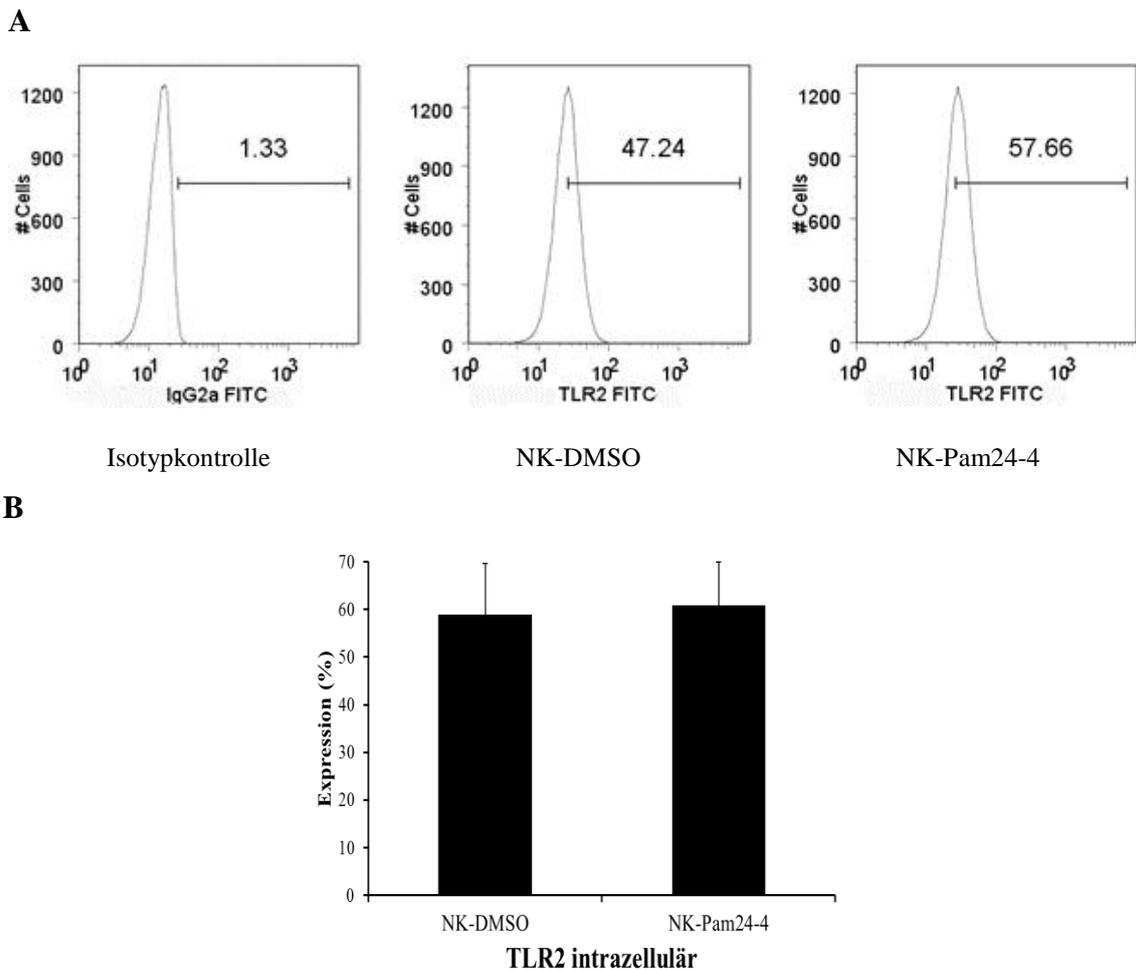
NK-Zellen wurden für 24 h mit 10  $\mu$ M Pam24-4 inkubiert und mit anti-HLA-DR-PE/Cy7 gefärbt. DMSO diente als negative Kontrolle. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Werte in %. Das Ergebnis ist repräsentativ für sechs unabhängige Experimente.

Die Histogramme (A) zeigen exemplarisch den Anstieg von HLA-DR nach Stimulation. Das Säulendiagramm (B) zeigt Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse. \*:  $p = 0,040$ .

### 3.2 Intrazelluläre TLR2-Expression nach Pam24-4- und Pam30-5-Stimulation

URONEN-HANSSON et al. fanden intrazellulären TLR2 in dendritischen Zellen (106). TLR2-mRNA wurde auch bei NK-Zellen beschrieben und eine Konzentrationserhöhung konnte durch den TLR2-Liganden LPG erreicht werden (6, 61).

Deshalb wurde hier überprüft, ob Pam24-4 oder Pam30-5 einen Anstieg der intrazellulären TLR2-Konzentration triggern kann. Zur Analyse wurden die Durchflusszytometrie und die quantitative Real-Time-PCR verwendet.



**Abbildung 3.3: Intrazelluläre TLR2-Expression nach Pam24-4-Stimulation**

NK-Zellen wurden für 24 h mit 10  $\mu$ M Pam24-4 inkubiert, permeabilisiert und mit anti-TLR2-FITC gefärbt. DMSO diente als negative Kontrolle. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Werte in %. Das Ergebnis ist repräsentativ für Daten von fünf Zellspendern.

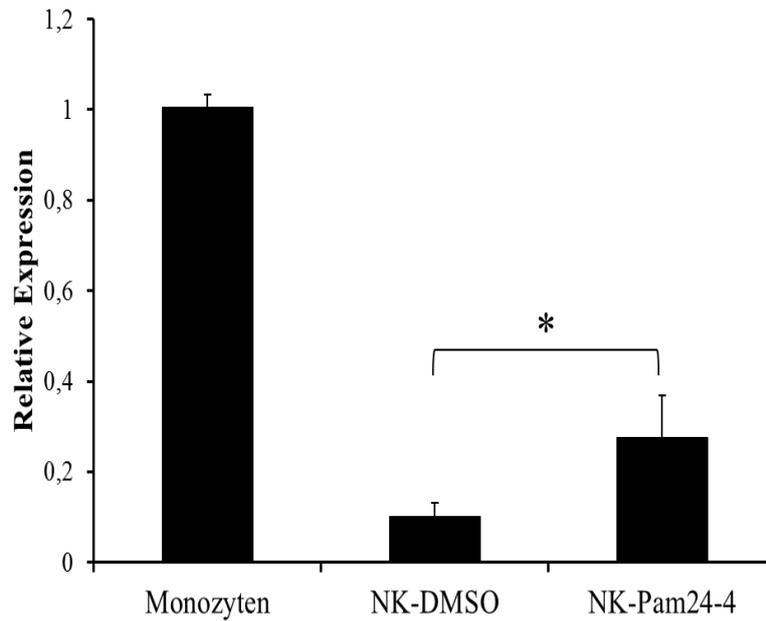
Die Histogramme (A) zeigen als Beispiel den Anstieg von intrazellulärem TLR2 nach Stimulation bei einem Spender. Das Säulendiagramm (B) zeigt Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse.

Durchflusszytometrisch zeigte sich, dass nicht aktivierte NK-Zellen intrazellulär TLR2 exprimieren ( $59,0 \pm 10,7$  %). Nach Inkubation mit dem Lipopeptid Pam24-4 stieg die Zahl der TLR2-positiven Zellen aber nicht signifikant an ( $60,8 \pm 9,1$  %, Abbildung 3.3).

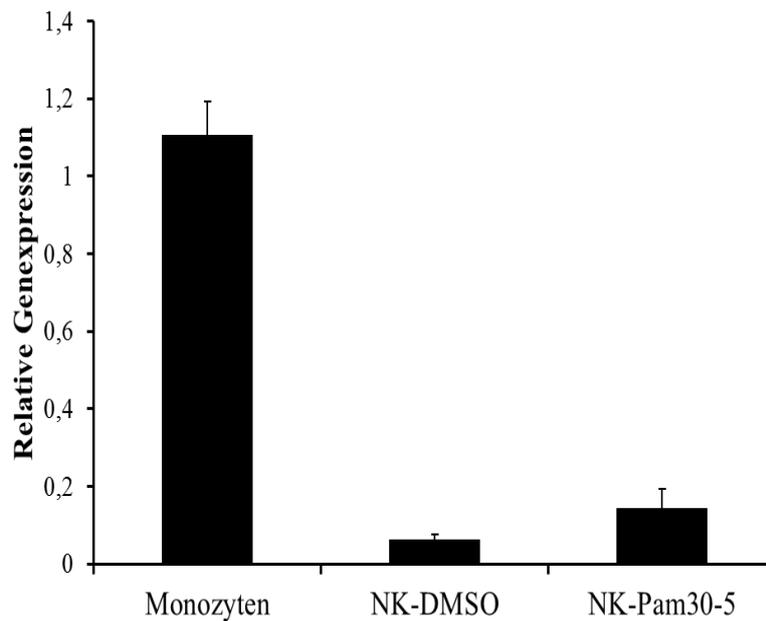
Die Resultate der quantitativen Real-Time-PCR bestätigten nicht die der FACS-Analyse. Pam24-4 löste hier eine signifikante Erhöhung der mRNA-Konzentration von TLR2 in den NK-Zellen aus ( $p = 0,047$ , Abbildung 3.4 A).

Pam30-5 konnte wiederum keinen konstanten Anstieg der TLR2-mRNA-Konzentration auslösen. Es zeigte sich zwar im Mittel eine Erhöhung, aber es gab auch Zellpopulationen, die nicht auf dieses Lipopeptid zu reagieren schienen ( $p = 0,126$ , Abbildung 3.4 B).

A



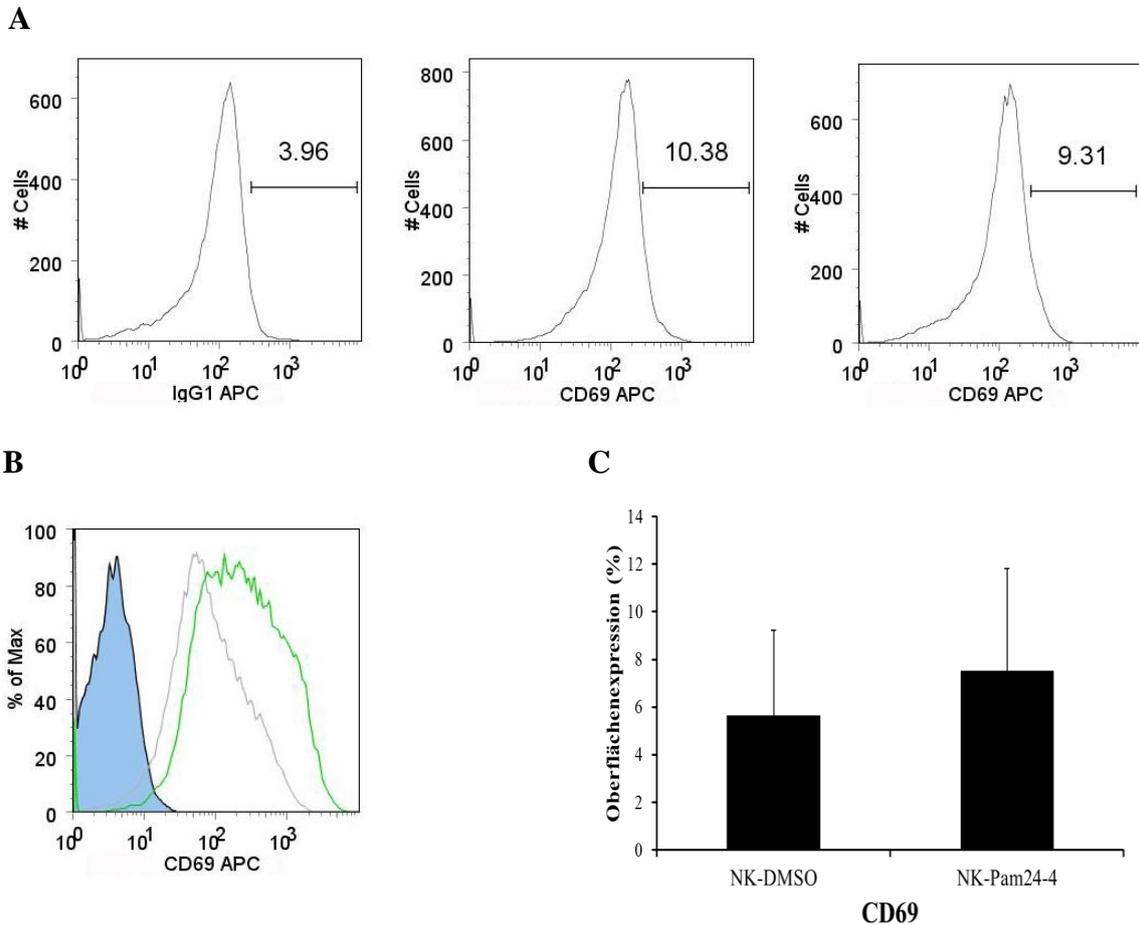
B



**Abbildung 3.4: Relative TLR2-mRNA-Expression in Monozyten und NK-Zellen**

NK-Zellen wurden für 24 h mit 10  $\mu$ M Pam24-4 (A) oder Pam30-5 (B) inkubiert. Monozyten dienten als positive und DMSO als negative Kontrolle. TLR2-mRNA wurde durch quantitative Real-Time-PCR analysiert. Die Daten wurden zu den Werten des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin normalisiert. Es werden Mittelwerte und Standardfehler gezeigt, die drei (A) und vier (B) Experimente repräsentieren. \*:  $p = 0,047$ .

### 3.3 Expression von CD69 auf NK-Zellen nach Pam24-4-Stimulation



#### Abbildung 3.5: CD69-Oberflächenexpression nach Pam24-4-Stimulation

NK-Zellen wurden für 24 h mit 10  $\mu$ M Pam24-4 inkubiert und mit anti-CD69-APC gefärbt. DMSO diente als negative Kontrolle. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Werte in %. Das Ergebnis repräsentiert Zellpopulationen von fünf Spendern.

(A) und (B) zeigen die FACS-Analysen von zwei Experimenten. (B): blau unterlegt: Isotyp, grau: NK-DMSO, grün: NK-Pam24-4. (C) zeigt Mittelwerte und Standardfehler der fünf Experimente.

CD69 ist ein Membranrezeptor auf Leukozyten, der bei Aktivierung der Zellen vermehrt ausgebildet wird (104, 112). Somit lässt sich dieses Molekül als Aktivierungsmarker, auch für NK-Zellen, verwenden.

Hier wurde wieder Pam24-4 als Stimulus für die Zellen verwendet. Die CD69-Expression auf der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch nach Inkubation für 24 h analysiert.

Die Mehrzahl der Proben zeigte einen Anstieg um 2 % auf im Mittel  $7,5 \pm 4,3$  %,

allerdings ließ sich keine signifikante Aktivierung der NK-Zellen durch Pam24-4 erkennen.

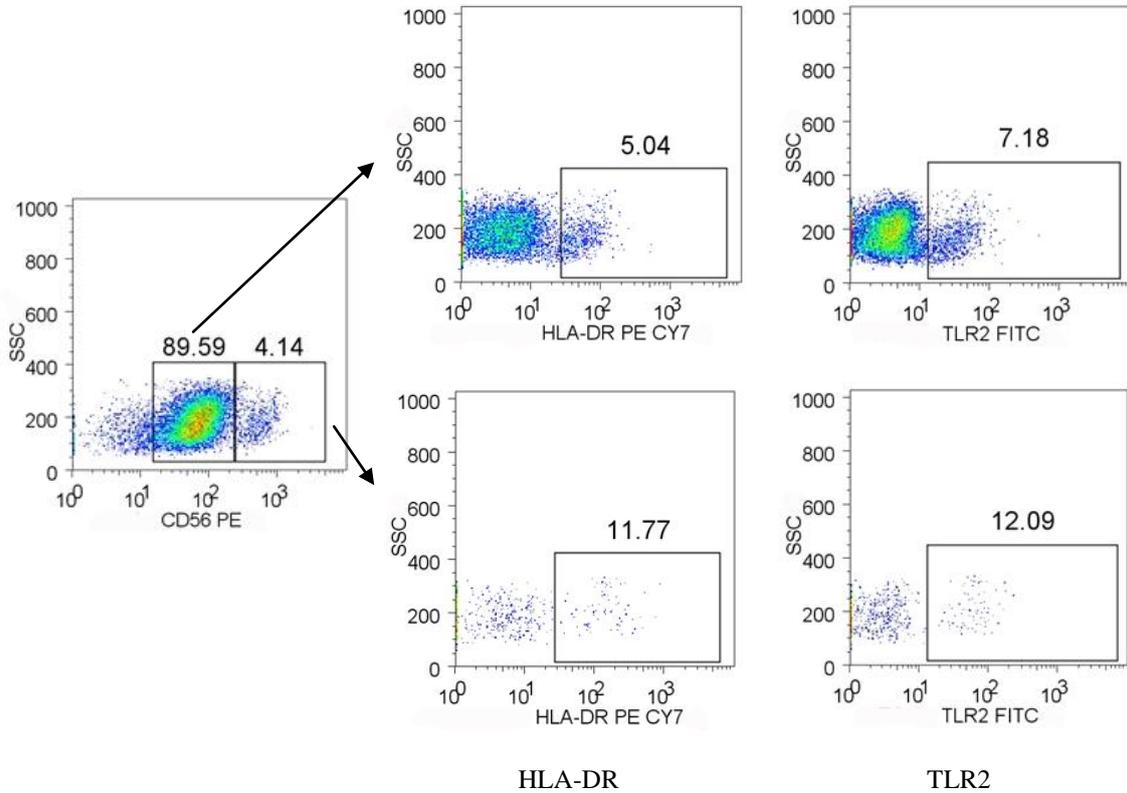
### 3.4 TLR2- und HLA-DR-Expression auf CD56<sup>bright</sup>- und CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen

Die beiden großen NK-Zellgruppen werden anhand der CD56-Expression auf der Zelloberfläche differenziert. Besonders auf CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen ließ sich HLA-DR nachweisen (64). Eine genauere Untersuchung dieses Rezeptors und auch des Toll-like-Rezeptors 2 vor und nach Pam24-4-Stimulation sollte die unterschiedliche Wirkung des Lipopeptides auf die beiden Zell-Subpopulationen aufzeigen.

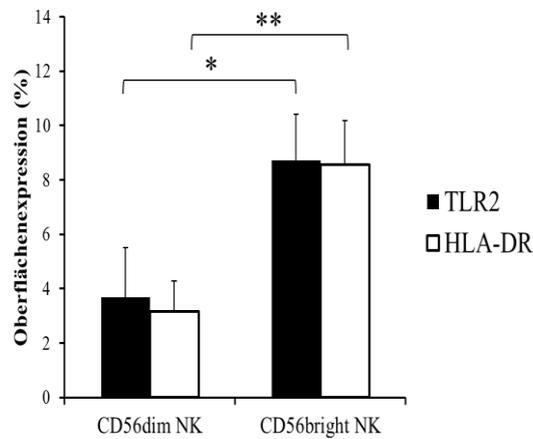
Die isolierten NK-Zellen wurden anhand ihrer CD56-Expression durchflusszytometrisch markiert und analysiert. Hierbei zeigten sich zwischen den CD56<sup>dim</sup>- und CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, die für 24 h mit Pam24-4 inkubiert wurden, signifikante Unterschiede. In der CD56<sup>bright</sup>-Population fanden sich im Vergleich zur CD56<sup>dim</sup>-Zellgruppe vermehrt Zellen, die sowohl HLA-DR als auch TLR2 exprimierten (HLA-DR:  $p = 0,033$ , TLR2:  $p = 0,019$ , Abbildung 3.6). Die CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen zeigten in  $8,6 \pm 1,6$  % der Fälle HLA-DR und  $8,7 \pm 1,7$  % dieser Zellen bildeten TLR2 auf der Oberfläche aus. Aber nur auf  $3,1 \pm 1,1$  % der CD56<sup>dim</sup>-Population ließ sich HLA-DR erkennen und TLR2 konnte nach der Lipopeptid-Stimulation auf  $3,7 \pm 1,8$  % dieser Zellen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse konnten bei den unstimulierten mit DMSO inkubierten Zellen nicht wiederholt werden (Abbildung 3.7).  $2,1 \pm 0,7$  % der unstimulierten CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen exprimierten HLA-DR und  $1,5 \pm 0,6$  % TLR2, während auf  $6,9 \pm 2,6$  % der unstimulierten CD56<sup>bright</sup>-Zellen HLA-DR und auf  $4,9 \pm 2,8$  % TLR2 gefunden wurde. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Zellgruppen stellten sich als nicht signifikant dar (HLA-DR:  $p = 0,196$ , TLR2:  $p = 0,361$ ).

A



B

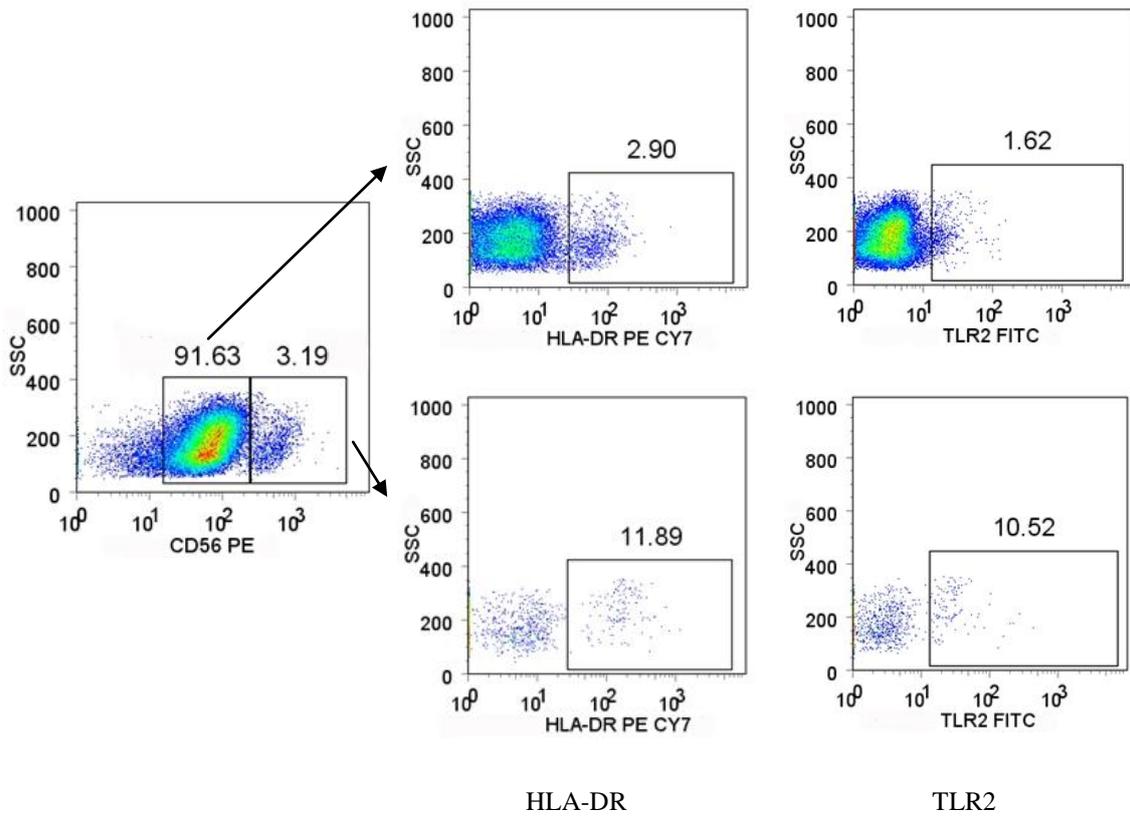


**Abbildung 3.6: Oberflächenphänotypisierung von CD56<sup>dim</sup>- und CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen auf HLA-DR und TLR2 nach Inkubation mit Pam24-4**

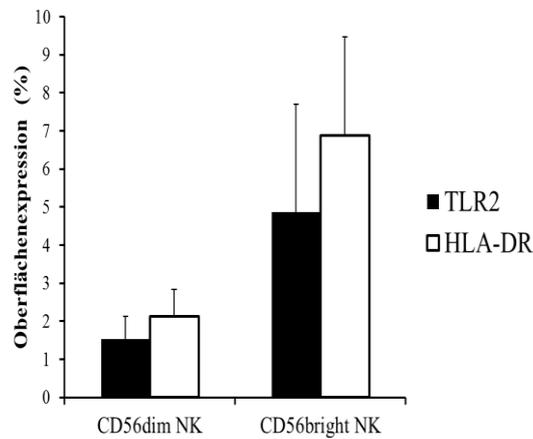
NK-Zellen wurden für 24 h mit 10  $\mu$ M Pam24-4 inkubiert und mit anti-CD56-PE, anti-HLA-DR-PE/Cy7 und anti-TLR2-FITC gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Es wurde je ein Gate um die CD56<sup>dim</sup>- und die CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen gelegt und diese Populationen auf ihre HLA-DR- und TLR2-Expression analysiert. Werte in %. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Die Punktwolkendiagramme (A) zeigen HLA-DR und TLR2 auf CD56<sup>dim</sup>- (oben) und CD56<sup>bright</sup>-Zellen (unten) eines Spenders als Beispiel. Das Säulendiagramm (B) zeigt Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse der drei Experimente. \*:  $p = 0,019$ , \*\*:  $p = 0,033$ .

A



B

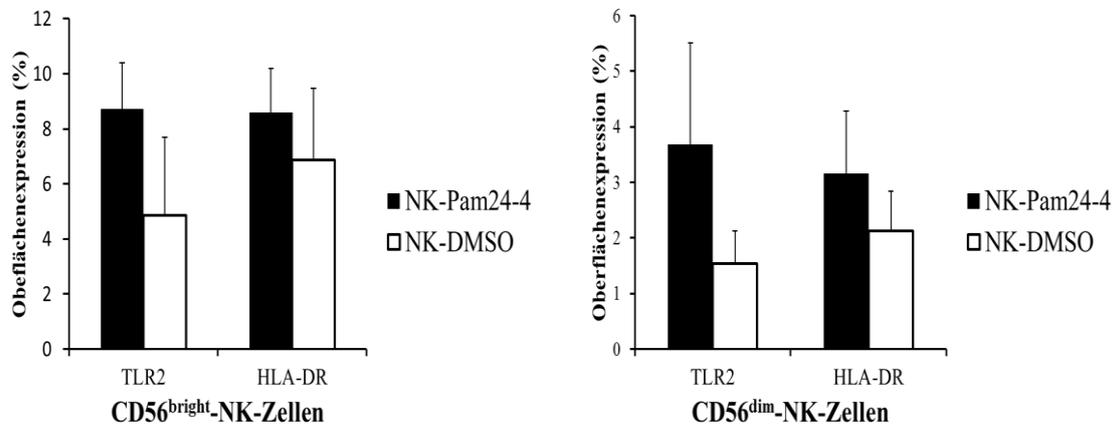


**Abbildung 3.7: Oberflächenphänotypisierung von unstimulierten CD56<sup>dim</sup>- und CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen auf HLA-DR und TLR2**

NK-Zellen wurden in DMSO inkubiert und mit anti-CD56-PE, anti-HLA-DR-PE/Cy7 und anti-TLR2-FITC gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Es wurde je ein Gate um die CD56<sup>dim</sup>- und die CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen gelegt und diese Populationen auf ihre HLA-DR- und TLR2-Expression analysiert. Werte in %. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Punktwolkendiagramme (A) zeigen HLA-DR und TLR2 auf CD56<sup>dim</sup>- (oben) und CD56<sup>bright</sup>-Zellen (unten) eines Spenders als Beispiel. Das Säulendiagramm (B) zeigt Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse der drei Experimente.

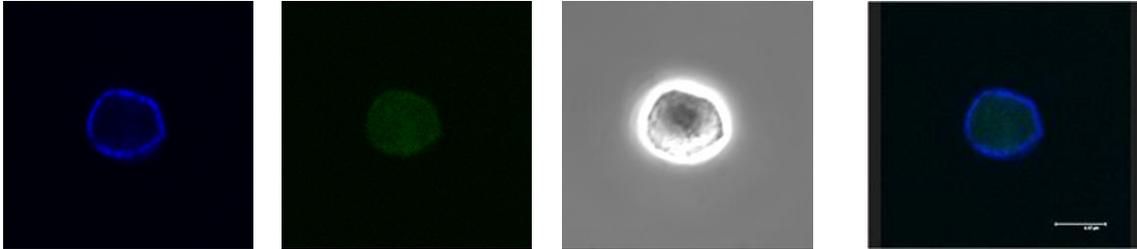
Diese Daten ließen auch einen Vergleich der HLA-DR- und TLR2-Expression vor und nach Pam24-4-Stimulation innerhalb der jeweiligen NK-Zell-Subpopulation zu. Hier ergab sich sowohl bei den CD56<sup>bright</sup>-, als auch bei den CD56<sup>dim</sup>-Zellen kein signifikanter Anstieg der TLR2- und der HLA-DR-Expression nach der Inkubation mit dem Lipopeptid. Es konnte jedoch eine Erhöhung der Molekülanzahl auf den Zellen nach Stimulation gemessen werden (Abbildung 3.8). Die Zunahme der TLR2-positiven CD56<sup>bright</sup>-Zellen war die deutlichste ( $p = 0,078$ ), während die der HLA-DR-Dichte geringer war ( $p = 0,251$ ). Auf den CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen fielen die Unterschiede zwischen den mit Pam24-4 stimulierten und den nicht stimulierten Zellen ebenfalls gering aus (HLA-DR:  $p = 0,207$ , TLR2:  $p = 0,403$ ).



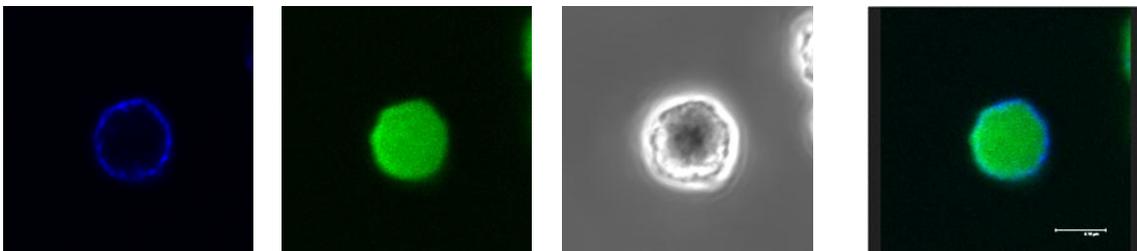
**Abbildung 3.8: Vergleich der HLA-DR- und TLR2-Expressionsänderung innerhalb der Subpopulationen zwischen unstimulierten (NK-DMSO) und stimulierten (NK-Pam24-4) Zellen**  
 NK-Zellen wurden in DMSO oder mit 10  $\mu\text{M}$  Pam24-4 für 24 h inkubiert und mit anti-CD56-PE, anti-HLA-DR-PE/Cy7 und anti-TLR2-FITC gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Werte in %. Ergebnisse repräsentieren drei Versuchsdurchführungen. Es werden Mittelwerte und Standardfehler angegeben.

### 3.5 Aufnahme von Pam30-5 in die NK-Zelle

A



B



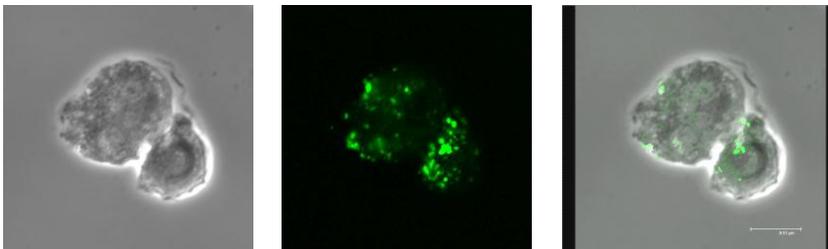
TLR2

Pam30-5

Transmissionsbild

Überlagerungsbild

C

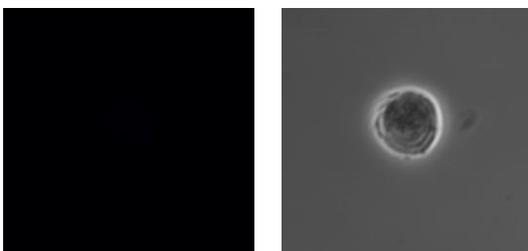


Transmissionsbild

Pam30-5

Überlagerungsbild

D



IgG1

Überlagerungsbild

#### Abbildung 3.9: Aufnahme von Pam30-5 in NK-Zellen

Zu den NK-Zellen wurde Pam30-5-FITC hinzugegeben und die Zellen danach sofort gewaschen (0 h-Zeitpunkt, A), oder für 2 h inkubiert (B). Die NK-Zellen wurden dann mit aufgereinigtem anti-CD56 und GAM647 oder entsprechender Isotypkontrolle (D) gefärbt. Als positive Kontrolle dienten mit Pam30-5-FITC inkubierte MDDCs (C). Die abgebildeten Zellen repräsentieren drei Experimente.

ERIKSSON et al. konnten die Aufnahme von Pam2Cys in dendritischen Zellen mit dem konfokalen Mikroskop darstellen (30).

In dieser Arbeit erfolgte nun die Überprüfung, ob Pam2Cys, mit dem HSV-2-Peptidpitop 30-5 konjugiert, von NK-Zellen aufgenommen wird und intrazellulär mit dem konfokalen Mikroskop nachzuweisen ist.

Pam30-5 ließ sich nach 0 h nicht in den NK-Zellen nachweisen (Abbildung 3.9 A). Nach einer zweistündigen Inkubation mit dem Lipopeptid schienen die Moleküle jedoch das Innere der NK-Zellen fast komplett auszufüllen (Abbildung 3.9 B). Die Aufnahme von Pam30-5 in MDDCs erfolgte dagegen punktuell (Abbildung 3.9 C). Diese Ergebnisse konnten durch Wiederholung der Versuche mit Zellen weiterer Spender bestätigt werden.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit**

Um die weltweite Ausbreitung von Herpes-Simplex-Infektionen zu minimieren, wird eine prophylaktische Impfung gegen diese Viren benötigt, die sowohl Erkrankung als auch Infektion verhindert (51). Pam2Cys, ein synthetisches Lipopeptid, ist ein vielversprechendes Impfadjuvans, welches auch in einer HSV-Vakzine eingesetzt werden könnte (111). Es ist bekannt, dass Pam2Cys als TLR2-Ligand an dendritische Zellen bindet, diese aktiviert und die Expression von MHC II-Molekülen, insbesondere HLA-DR, auf der Zelloberfläche erhöht (49). Natürliche Killerzellen sind ausschlaggebend an der Bekämpfung vieler viraler Infektionen beteiligt und sind unersetzlich für eine effiziente Immunantwort (14). TLR2 wurde in und auf NK-Zellen gefunden und der TLR2-Ligand LPG erhöhte zudem sowohl die TLR2-Moleküle auf der Zelloberfläche als auch die TLR2-mRNA in NK-Zellen (6, 48). TLR2 könnte also auch auf NK-Zellen für die Bindung von Pam2Cys verantwortlich sein. Ferner werden NK-Zellen geringe antigenpräsentierende Eigenschaften zugesprochen, da man auf ihnen MHC II-Moleküle, insbesondere HLA-DR, nachweisen konnte (44, 64).

In dieser Studie wurde ein potentieller HSV-Impfstoff, bestehend aus Pam2Cys, welches mit dem immundominanten Peptid 24-4 oder dem Peptid 30-5 des Glykoproteins D aus HSV-2 konjugiert wurde, verwendet (56).

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkungen von Pam24-4 oder Pam30-5 auf NK-Zellen hinsichtlich der Aktivierung dieser Zellen und der Ausprägung von TLR2 und HLA-DR zu untersuchen und die Rolle von NK-Zellen in der Immunantwort auf diese potentiellen Impfstoffe besser zu verstehen.

### **4.2 Einflüsse von Pam24-4 und Pam30-5 auf NK-Zellen**

#### **4.2.1 Die TLR2-Expression**

Die TLR2-Expression auf NK-Zellen nach Lipopeptid-Stimulation wurde in der

vorliegenden Arbeit untersucht, um zu erkennen, ob TLR2 auch auf NK-Zellen der entscheidende Rezeptor für die Bindung für Pam2Cys ist. Da eine Erhöhung der TLR2-Expression auf der Zelloberfläche durch den TLR2-Liganden Leishmania Lipophosphoglykan nachgewiesen werden konnte (6), wurde hier die Hypothese aufgestellt, dass mit Pam24-4 und Pam30-5 ähnliche Resultate erreicht werden können und diese somit einen eindeutigen Hinweis für die Spezifität dieses Rezeptors für Pam2Cys auch auf NK-Zellen liefern.

Durchflusszytometrisch ließ sich diese Hypothese aber nicht bestätigen. NK-Zellen zeigten sowohl unstimuliert als auch nach Inkubation mit dem Lipopeptid in geringem Maße TLR2 auf der Zelloberfläche. Eine Zunahme der TLR2-positiven Zellen nach Stimulation ließ sich nicht bestätigen, die Expression verblieb auf einem niedrigen Level von 9 - 10 % (Abbildung 3.1).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Auswertung der FACS-Daten in Bezug auf Veränderungen der TLR2-Expression innerhalb der NK-Zell-Subpopulationen. Sowohl die durch Pam24-4 stimulierten NK-Zellen der CD56<sup>bright</sup>-Population, als auch die Zellen der CD56<sup>dim</sup>-Gruppe zeigten öfter TLR2 auf ihrer Oberfläche als unstimulierte Zellen der jeweiligen Subpopulation, jedoch waren die Anstiege der TLR2-Expression sehr gering (Abbildung 3.8).

Dennoch lieferte die durchflusszytometrische Analyse der CD56<sup>dim</sup>- und CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen weitere interessante Auskünfte über die TLR2-Expression nach Pam24-4-Stimulation. CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen reagierten auf das Lipopeptid stärker, als die CD56<sup>dim</sup>-Zellen. Nach der Stimulation konnte zwischen den beiden Zellgruppen ein signifikanter Unterschied der TLR2-Expression erkannt werden, der bei den inaktiven Zellen so nicht vorhanden war (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7). Auch wenn die Unterschiede innerhalb der CD56<sup>bright</sup>-Population, wie bereits erwähnt, nicht so deutlich ausfielen (Abbildung 3.8), zeigen diese Ergebnisse, dass CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen mehr TLR2 als die restlichen NK-Zellen exprimieren und damit, wenn sie auch nur 5 - 10 % der gesamten NK-Zellpopulation ausmachen, einen erheblichen Anteil an der Aufnahme von Pam24-4 in das Immunsystem innehaben und eine bedeutende Rolle in der Auslösung einer Immunreaktion spielen könnten.

Mehrere Studien konnten TLR2-mRNA in NK-Zellen nachweisen (48, 61). Eine direkte

intrazelluläre Färbung von TLR2 in dendritischen Zellen gelang URONEN-HANSSON et al. (106). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass sich die TLR2-Expression nach Pam2Cys-Stimulation intrazellulär ändern könnte. Durchflusszytometrisch konnte TLR2 in ungefähr 60 % der NK-Zellen nachgewiesen werden, eine Steigerung der TLR2-Expression in der Zelle wurde durch Pam2Cys allerdings nicht erreicht (Abbildung 3.3).

Die Detektion von zahlreichem intrazellulärem TLR2 und einer nur geringen Oberflächenexpression lässt eine weitere Hypothese zu, die durch die bereits erwähnte Studie von URONEN-HANSSON et al. an dendritischen Zellen unterstützt wird (106). Die Abwesenheit von TLR2 auf der Zelloberfläche der dendritischen Zellen lässt vermuten, dass die Internalisierung des dort eingesetzten Moleküls möglicherweise durch einen noch unbekanntem Rezeptor erfolgte.

Auch an der Bindung und insbesondere an einer Phagozytose der Pam-Lipopeptide in die NK-Zelle könnte ein weiterer Rezeptor beteiligt sein. TLR2 scheint in dendritischen Zellen mit Mikrotubuli und Phagosomen assoziiert zu sein (106). Der Rezeptor könnte in dieser Form auch in NK-Zellen vorkommen und hauptsächlich dort mit Pam2Cys in Kontakt treten. Da immerhin 60 % der NK-Zellen in der vorliegenden Arbeit intrazellulärem TLR2 aufwies, könnten weitere Untersuchungen zur genauen Lokalisation von TLR2 im Zellinneren, in Bezug auf die Zellorganellen, weitere wichtige Einblicke in die Verteilung des Rezeptors in einer NK-Zelle liefern.

Für die Analyse durch die Real-Time-PCR wurden Pam24-4 und Pam30-5 eingesetzt, während die Durchflusszytometrie nur Pam24-4 verwendete. Nach der Inkubation der NK-Zellen mit Pam24-4 zeigte sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen der FACS-Analyse, ein signifikanter Anstieg der TLR2-mRNA. Diese Daten ließen hoffen, dass Pam30-5 ähnliche Wirkungen auf NK-Zellen haben würde. Die Real-Time-PCR wurde daraufhin wiederholt mit NK-Zellen durchgeführt, die mit Pam30-5 inkubiert worden waren. Leider konnte dieses Lipopeptid die Ergebnisse, die mit Pam24-4 erreicht wurden, nicht bestätigen (Abbildung 3.4). Möglich wäre, dass Pam2Cys in Verbindung mit dem Peptid 24-4 eine stärkere Triggerung von TLR2 hervorruft als Pam2Cys mit 30-5. Diese Erhöhung der TLR2-Konzentration auf der Genebene steht in Kontrast zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie. Allerdings ist die Detektion von mRNA

weitaus genauer und erkennt minimale Veränderungen der Genexpression, während die FACS-Analyse TLR2 nur auf der Proteinebene darstellt und weit weniger sensitiv ist.

Die Ergebnisse korrelieren zudem weitestgehend mit einer Studie von MARCENARO et al. (65). Die Dichte an TLR2 auf der NK-Zelloberfläche war dort sehr gering, sowohl auf unstimulierten als auch auf aktivierten Zellen. TLR2-mRNA konnte auch nachgewiesen werden. Die Konzentration der mRNA stieg nach Stimulation der Zellen an. BECKER et al. konnten eine Erhöhung von TLR2 mit dem Durchflusszytometer und der Real-Time-PCR nachweisen (6). Hier ist jedoch zu betonen, dass nicht Pam2Cys, sondern LPG als TLR2-Ligand und Stimulus eingesetzt wurde, also ein Molekül, welches gegenüber Pam2Cys eine andersartige Struktur mit einem Lipid- und einem Saccharidanteil besitzt und das für seine immunstimulierenden Eigenschaften bekannt ist.

Die hier erarbeiteten Daten deuten darauf hin, dass TLR2 auch auf NK-Zellen an der Bindung von Pam2Cys zumindest beteiligt ist. Es kann aber noch nicht ausgeschlossen werden, dass ein weiterer Rezeptor in diesem Prozess mit TLR2 zusammenarbeitet. Zu beachten ist auch, dass eine Erhöhung der TLR2-Konzentration auf der Zelloberfläche für eine Bindung der Lipopeptide nicht zwingend notwendig ist. Möglicherweise kommt es in NK-Zellen zur vermehrten intrazellulären Bindung von TLR2 an den noch unbekanntem Rezeptor, und nicht zur Oberflächenexpression, was teilweise die Diskrepanz von RNA- und Proteindaten erklären könnte. Genauere Untersuchungen sind nötig, um die Rolle von TLR2 in NK-Zellen weiter zu entschlüsseln, zum Beispiel mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie, die eine mögliche Kolo-kalisation von Pam24-4 und TLR2 in NK-Zellen aufdecken könnte.

### **4.2.2 Die HLA-DR-Expression**

Die schon vorhandenen Ergebnisse zum Anstieg des HLA-DR-Rezeptors auf dendritischen Zellen (17, 49, 111) nach Pam2Cys-Stimulation sollten in der vorliegenden Arbeit auf NK-Zellen übertragen werden.

Die hier erbrachten Resultate sind durchaus mit denen der vorhergegangenen Studien vergleichbar. Es war möglich, auf NK-Zellen einen signifikanten Anstieg von HLA-DR festzustellen (Abbildung 3.2). Die Ausbildung von HLA-DR beschränkte sich nach der

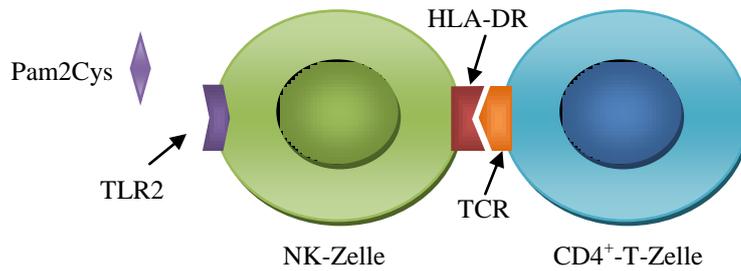
Inkubation mit Lipopeptiden auf ungefähr 5 %, während ungefähr 70 - 80 % der dendritischen Zellen der oben genannten Arbeiten diesen Rezeptor nach Stimulation exprimierten. Hier muss aber bedacht werden, dass dendritische Zellen „professionelle“ antigenpräsentierende Zellen sind und es somit eine zentrale Aufgabe für sie ist, fremde Antigene über MHC II-Moleküle weiteren Zellen des Immunsystems anzubieten. Die Arbeiten, die HLA-DR auf NK-Zellen nachgewiesen haben, konnten dies in relativ hohem Maße auf durch Interleukine aktivierte NK-Zellen (44), oder nur in geringem Maße auf CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen (64). Die Konzentration von HLA-DR auf den Zellen in der vorliegenden Arbeit korreliert also mit den schon bekannten Studienergebnissen. NK-Zellen könnten so über die Antigenpräsentation, zusätzlich zur IFN- $\gamma$ -Produktion, CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aktivieren und eine wirkungsvolle Immunreaktion auf den Impfstoff unterstützen.

Mit der Analyse der CD56<sup>bright</sup>- und CD56<sup>dim</sup>-Subpopulationen konnte diese Feststellung noch weiter spezifiziert werden. CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen zeigten nach Kontakt mit den Lipopeptiden eine stärkere Expressionssteigerung von HLA-DR-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, als ihre CD56<sup>dim</sup>-Verwandten (Abbildung 3.6, Abbildung 3.7). Innerhalb der Zellgruppen waren die Unterschiede zwischen inaktiven und inkubierten Zellen nicht so stark ausgeprägt, aber zugunsten der CD56<sup>bright</sup>-Population vorhanden (Abbildung 3.8).

Hieraus lässt sich den CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen eine besondere Bedeutung im Sinne der Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen zuweisen. Dieser kleine Teil der gesamten NK-Zellpopulation hält sich hauptsächlich in sekundären lymphatischen Organen auf, wo CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktiviert werden (31), kann aber auch zu Entzündungsherden wandern (108). CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen könnten also Antigene, hier die als Vakzine verwendeten Lipopeptide, aufnehmen und diese in den sekundären lymphatischen Organen weiteren Immunzellen präsentieren.

Dennoch sollten weitere Untersuchungen beide NK-Zellpopulationen einschließen und diese vergleichen. Die Interaktionen mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen müssen veranschaulicht werden. Der Schwerpunkt sollte auf dem möglichen Zell-zu-Zell-Kontakt zwischen NK- und T-Zellen liegen. Denn der HLA-DR-Rezeptor auf NK-Zellen, insbesondere auf CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, könnte eine solide Brücke zum erworbenen Immunsystem

und somit zu den T-Zellen darstellen (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Die mögliche Interaktion zwischen NK- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen über HLA-DR**

Pam2Cys bindet über TLR2 oder ein alternatives Molekül eine NK-Zelle, wird möglicherweise durch Bindung an einen noch unbekanntem Rezeptor internalisiert und über HLA-DR dem T-Lymphozyt präsentiert. TCR: T-Zell-Rezeptor.

### 4.2.3 Die CD69-Expression

CD69 ist ein Oberflächenrezeptor, der nach der Aktivierung von Leukozyten auf deren Zelloberfläche ausgebildet wird (87, 104). Auch auf aktivierten NK-Zellen lässt sich dieser Rezeptor nachweisen (65).

Die Mehrzahl der Experimente zeigte einen CD69-Anstieg auf der Zelloberfläche. Auf der anderen Seite schienen einige Spenderzellpopulationen nicht durch das Lipopeptid aktiviert zu werden (Abbildung 3.5). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Ergebnisse der HLA-DR- und TLR2-Phänotypisierung klar die CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen in den Vordergrund stellen. Wie schon erwähnt, machen diese Zellen weniger als 10 % aller NK-Zellen aus. Wenn sie hauptsächlich die Vakzine aufnehmen und die große CD56<sup>dim</sup>-Gruppe hier nur eine untergeordnete Rolle spielt, fällt auch die Aktivierung der gesamten NK-Zellpopulation, und somit der Anstieg von CD69 gering aus. Eine genauere Analyse der beiden Zellgruppen auf ihre CD69-Expression könnte die Unterschiede detaillierter aufdecken.

Eine der Hauptaufgaben der aktivierten CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen ist die IFN- $\gamma$ -Produktion (31). IFN- $\gamma$  würde sich also als ein genauer Marker für die Aktivierung dieser Zellen anbieten. Falls Pam2Cys eine IFN- $\gamma$ -Ausschüttung triggern könnte, wäre dies ein weiterer Beweis für die Fähigkeit dieses Lipopeptids, NK-Zellen, genauer CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, zu aktivieren und so eine Immunantwort zu initiieren.

### 4.3 Aufnahme von Pam30-5 in die NK-Zelle

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnte eine Aufnahme von Pam30-5 in NK-Zellen dargestellt werden.

Auf der Oberfläche der Zellen, die das Lipopeptid phagozytierten, wurde CD56 ubiquitär und in hoher Anzahl detektiert. Diese Erkenntnis bestätigt die oben genannten Resultate hinsichtlich der Fähigkeit der CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen zur Aufnahme des Impfstoffes.

Allerdings schien die NK-Zelle nach 2 h komplett mit dem Molekül ausgefüllt zu sein. Die positive Kontrolle, dendritischen Zellen, nahm Pam30-5 auch auf, zeigte aber eine punktuelle Färbung des Zellinneren. Die ganzheitliche Färbung der NK-Zellen könnte auch auf einen Färbefehler hindeuten. Diese Problematik konnte leider nicht gelöst werden. Wiederholungen der Ergebnisse und Veränderungen der Lipopeptid-Antikörper-Konzentration konnten die Färbung nicht „positiv“ beeinflussen.

Es wurde hier nur ein 0 h- und ein 2 h-Zeitpunkt untersucht. Nach sofortigem Waschen der Zellen war Pam30-5 in den Zellen nicht erkennbar, nach 2 h füllte es die Zelle nahezu aus. Mehrere Zeitpunkte, nach 5, 30 und 60 Minuten, werden detailliertere Auskünfte über die Dauer des Aufnahmeprozesses geben. In dendritischen Zellen konnte eine Resorption von Pam2Cys schon nach 5 Minuten festgestellt werden (30).

### 4.4 Einschränkungen und Ausblick

Die Wirkung von Pam-Lipopeptiden wurde bisher hauptsächlich an dendritischen Zellen getestet. NK-Zellen spielen in der Impfforschung noch immer eine untergeordnete, wenn auch an Bedeutung zunehmende, Rolle. Diese Arbeit sollte somit als Basisstudie bezüglich der Effekte von Pam2Cys auf NK-Zellen angesehen werden. Auf der anderen Seite sollte auch erwähnt werden, dass es noch keine Studien gibt, die die Effekte der Lipopeptide Pam24-4 und Pam30-5 auf dendritische Zellen untersucht haben.

Es wurde die Veränderung der CD69-, HLA-DR- und TLR2-Expression auf und in NK-Zellen nach Stimulation ausgewertet, um eine mögliche Aktivierung dieser Zellen zu erkennen. Die Produktion von Zytokinen, wie IFN- $\gamma$ , die durch die Lipopeptide auch

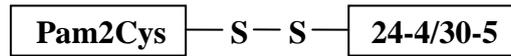
getriggert werden könnte, wurde nicht untersucht. Auch wurden die NK-Zellen lediglich durch Pam2Cys stimuliert. Es wurden keine Interleukine zur Unterstützung der Zellaktivierung eingesetzt. In vivo sind Interleukine die Hauptaktivatoren der NK-Zellen. Dendritische Zellen, die bewiesenermaßen durch Pam2Cys aktiviert werden, schütten IL-12 aus, welches wiederum NK-Zellen aktiviert (31). Diese kostimulierenden Faktoren könnten durchaus auch die Expression der oben genannten Rezeptoren erhöhen und zu einer stärkeren Aktivierung der NK-Zellen beitragen und so zu signifikanteren Ergebnissen führen. In diese Studie wurden sie aber absichtlich nicht mit einbezogen, um die Reaktion von NK-Zellen allein auf Pam24-4 und Pam30-5 zu untersuchen.

In der Analyse der Real-Time-PCR von Pam30-5 erschien dieses Lipopeptid nicht so immunogen wie Pam24-4. Dennoch wurde es, an FITC gekoppelt, für die konfokale Mikroskopie benutzt. Der Grund hierfür war, dass die Synthese von Pam24-4-FITC sich als problematisch und schwierig erwies. Deshalb konnte das Labor von Professor Jackson uns nur Pam30-5-FITC zur Verfügung stellen.

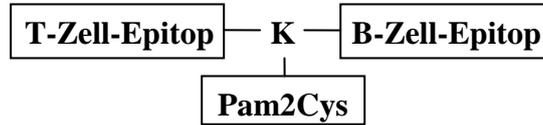
Die Kopplung von Pam2Cys an das jeweilige Peptid wurde durch zwei Serinreste garantiert. So entsteht ein Molekül mit linearer Struktur. ZENG et al. konnten aber nachweisen, dass verzweigte Lipopeptidstrukturen, die Pam2Cys beinhalten, immunogener und besser löslich sind, als ihre linearen Verwandten (111). Zudem wurden dort zwei immundominante Peptide in die Impfstoffe eingebaut und Pam2Cys war über einen Lysinrest an die Mitte des Moleküls gebunden (Abbildung 4.2).

Die Synthese eines solchen Lipopeptides mit zwei immunogenen HSV-Peptiden würde einen weiteren interessanten Ansatz für neue Forschungen an NK- und auch dendritischen Zellen liefern.

A



B



**Abbildung 4.2: Schematische Struktur des in dieser Arbeit verwendeten Lipopeptides und eines verzweigten Lipopeptides mit Pam2Cys (111)**

Die verwendeten immunogenen Peptide waren über zwei Serinreste (S) mit Pam2Cys verbunden (A). Die verzweigte Lipopeptidstruktur weist zwei Peptidepitope auf. Pam2Cys ist über einen Lysinrest (K) mit den Peptiden konjugiert (B).

## 4.5 Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Forschung

Die hier vorliegende Arbeit leistet einen kleinen Beitrag zur aktuellen Forschung an einer HSV-Vakzine. Die Bedeutung der NK-Zellen für eine Auslösung einer Immunreaktion durch einen lipopeptidbasierten Impfstoff konnte etwas weiter geklärt werden. NK-Zellen erhalten durch die Präsentation des Impfantigens eine weitere wichtige Rolle in der Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems.

Die Kopplung von Pam2Cys an kreuzimmunogene Peptide von HSV-2 eröffnet zudem einen neuen Weg zum Endpunkt „effektive und sichere HSV-Vakzine“. Um dieses Ziel zu erreichen, muss sowohl an der Identifizierung immunogener Strukturen der Herpesviren, als auch an der Entwicklung potenter Adjuvantien gearbeitet werden.

Die Detektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Peptidepitopen im Glykoprotein D von HSV-2 stellt neue immundominante Moleküle vor, die in einer Vakzine eingesetzt werden könnten (56). Weitere immunogene HSV-Proteine sind aber nötig, um die Effektivität eines Herpesimpfstoffes zu erhöhen. Hierbei sollte auch nach Strukturen gesucht werden, die von CD8<sup>+</sup>-T- und B-Lymphozyten erkannt werden. Die Aktivierung möglichst vieler Teile des angeborenen und erworbenen Immunsystems spielt eine wichtige Rolle. Diese Bedingung setzt jedoch hohe Hürden für die Forschung und stellt ein Hauptproblem an der Entwicklung einer Herpes-Vakzine dar. Das große Virus mit über 80 Proteinen und der komplexe Zyklus von Infektion über Latenz in Neuronen bis zum rezidivierenden

Auftreten von Symptomen erschweren die Suche nach viralen Strukturen, die vom Immunsystem schnell erkannt werden und dieses möglichst universal aktivieren (51). Eine aktuelle Studie hat weiterhin gezeigt, dass eine starke Aktivierung des Immunsystems durch einen Impfstoff nicht zwingend mit einem erhöhten Schutz gegen HSV korreliert (55).

Das Spektrum an Adjuvantien, die in HSV-Impfstudien eingesetzt wurden, ist nun durch Pam2Cys erweitert worden. Zahlreiche weitere Hilfsstoffe wurden bereits eingesetzt, unter anderem MF59, allerdings ohne Erfolg (23). Besonders durch das negative Resultat der groß angelegten HERPEVAC-Studie, die eine gD2-Vakzine und AS04 als Adjuvans verwendete, wurde die Hoffnung auf einen wegweisenden Fortschritt in diesem Forschungsgebiet in Frage gestellt (79). Die vielversprechenden Daten aus den vorangegangenen Tiermodellen (8) und einer Phase III-Studie (96) ließen sich nicht bestätigen. Trotz der hohen Antikörper-Level, die durch die Impfung hervorgerufen wurden, schützte die Vakzine nicht. Dies bestätigt einmal mehr die Bedeutung der zellulären Immunität, die zusätzlich zu den humoralen Mechanismen von einem Impfstoff aktiviert werden muss.

Dennoch wurde durch die Phase III-Studie, die die Grundlage für HERPEVAC war, die Frage aufgeworfen, ob geschlechtsspezifische Faktoren die Effektivität einer HSV-Vakzine beeinflussen können, da der Impfstoff vorerst nur bei Frauen wirkte. Neueste Studien konnten der schon auf dem Markt befindlichen tetravalenten HPV-Vakzine eine Herdenimmunität für heterosexuelle Männer zuweisen (9, 29). Da HSV, ähnlich wie HPV, durch Geschlechtsverkehr übertragen werden kann, wäre dieser durchaus positive Nebeneffekt auch bei einem Herpesimpfstoff denkbar und wünschenswert, besonders im Hinblick auf den durch Geschlechtsverkehr übertragenen Herpes genitalis.

Dass die Wirkungslosigkeit der entwickelten Impfungen hauptsächlich an den Adjuvantien liegt, ist zu bezweifeln. Als Beispiel lässt sich AS04 aufführen. Wie bereits erwähnt, scheiterte es als Hilfsstoff eines HSV-Impfstoffes. Eingebaut in eine bereits lizenzierte HPV-Vakzine zeigt AS04 als Adjuvans hervorragende Ergebnisse und trug zur Entwicklung einer wirkungsvollen und sicheren Impfung bei (89, 90). Auch für weitere Adjuvantien, wie AS03 oder MF59 existieren ausführliche Daten zur Sicherheit

und zur Effizienz dieser Moleküle (19). Die gerade erst veröffentlichten vielversprechenden Ergebnisse einer groß angelegten Phase III-Studie, in der AS01 als Adjuvans in einer Malaria-Vakzine verwendet wurde, sind ein weiteres Beispiel für die Wirksamkeit dieser Hilfsstoffe (84, 107). Solche umfassenden Ergebnisse liegen für das hier verwendete Pam2Cys noch nicht vor. Die vielversprechenden Ergebnisse der schon durchgeführten Arbeiten lassen aber hoffen, dass in Zukunft umfangreiche und aussagekräftige klinische Studien mit diesem Lipopeptid als Adjuvans durchgeführt werden, auch im Hinblick auf die Entwicklung einer Herpes-Vakzine.

## 5 Zusammenfassung

2,3-Dipalmitoyl-S-Glycerylcystein (Pam2Cys), ein Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2)-Ligand, aktiviert dendritische Zellen und erhöht die Expression von HLA-DR auf deren Zelloberfläche. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können über die Ausschüttung von Zytokinen das erworbene Immunsystem stimulieren. Zudem weist die Entdeckung von HLA-DR auf NK-Zellen, besonders auf CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen, auf eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem hin. Gekoppelt an ein immundominantes Peptidpitop aus dem Glykoprotein D des Herpes-Simplex-Virus (HSV) Typ 2, wurde Pam2Cys in dieser Arbeit als potentieller lipopeptidbasierter HSV-Impfstoff eingesetzt, um die Effekte dieser Vakzine auf NK-Zellen zu untersuchen.

Die Einflüsse der Vakzine wurden anhand der CD69-, HLA-DR- und TLR2-Expression auf und in NK-Zellen nach Inkubation mit Pam2Cys untersucht. Die Analyse der Gesamt-NK-Zellpopulation ließ nur mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR einen signifikanten Anstieg der TLR2-Expression erkennen, jedoch nicht durchflusszytometrisch. Inkubierte NK-Zellen zeigten deutlich mehr HLA-DR auf der Zelloberfläche, als unstimulierte NK-Zellen. Die Untersuchung der zwei großen NK-Zellsubpopulationen, CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>, ergab, dass stimulierte CD56<sup>bright</sup>-Zellen wesentlich mehr HLA-DR und TLR2 aufwiesen, als stimulierte CD56<sup>dim</sup>-Zellen. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 stieg in der Gesamtpopulation der NK-Zellen nicht in signifikantem Maße an, zeigte jedoch eine Zunahme nach Inkubation mit den Pam2Cys-Molekülen. Die Aufnahme der Lipopeptide in NK-Zellen wurde mit der konfokalen Mikroskopie bestätigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hier verwendete HSV-Vakzine von NK-Zellen aufgenommen wird und sie die Ausbildung von Oberflächenrezeptoren auf diesen Zellen moduliert. Insbesondere die Expressionssteigerung von HLA-DR auf CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen deutet auf die Fähigkeit dieser Zellen hin, Antigene zu präsentieren und stellt einen weiteren Mechanismus vor, der eine impfstoffbezogene Immunantwort unterstützen kann. Die vorliegende Arbeit bildet eine Basis für weiterführende Studien an NK-Zellen hinsichtlich der Antigenpräsentation im Allgemeinen und der Antigenpräsentation nach Stimulation durch eine Vakzine im Besonderen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell.** 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-8.
2. **Anderson, K. V., and C. Nusslein-Volhard.** 1984. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* **311**:223-7.
3. **Andrews, D. M., C. E. Andoniou, A. A. Scalzo, S. L. van Dommelen, M. E. Wallace, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti.** 2005. Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. *Mol Immunol* **42**:547-55.
4. **Baeuerle, P. A., and T. Henkel.** 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**:141-79.
5. **Baldwin, A. S., Jr.** 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**:649-83.
6. **Becker, I., N. Salaiza, M. Aguirre, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L. G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A. P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado, and A. Isibasi.** 2003. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* **130**:65-74.
7. **Bochud, P. Y., A. S. Magaret, D. M. Koelle, A. Aderem, and A. Wald.** 2007. Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesion rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. *J Infect Dis* **196**:505-9.
8. **Bourne, N., F. J. Bravo, M. Francotte, D. I. Bernstein, M. G. Myers, M. Slaoui, and L. R. Stanberry.** 2003. Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis* **187**:542-9.
9. **Brisson, M., N. van de Velde, E. L. Franco, M. Drolet, and M. C. Boily.** 2011. Incremental impact of adding boys to current human papillomavirus vaccination programs: role of herd immunity. *J Infect Dis* **204**:372-6.
10. **Burt, B. M., G. Plitas, H. M. Nguyen, J. A. Stableford, Z. M. Bamboat, and R. P. Dematteo.** 2008. Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function. *Hum Immunol* **69**:469-74.
11. **Buwitt-Beckmann, U., H. Heine, K. H. Wiesmuller, G. Jung, R. Brock, S. Akira, and A. J. Ulmer.** 2006. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* **281**:9049-57.

12. **Buwitt-Beckmann, U., H. Heine, K. H. Wiesmuller, G. Jung, R. Brock, S. Akira, and A. J. Ulmer.** 2005. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol* **35**:282-9.
13. **Buxbaum, S., M. Geers, G. Gross, H. Schofer, H. F. Rabenau, and H. W. Doerr.** 2003. Epidemiology of herpes simplex virus types 1 and 2 in Germany: what has changed? *Med Microbiol Immunol* **192**:177-81.
14. **Caligiuri, M. A.** 2008. Human natural killer cells. *Blood* **112**:461-9.
15. **Chalifour, A., P. Jeannin, J. F. Gauchat, A. Blaecke, M. Malissard, T. N'Guyen, N. Thieblemont, and Y. Delneste.** 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* **104**:1778-83.
16. **Chlibek, R., J. Semetana, K. Pauksens, A. Van den Hoek, J. H. Richardus, J. Wachter, T. F. Schwarz, E. Ledent, and T. Heinemann.** 2011. Safety and immunogenicity of three different formulations of an adjuvanted varizella-zoster virus subunit candidate vaccine in older adults, 36<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop, Gdansk, Poland.
17. **Chua, B. Y., E. M. Eriksson, L. E. Brown, W. Zeng, E. J. Gowans, J. Torresi, and D. C. Jackson.** 2008. A self-adjuvanting lipopeptide-based vaccine candidate for the treatment of hepatitis C virus infection. *Vaccine* **26**:4866-75.
18. **Chua, B. Y., A. Healy, P. U. Cameron, O. Stock, M. Rizkalla, W. Zeng, J. Torresi, L. E. Brown, N. L. Fowler, E. J. Gowans, and D. C. Jackson.** 2003. Maturation of dendritic cells with lipopeptides that represent vaccine candidates for hepatitis C virus. *Immunol Cell Biol* **81**:67-72.
19. **Coffman, R. L., A. Sher, and R. A. Seder.** 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**:492-503.
20. **Combe, C. L., T. J. Curiel, M. M. Moretto, and I. A. Khan.** 2005. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. *Infect Immun* **73**:4913-21.
21. **Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri.** 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**:633-40.
22. **Cooper, M. A., T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M. A. Caligiuri.** 2004. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* **25**:47-52.
23. **Corey, L., A. G. Langenberg, R. Ashley, R. E. Sekulovich, A. E. Izu, J. M. Douglas, Jr., H. H. Handsfield, T. Warren, L. Marr, S. Tyring, R. DiCarlo, A. A. Adimora, P. Leone, C. L. Dekker, R. L. Burke, W. P. Leong, and S. E. Straus.** 1999. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA* **282**:331-40.

24. **Corey, L., A. Wald, C. L. Celum, and T. C. Quinn.** 2004. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J Acquir Immune Defic Syndr* **35**:435-45.
25. **Cunningham, A. L., R. J. Diefenbach, M. Miranda-Saksena, L. Bosnjak, M. Kim, C. Jones, and M. W. Douglas.** 2006. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* **194 Suppl 1**:S11-8.
26. **Cunningham, A. L., and T. C. Merigan.** 1984. Leu-3+ T cells produce gamma-interferon in patients with recurrent herpes labialis. *J Immunol* **132**:197-202.
27. **Cunningham, A. L., and Z. Mikloska.** 2001. The Holy Grail: immune control of human herpes simplex virus infection and disease. *Herpes* **8 Suppl 1**:6A-10A.
28. **Cunningham, A. L., R. R. Turner, A. C. Miller, M. F. Para, and T. C. Merigan.** 1985. Evolution of recurrent herpes simplex lesions. An immunohistologic study. *J Clin Invest* **75**:226-33.
29. **Donovan, B., N. Franklin, R. Guy, A. E. Grulich, D. G. Regan, H. Ali, H. Wand, and C. K. Fairley.** 2011. Quadrivalent human papillomavirus vaccination and trends in genital warts in Australia: analysis of national sentinel surveillance data. *Lancet Infect Dis* **11**:39-44.
30. **Eriksson, E. M., and D. C. Jackson.** 2007. Recent advances with TLR2-targeting lipopeptide-based vaccines. *Curr Protein Pept Sci* **8**:412-7.
31. **Fehniger, T. A., M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna, and M. A. Caligiuri.** 2003. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* **101**:3052-7.
32. **Finberg, R. W., D. M. Knipe, and E. A. Kurt-Jones.** 2005. Herpes simplex virus and toll-like receptors. *Viral Immunol* **18**:457-65.
33. **Finberg, R. W., and E. A. Kurt-Jones.** 2004. Viruses and Toll-like receptors. *Microbes Infect* **6**:1356-60.
34. **Freeman, E. E., H. A. Weiss, J. R. Glynn, P. L. Cross, J. A. Whitworth, and R. J. Hayes.** 2006. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS* **20**:73-83.
35. **Gahery-Segard, H., G. Pialoux, B. Charmeteau, S. Sermet, H. Poncelet, M. Raux, A. Tartar, J. P. Levy, H. Gras-Masse, and J. G. Guillet.** 2000. Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine. *J Virol* **74**:1694-703.

36. **Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill.** 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**:1107-17.
37. **Garcon, N., P. Chomez, and M. Van Mechelen.** 2007. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines* **6**:723-39.
38. **Garcon, N., S. Morel, A. Didierlaurent, D. Descamps, M. Wettendorff, and M. Van Mechelen.** 2011. Development of an AS04-Adjuvanted HPV Vaccine with the Adjuvant System Approach. *BioDrugs* **25**:217-26.
39. **Garcon, N., and M. Van Mechelen.** 2011. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. *Expert Rev Vaccines* **10**:471-86.
40. **Garcon, N., M. Wettendorff, and M. Van Mechelen.** 2011. Role of AS04 in human papillomavirus vaccine: mode of action and clinical profile. *Expert Opin Biol Ther* **11**:667-77.
41. **Gay, N. J., and F. J. Keith.** 1991. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**:355-6.
42. **Gupta, R., T. Warren, and A. Wald.** 2007. Genital herpes. *Lancet* **370**:2127-37.
43. **Halpern-Felsher, B. L., J. L. Cornell, R. Y. Kropp, and J. M. Tschann.** 2005. Oral versus vaginal sex among adolescents: perceptions, attitudes, and behavior. *Pediatrics* **115**:845-51.
44. **Hanna, J., T. Gonen-Gross, J. Fitchett, T. Rowe, M. Daniels, T. I. Arnon, R. Gazit, A. Joseph, K. W. Schjetne, A. Steinle, A. Porgador, D. Mevorach, D. Goldman-Wohl, S. Yagel, M. J. LaBarre, J. H. Buckner, and O. Mandelboim.** 2004. Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *J Clin Invest* **114**:1612-23.
45. **Hanna, J., and O. Mandelboim.** 2007. When killers become helpers. *Trends Immunol* **28**:201-6.
46. **Harris, G., R. KuoLee, and W. Chen.** 2006. Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* **12**:2149-60.
47. **Hirschfeld, M., Y. Ma, J. H. Weis, S. N. Vogel, and J. J. Weis.** 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* **165**:618-22.
48. **Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann.** 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**:4531-7.

49. **Jackson, D. C., Y. F. Lau, T. Le, A. Suhrbier, G. Deliyannis, C. Cheers, C. Smith, W. Zeng, and L. E. Brown.** 2004. A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15440-5.
50. **Jones, A. R.** 1975. The metabolism of 3-chloro-, 3-bromo- and 3-iodopropan-1,2-diol in rats and mice. *Xenobiotica* **5**:155-65.
51. **Jones, C. A., and A. L. Cunningham.** 2004. Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease. *Herpes* **11**:12-7.
52. **Jones, K. L., L. E. Brown, E. M. Eriksson, R. A. Ffrench, P. A. Latour, B. E. Loveland, D. M. Wall, S. K. Roberts, D. C. Jackson, and E. J. Gowans.** 2008. Human dendritic cells pulsed with specific lipopeptides stimulate autologous antigen-specific T cells without the addition of exogenous maturation factors. *J Viral Hepat* **15**:761-72.
53. **Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**:115-22.
54. **Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlratt, S. Sato, K. Hoshino, and S. Akira.** 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**:5887-94.
55. **Khodai, T., D. Chappell, C. Christy, P. Cockle, J. Eyles, D. Hammond, K. Gore, M. J. McCluskie, D. M. Evans, S. Lang, P. T. Loudon, T. Townend, P. Wright, K. West, and H. Bright.** 2011. Single and combination herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides or monophosphoryl lipid exhibit differential immunity that is not correlated to protection in animal models. *Clin Vaccine Immunol* **18**:1702-9.
56. **Kim, M., J. Taylor, J. Sidney, Z. Mikloska, N. Bodsworth, K. Lagios, H. Dunckley, K. Byth-Wilson, M. Denis, R. Finlayson, R. Khanna, A. Sette, and A. L. Cunningham.** 2008. Immunodominant epitopes in herpes simplex virus type 2 glycoprotein D are recognized by CD4 lymphocytes from both HSV-1 and HSV-2 seropositive subjects. *J Immunol* **181**:6604-15.
57. **Koelle, D. M., and L. Corey.** 2008. Herpes simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. *Annu Rev Med* **59**:381-95.
58. **Koelle, D. M., C. M. Posavad, G. R. Barnum, M. L. Johnson, J. M. Frank, and L. Corey.** 1998. Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* **101**:1500-8.

59. **Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira.** 2008. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* **14**:86-92.
60. **Kurt-Jones, E. A., M. Chan, S. Zhou, J. Wang, G. Reed, R. Bronson, M. M. Arnold, D. M. Knipe, and R. W. Finberg.** 2004. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1315-20.
61. **Lauzon, N. M., F. Mian, R. MacKenzie, and A. A. Ashkar.** 2006. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* **241**:102-12.
62. **Leib, D. A.** 2002. Counteraction of interferon-induced antiviral responses by herpes simplex viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**:171-85.
63. **Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-83.
64. **Loza, M. J., and B. Perussia.** 2004. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56<sup>+</sup>high stage and effector functions. *J Immunol* **172**:88-96.
65. **Marcenaro, E., B. Ferranti, M. Falco, L. Moretta, and A. Moretta.** 2008. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol* **20**:1155-67.
66. **Martinez, J., X. Huang, and Y. Yang.** 2010. Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. *PLoS Pathog* **6**:e1000811.
67. **Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**:135-45.
68. **Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-7.
69. **Metzger, J. W., K. H. Wiesmuller, and G. Jung.** 1991. Synthesis of N alpha-Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res* **38**:545-54.
70. **Mikloska, Z., and A. L. Cunningham.** 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J Gen Virol* **79 ( Pt 2)**:353-61.
71. **Mikloska, Z., A. M. Kesson, M. E. Penfold, and A. L. Cunningham.** 1996. Herpes simplex virus protein targets for CD4 and CD8 lymphocyte cytotoxicity in cultured epidermal keratinocytes treated with interferon-gamma. *J Infect Dis* **173**:7-17.

72. **Mikloska, Z., P. P. Sanna, and A. L. Cunningham.** 1999. Neutralizing antibodies inhibit axonal spread of herpes simplex virus type 1 to epidermal cells in vitro. *J Virol* **73**:5934-44.
73. **Morel, S., A. Didierlaurent, P. Bourguignon, S. Delhay, B. Baras, V. Jacob, C. Planty, A. Elouahabi, P. Harvengt, H. Carlsen, A. Kielland, P. Chomez, N. Garcon, and M. Van Mechelen.** 2011. Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* **29**:2461-73.
74. **Morrison, L. A.** 2004. The Toll of herpes simplex virus infection. *Trends Microbiol* **12**:353-6.
75. **Moyle, P. M., and I. Toth.** 2008. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. *Curr Med Chem* **15**:506-16.
76. **Muhradt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, and G. Jung.** 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* **185**:1951-8.
77. **Nandakumar, S., S. N. Woolard, D. Yuan, B. T. Rouse, and U. Kumaraguru.** 2008. Natural killer cells as novel helpers in anti-herpes simplex virus immune response. *J Virol* **82**:10820-31.
78. **Nardin, E. H., J. M. Calvo-Calle, G. A. Oliveira, R. S. Nussenzweig, M. Schneider, J. M. Tiercy, L. Loutan, D. Hochstrasser, and K. Rose.** 2001. A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J Immunol* **166**:481-9.
79. **National Institute of Allergy and Infectious Diseases.** 2010. Study finds genital herpes vaccine ineffective in women. Published online: <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2010/Pages/Herpevac.aspx>.
80. **Pillarisetty, V. G., S. C. Katz, J. I. Bleier, A. B. Shah, and R. P. Dematteo.** 2005. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol* **174**:2612-8.
81. **Raulet, D. H., R. E. Vance, and C. W. McMahon.** 2001. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* **19**:291-330.
82. **Roberts, C. M., J. R. Pfister, and S. J. Spear.** 2003. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis* **30**:797-800.
83. **Rogge, L., L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D. H. Presky, U. Gubler, and F. Sinigaglia.** 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* **185**:825-31.

84. **RTS,S Clinical Trials Partnership.** 2011. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med* **365**:1863-75.
85. **Rupp, R., and D. I. Bernstein.** 2008. The potential impact of a prophylactic herpes simplex vaccine. *Expert Opin Emerg Drugs* **13**:41-52.
86. **Sallusto, F., and A. Lanzavecchia.** 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**:1109-18.
87. **Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid.** 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* **26**:136-40.
88. **Sato, A., M. M. Linehan, and A. Iwasaki.** 2006. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17343-8.
89. **Schwarz, T. F.** 2008. AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 vaccination: recent advances in cervical cancer prevention. *Expert Rev Vaccines* **7**:1465-73.
90. **Schwarz, T. F.** 2009. Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine, Cervarix. *Adv Ther* **26**:983-98.
91. **Sedy, J. R., P. G. Spear, and C. F. Ware.** 2008. Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. *Nat Rev Immunol* **8**:861-73.
92. **Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu.** 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**:1835-7.
93. **Smith, J. S., and N. J. Robinson.** 2002. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**:S3-28.
94. **Smyth, M. J., E. Cretney, J. M. Kelly, J. A. Westwood, S. E. Street, H. Yagita, K. Takeda, S. L. van Dommelen, M. A. Degli-Esposti, and Y. Hayakawa.** 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* **42**:501-10.
95. **Stanberry, L. R., A. L. Cunningham, A. Mindel, L. L. Scott, S. L. Spruance, F. Y. Aoki, and C. J. Lacey.** 2000. Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. *Clin Infect Dis* **30**:549-66.
96. **Stanberry, L. R., S. L. Spruance, A. L. Cunningham, D. I. Bernstein, A. Mindel, S. Sacks, S. Tyring, F. Y. Aoki, M. Slaoui, M. Denis, P. Vandepapeliere, and G. Dubin.** 2002. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* **347**:1652-61.

97. **Takeda, K., and S. Akira.** 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* **16**:3-9.
98. **Takeda, K., and S. Akira.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**:1-14.
99. **Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**:335-76.
100. **Takeuchi, O., and S. Akira.** 2002. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes Infect* **4**:887-95.
101. **Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira.** 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **165**:5392-6.
102. **Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira.** 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**:933-40.
103. **Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira.** 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**:10-4.
104. **Testi, R., D. D'Ambrosio, R. De Maria, and A. Santoni.** 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* **15**:479-83.
105. **Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, Jr., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham.** 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**:2170-9.
106. **Uronen-Hansson, H., J. Allen, M. Osman, G. Squires, N. Klein, and R. E. Callard.** 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunology* **111**:173-8.
107. **Vekemans, J., A. Leach, and J. Cohen.** 2009. Development of the RTS,S/AS malaria candidate vaccine. *Vaccine* **27 Suppl 6**:G67-71.
108. **Vitale, M., M. Della Chiesa, S. Carlomagno, C. Romagnani, A. Thiel, L. Moretta, and A. Moretta.** 2004. The small subset of CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**:1715-22.

109. **Wald, A., and K. Link.** 2002. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis. *J Infect Dis* **185**:45-52.
110. **Xu, F., M. R. Sternberg, B. J. Kottiri, G. M. McQuillan, F. K. Lee, A. J. Nahmias, S. M. Berman, and L. E. Markowitz.** 2006. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA* **296**:964-73.
111. **Zeng, W., S. Ghosh, Y. F. Lau, L. E. Brown, and D. C. Jackson.** 2002. Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuvanting immunocontraceptive vaccines. *J Immunol* **169**:4905-12.
112. **Ziegler, S. F., F. Ramsdell, K. A. Hjerrild, R. J. Armitage, K. H. Grabstein, K. B. Hennen, T. Farrah, W. C. Fanslow, E. M. Shevach, and M. R. Alderson.** 1993. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur J Immunol* **23**:1643-8.

---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Tino F. Schwarz für die Überlassung des Themas, die kompetente und unkomplizierte Betreuung und ganz besonders für die bereitwillige Unterstützung bei dem Vorhaben, meine Promotion im Ausland durchzuführen, herzlichst bedanken. Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. Tony Cunningham für die Möglichkeit, in seinem Labor am Centre for Virus Research des Westmead Millennium Institutes in Sydney zu arbeiten. Ohne dieses großzügige Angebot wäre mein einjähriger Forschungsaufenthalt in Australien nicht möglich gewesen. Zudem sei Herrn Professor Dr. Axel Rethwilm für die Übernahme und Erstellung des Koreferates herzlich gedankt.

Bei Frau Dr. Min Kim aus der HSV Immunopathogenesis Group am Centre for Virus Research möchte ich mich für die kollegiale und professionelle Betreuung, die vielen hilfreichen Diskussionen und die ausführlichen Antworten auf meine Fragen ganz herzlich bedanken.

Die intensive Unterstützung durch alle Studenten und Mitarbeiter der Forschungsgruppe in Sydney erleichterte meine Arbeit enorm. ‚Shantideva‘ Andrew, Heather, Joey, Kerrie, Kirstie, Najla, Sarah, Stuart und Valerie haben mir geduldig alle Arbeitsschritte und Techniken umfassend erklärt und standen mir nicht nur motivierend bei methodischen Problemen im Labor, sondern auch immer freundschaftlich zur Seite. Vielen Dank für die unvergessliche Zeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Kerstin und Sebastian Haferkamp bedanken, die sich in Sydney wundervoll um mich gekümmert haben. Sebastian hat außerdem maßgeblich bei der Vermittlung der Stelle am Centre for Virus Research geholfen.

Der Boehringer Ingelheim Fonds und der Deutsche Akademische Austauschdienst haben mich in Australien finanziell unterstützt. Dafür möchte ich mich hier herzlich bedanken.