

Aus dem Deutschen Rheuma Forschungszentrum Berlin

DISSERTATION

Synthetische Lipopeptide:  
Adjuvanzeigenschaften unter strukturellen Aspekten *in vitro*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Ahmadi

aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Th. Kamradt  
2. Prof. Dr. med. J. Sieper  
3. Prof. Dr. med. vet. G. Alber

Datum der Promotion: 18.09.2009

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 T-Helfer-Zell-Differenzierung.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Einflußfaktoren der Th-Zelldifferenzierung .....	2
1.1.2 Th-Differenzierung, Immunantwort und Immunpathologie.....	5
<b>1.2 Kostimulatoren der T-Zellaktivierung und –Effektorfunktionen .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Das CD28/B7-System .....	9
1.2.2 Das CD40/CD40L-System.....	12
<b>1.3 Immunmodulatorische Eigenschaften bakterieller Lipoproteine und synthetischer Lipopeptidanaloga .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Wirkung bakterieller Lipoproteine auf B-Lymphozyten, Monozyten und ..... Neutrophile .....	15
1.3.2 Einfluß des Lipoproteins OspA auf die Th-Phänotypdifferenzierung .....	17
1.3.3 Lipopeptide als Adjuvantien.....	19
<b>1.4 Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIALIEN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Mäuse.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Chemikalien, Seren, Zellkulturmedien und Puffer.....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Chemikalien und Seren .....	22
2.2.2 Zellkulturmedien .....	23
2.2.3 Puffer.....	23
<b>2.3 Synthetische Lipopeptide, <i>B.burgdorferi</i>-Stamm N40 und Ovalbumin .....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Synthetische Lipopeptide .....	23
2.3.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> -Stamm N40.....	25
2.3.3 Ovalbumin .....	25
<b>2.4 Zytokine und Antikörper.....</b>	<b>27</b>
2.4.1 Zytokine.....	27
2.4.2 Konjugierte Antikörper.....	27

<b>2.5 Kunststoffartikel, Pipetten und sonstige Materialien.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6 Geräte.....</b>	<b>29</b>
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Zellkultur.....</b>	<b>30</b>
3.1.1 Splenektomie bei Mäusen .....	30
3.1.2 Gewinnung einer Einzelzellsuspension .....	30
3.1.3 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung mononukleärer Zellen .....	31
3.1.4 Zellzahlbestimmung.....	31
3.1.5 <i>In vitro</i> Kultur von $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Milzzellen .....	32
3.1.5.1 <i>Kulturbedingungen</i> .....	32
3.1.5.2 <i>Primärstimulation</i> .....	32
3.1.5.3 <i>Expansion</i> .....	33
3.1.5.4 <i>Stimulation der Zellen zur Zytokinexpression und Hemmung der Sekretion</i> .....	33
3.1.5.5 <i>Ernte der Zellen am 7.Tag</i> .....	33
3.1.5.6 <i>Fixierung der Zellen</i> .....	34
3.1.5.7 <i>in vitro Kultivierung von CD8<sup>+</sup>-depletierten Zellen von <math>\alpha/\beta</math>-TCR-transgenen Mäusen</i> .....	34
3.1.6 <i>in vitro</i> Kultivierung von selektierten Splenozyten aus BALB/c- und J <sub>H</sub> T-Mäusen für einen Proliferationstest.....	35
3.1.6.1 <i>Vorbereitung</i> .....	35
3.1.6.2 <i>Isolation von CD4<sup>+</sup> Zellen mittels MACS</i> .....	35
3.1.6.3 <i>Kontrolle des Reinheitsgrades der CD4<sup>+</sup>-Isolation</i> .....	36
3.1.6.4 <i>Kulturbedingungen</i> .....	36
3.1.7 <i>in vitro</i> Kultivierung von BALB/c-Splenozyten zur Analyse der Expression kostimulatorischer Moleküle .....	37
3.1.7.1 <i>Vorbereitung</i> .....	37
3.1.7.2 <i>Kulturbedingungen</i> .....	37
<b>3.2 Durchflußzytometrie .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Grundlagen.....	37

3.2.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung .....	39
3.2.3 Färbung von Oberflächenantigenen .....	40
3.2.4 Färbung von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen .....	41
<b>3.3 Analytische Methoden .....</b>	<b>42</b>
3.3.1 Proliferationstest.....	42
3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes von <i>B.burgdorferi</i> -N40-Lysat .....	43
<b>3.4 Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>44</b>
3.4.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> Aufzucht.....	44
3.4.2 Herstellung von <i>B. burgdorferi</i> -Lysat .....	44
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Th-Phänotyp-Differenzierung von DO11.10 transgenen T-Zellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Selektive Vermehrung von CD4 <sup>+</sup> Zellen in einer Zellkultur mononukleärer Zellen von DO11.10- Mäusen in Gegenwart von OVA .....	48
4.1.2 Dosisabhängige Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion durch synthetische Lipopeptide.....	48
4.1.3 Vergleich der Induktion einer IFN- $\gamma$ -Produktion durch verschiedene Lipopetide.....	52
4.1.3.1 <i>Die sich bezüglich ihrer Aminosäuresequenz unterscheidenden synthetischen trispalmitoylierten Lipopeptide induzierten gleichermaßen die Produktion von IFN-<math>\gamma</math> .....</i>	<i>53</i>
4.1.3.2 <i>Das dipalmitoylierte Lipopeptid Pam<sub>2</sub>Cys-SSNA induzierte keine signifikante IFN-<math>\gamma</math>-Produktion .....</i>	<i>53</i>
4.1.3.3 <i>Pam<sub>3</sub>Cys-OH induzierte keine IFN-<math>\gamma</math>-Produktion.....</i>	<i>54</i>
4.1.4 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen hatten keinen wesentlichen Anteil an der gemessenen IFN- $\gamma$ - Produktion .....	54
<b>4.2 Einfluss synthetischer Lipopeptide auf die Proliferation von Th-Zellen.....</b>	<b>58</b>
4.2.1 Mittels MACS war eine Selektion von CD4 <sup>+</sup> Zellen aus den Milzen von BALB/c- und von J <sub>H</sub> T- Mäusen zu über 95% möglich.....	59

4.2.2 Synthetische Lipopeptide hatten eine proliferative Wirkung auf CD4 <sup>+</sup> -selektierte Zellen von BALB/c jedoch keine proliferative Wirkung auf CD4 <sup>+</sup> -selektierte J <sub>H</sub> T- Zellen .....	59
<b>4.3 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Expression kostimulatorischer Moleküle.....</b>	<b>62</b>
4.3.1 Pam <sub>3</sub> Cys-SSN, jedoch nicht Pam <sub>3</sub> Cys-OH, verstärkte die Expression kostimulatorischer Moleküle des CD28/B7-Systems .....	62
4.3.2 Pam <sub>3</sub> Cys-SSN, jedoch nicht Pam <sub>3</sub> Cys-OH, verstärkte die Expression kostimulatorischer Moleküle des CD40/CD40L-Systems .....	66
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>69</b>
<b>5.1 Modulation der Th-Phänotyp-Differenzierung durch synthetische Lipopeptide.....</b>	<b>70</b>
5.1.1 Untersuchung der Th-Differenzierung im $\alpha/\beta$ -TCR transgenen <i>in vitro</i> - Modell .....	70
5.1.2 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Th-Phänotyp-Differenzierung <i>in vitro</i> .....	71
5.1.3 Die biologische Wirkung synthetischer Lipopeptide unter strukturellen Aspekten .....	74
5.1.3.1 Die Aminosäurestruktur .....	74
5.1.3.2 Die N- Acylierung.....	75
<b>5.2 APC-unabhängige Wirkung von Lipopeptiden auf Th-Zellen.....</b>	<b>78</b>
<b>5.3 Einfluß synthetischer Lipopeptidadjuvantien auf die Expression kostimulatorischer Moleküle.....</b>	<b>80</b>
5.3.1 Effekt auf das CD28/B7-System.....	81
5.3.2 Effekt auf das CD40/CD40L-System .....	82
<b>5.4 Implikationen für die Rolle bakterieller Lipoproteine bei Infektionen und für die therapeutische Anwendung von Lipopeptiden.....</b>	<b>84</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>87</b>

<b>7 ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>88</b>
7.1. Allgemein .....	88
7.2 Abkürzungen von Aminosäuren .....	89
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>90</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>115</b>
<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>116</b>
<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>118</b>

## 1 EINLEITUNG

Angesichts der ständigen Konfrontation des Organismus mit einer unermesslichen Zahl von Mikroorganismen spielt die Effizienz des Immunsystems für das Überleben eine entscheidende Rolle. Eine Fehlregulation dieses Systems kann neben einer ungenügenden Erregerabwehr auch zu einer Schädigung des Organismus durch die Abwehrmechanismen selbst führen. Die Immunantwort hängt einerseits von Eigenschaften des Wirtes ab, andererseits verfügen Mikroorganismen über eine Vielzahl immunmodulatorischer Komponenten. Die Erforschung solcher Komponenten bietet die Möglichkeit, Abläufe im Rahmen einer Infektion genauer zu verstehen, zudem bietet sich unter Umständen die Chance einer therapeutischen Anwendung solcher Moleküle.

Bakterielle Lipoproteine stellen wegen ihrer weiten Verbreitung bei einer Vielzahl von Bakterien diesbezüglich ein mustergültiges Beispiel dar. Synthetische Strukturanaloga dieser Moleküle werden außerdem bereits bezüglich einer Anwendung als Adjuvantien erforscht. Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften synthetischer Lipopeptid-Adjuvantien unter besonderer Berücksichtigung struktureller Aspekte.

### 1.1 T-Helfer-Zell-Differenzierung

T-Helfer-Zellen (Th-Zellen,  $CD4^+$ ) stellen die wichtigsten regulatorischen Zellen des Immunsystems dar. Ihre Funktion vermitteln sie über die Sekretion von Effektor-Zytokinen. Unterschiedliche Zytokine bildende Th-Zellen stammen von denselben Vorläufer(Precursor)-Zellen ab (Übersicht bei Weaver et al. 2007). Dabei handelt es sich um naive, reife Th-Zellen, die nach vollständiger Aktivierung hauptsächlich den autokrinen Wachstumsfaktor Interleukin(IL)-2 sezernieren (Seder und Paul 1994). Die dadurch ausgelöste Aktivierung des Zellzyklus ist Voraussetzung für die Fähigkeit der Th-Zellen, ihre Effektor-Zytokine Interferon(IFN)- $\gamma$  und IL-4 zu bilden (Bird et al. 1998).

Nach dem Zytokinsekretionsmuster der Th-Zellen wurden zunächst zwei verschiedene Th-Subpopulationen beschrieben: Der Th1-Phänotyp ist charakterisiert

durch die Produktion von IFN- $\gamma$  und Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)- $\beta$ , der Th2-Phänotyp durch Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 (Übersicht bei Mosmann und Coffman 1989, Abbas 1996, Murphy und Reiner 2002). Außerdem gibt es einen Th-Phänotyp, der sowohl IL-2 und IFN- $\gamma$  als auch IL-4 produzieren kann und als Th0-Subpopulation bezeichnet wird (Firestein et al. 1989).

Abgesehen von der verschiedenartigen Zytokinsekretion der Th-Zellen wurden bisher nur wenige weitere stabile Differenzierungsmerkmale für Th1- und Th2-Zellen entdeckt. Der IL-33-Rezeptor (T1/ST2) wird v.a. auf Th2- nicht jedoch auf Th1-Zellen exprimiert und scheint eine Rolle für deren Effektorfunktion zu spielen (Löhning et al. 1998, Schmitz et al. 2005). Dagegen werden der IL-18-Rezeptor (Xu et al. 1998) sowie das Oberflächenmolekül Tim-3 (Monney et al. 2002) exklusiv auf Th1-Zellen exprimiert.

In den letzten Jahren wurden zudem der Phänotyp Th17 und verschiedene regulatorische T-Zellen (*engl.* T regulatory cells, Treg) identifiziert. Th17 produzieren das proinflammatorische Zytokin IL-17, weiterhin IL-6 und den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (*engl.* granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) (Übersicht bei Weaver et al. 2007). Charakterisiert sind Th17-Zellen auch durch die spezifische Expression der Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$  und ROR $\alpha$  (*engl.* retinoic acid-related orphan-receptor- $\gamma$  und - $\alpha$ ) (Yang et al. 2008).

Es werden verschiedene Arten von Treg differenziert. Bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg handelt es sich um natürlich vorhandene, bei Th3 und T1R um adaptive Treg (Übersicht bei Romagnani 2006 & Rouse und Souvas 2007). Treg produzieren die Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10.

### **1.1.1 Einflußfaktoren der Th-Zelldifferenzierung**

Ob sich eine naive Vorläufer-Th-Zelle zu einer IFN- $\gamma$ - oder einer IL-4-produzierenden Th-Zelle differenziert, wird hauptsächlich durch die Anwesenheit von Zytokinen während der Aktivierung der Zelle über den T-Zell-Rezeptor (TCR) bestimmt (Übersicht bei O'Garra 1998, Murphy und Reiner 2002).

*In vitro* differenzieren sich naive T-Zellen zu Th2-Zellen, wenn IL-4 bei der Primärstimulation (*engl.* priming) zugegeben wird (Le Gros et al. 1990, Seder et al. 1992). Außerdem kann IL-4 die Produktion von IFN- $\gamma$  hemmen und infolgedessen die Entwicklung von Th1-Zellen inhibieren (Hsieh et al. 1992, Seder et al. 1992). Die Zugabe von IL-2 scheint die zweite Voraussetzung für die Entwicklung beider Th-Phänotypen (Seder und Paul 1994) und auch der Th0-Subpopulation (Rogers et al. 1998) zu sein. *In vivo* führte die Applikation von IL-4 ebenfalls zur Entwicklung eines Th2-Phänotyps (Seder und Paul 1994). Die physiologische Quelle von IL-4 konnte jedoch bis heute nicht klar definiert werden (Übersicht bei Murphy 1998). Ein weiteres Zytokin, das eine Th-Differenzierung zu beeinflussen scheint ist IL-25 (Übersicht bei Weaver et al. 2007). IL-25 wird von polarisierenden Th2-Zellen selbst gebildet und scheint eine Th1- und Th17-Differenzierung zu inhibieren.

Bei der Th1-Differenzierung spielt IL-12 eine bedeutende Rolle (Übersicht bei Trinchieri 2003). Dieses Zytokin wird dabei v.a. von Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) (Macatonia et al. 1995, Heufler et al. 1996) gebildet. *In vitro* scheint die Anwesenheit von Makrophagen und DC für die Induktion eines Th1-Phänotyps Voraussetzung zu sein (Hsieh et al. 1992, Macatonia et al. 1993). Es wurde gezeigt, dass aktivierte Makrophagen über die Sekretion von IL-12 die Produktion von IFN- $\gamma$  durch Th-Zellen unabhängig von deren Antigen-Spezifität verstärken können (Hsieh et al. 1993a). *In vivo* scheinen zumindest bei der initialen IL-12-Synthese als Reaktion auf mikrobielle Stimuli, DC gegenüber Makrophagen eine übergeordnete Rolle zu spielen (Sousa et al. 1997).

IL-12 hat keinen direkt hemmenden Effekt auf die Th2-Entwicklung, kann jedoch den inhibitorischen Effekt von IL-4 auf die IFN- $\gamma$ -Produktion reduzieren (Seder et al. 1993). IFN- $\gamma$  selbst kann eine unterstützende Wirkung bei der Induktion eines Th1-Phänotyps haben (Wenner et al. 1996). Außerdem kann IL-18 eine IFN- $\gamma$ -Produktion in Th-Zellen induzieren (Okamura et al. 1998). IL-18 und IL-12 haben dabei eine synergistische Wirkung und führen zur Hochregulation des Rezeptors des jeweils anderen Zytokins (Yoshimoto et al. 1998, Chang et al. 2000).

Insgesamt scheint die Bedeutung von IL-12 bei der Th1-Entwicklung weniger eindeutig zu sein, als die des IL-4 bei der Th2-Entwicklung (Übersicht bei Trinchieri



IL-23-Produktion durch DC abhängig (Übersicht bei Weaver et al. 2007). Die Differenzierung zu Treg wird dagegen zwar durch TGF- $\beta$  initiiert, jedoch durch IL-6 gehemmt. Th1- und Th2-Zellen können eine Differenzierung von IL-17-produzierenden Zellen durch ihre Effektorzytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 hemmen (Harrington et al. 2005), ein weiteres inhibitorisches Zytokin scheint IL-27 zu sein (Stumhofer et al. 2006).

Neben dem Effekt von Zytokinen gibt es weitere Faktoren, die während der T-Zellaktivierung einen Einfluß auf die Th-Differenzierung ausüben können. So spielen die Antigenkonzentration und -dichte am Rezeptor sowie die zeitliche Dauer der Th-Differenzierung eine Rolle (Croft et al. 1995, Rogers et al. 1998, Rogers und Croft 1999, Leitenberg und Bottomly 1999), zusätzlich die Art der antigenpräsentierenden Zelle (Gajewski et al. 1991, Moser und Murphy 2000) und die von ihr exprimierten kostimulatorischen Moleküle (Tao et al. 1997, Grewal und Flavell 1998, Salomon und Bluestone 2001; siehe Kapitel 1.3). Die Stärke des TCR-Signals scheint zudem den Einfluss von Zytokinen bei der Th1-Differenzierung zu determinieren (Nembrini et al. 2006).

### **1.1.2 Th-Differenzierung, Immunantwort und Immunpathologie**

Die unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster der Th1- und Th2-Zellen bedingen die Initiierung zweier unterschiedlicher Formen der Immunantwort (Übersicht bei Abbas et al. 1996, Murphy und Reiner 2002). Th1-Zellen sind für die Regulation der zellulären Immunität verantwortlich. Das von ihnen sezernierte IFN- $\gamma$  aktiviert zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und stimuliert die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen. IFN- $\gamma$  bewirkt außerdem die Bildung von Immunglobulin(Ig)G2a und IgG3, Antikörper, die für die Opsonierung von Mikroorganismen verantwortlich sind und somit deren Phagozytose fördern. Viele organspezifische Autoimmunerkrankungen, wie primär insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) Typ1 und Multiple Sklerose (MS), sowie granulomatöse Erkrankungen wurden lange Zeit mit einer Th1-Antwort assoziiert. So können Mäuse, denen der für die Th1-Differenzierung wesentliche Transkriptionsfaktor T-bet (*engl.* T box expressed in T-

cells) fehlt eine Reihe muriner Modell-Autoimmunerkrankungen nicht entwickeln (Übersicht bei Peng 2006). Es gibt zudem Hinweise auf eine protektive Rolle einer Th2-Antwort bei diesen Erkrankungen (Liblau et al. 1995, O'Garra et al. 1997).

Th2-Zellen regulieren dagegen die humorale Immunantwort durch die Sekretion von IL-4 und IL-5. Diese Zytokine fördern die Proliferation von B-Zellen und sind essentiell für den Ig-Klassenwechsel (*engl.* switch) von IgM zu IgG1 (murin) bzw. IgG4 (human) und IgE (IL-4). Über die Induktion der IgE-Produktion und der Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen (IL-5) sind Th2-Zellen an der Genese von Allergien beteiligt (Übersicht bei Stirling und Chung 2000).

Die Resistenz gegen Mikroorganismen wird einerseits von Eigenschaften des Pathogens, andererseits von genetischen Eigenschaften des Wirtes bestimmt (Romagnani 1994). Der Wirtsorganismus muß auf intrazelluläre Pathogene anders reagieren als auf extrazelluläre. Die Bedeutung der verschiedenen Zytokinsekretionsmuster der Th-Phänotypen für eine adäquate Immunabwehr, wurde v.a. in Tiermodellen untersucht. Dabei wurde mehrfach festgestellt, dass die Resistenz gegen bzw. die Anfälligkeit für bestimmte Pathogene mit dem Vorliegen eines bestimmten Th-Phänotyps korreliert (Übersicht bei Mosmann und Sad 1996, Infante-Duarte und Kamradt 1999). Th1-Antworten sind besonders bedeutend bei der Abwehr intrazellulärer Erreger. Beispielhaft sei an dieser Stelle die Infektion mit dem intrazellulären Protozoon *Leishmania major* genannt: BALB/c Mäuse entwickeln während der Infektion aufgrund ihres genetischen Hintergrundes eine Th2-Antwort und sterben, dagegen entwickeln C57BL/6 Mäuse eine protektive Th1-Antwort (Hsieh et al. 1995).

Bei der Persistenz von Mikroorganismen im Wirt kann eine ständig andauernde Aktivität eines Th-Phänotyps zur Schädigung des Wirtsorganismus selbst führen (Übersicht bei Infante-Duarte und Kamradt 1999). Beispiel hierfür ist die Th1-Antwort gegen *Mycobacterium tuberculosis*. Dieses intrazelluläre Bakterium kann von Makrophagen nicht effizient phagozytiert werden. Die Ausbreitung des Erregers wird infolgedessen durch die Bildung von Granulomen, in denen *M. tuberculosis* persistiert, verhindert. IFN- $\gamma$  ist für die Bildung und Erhaltung des Granuloms essentiell wichtig (Flynn et al. 1993). Die Th1-Antwort ist somit zwar für die Abwehr

des Erregers entscheidend. Die chronische Granulombildung kann jedoch auch sekundäre, potentiell negative Effekte (wie Fibrose und Nekrose) auf den Organismus haben.

Untersuchungen von Infektionen und Autoimmunkrankheiten machten jedoch auch den sehr stark vereinfachenden Charakter des bisherigen Th1/Th2-Konzeptes deutlich (Bach und Herbelin 1999, Gor et al. 2003, Gutcher und Becher 2007). So konnte man zwar *in vitro* bei längerfristiger Stimulation eine stabile, irreversible Th1- bzw. Th2-Polarisierung erreichen (Übersicht bei Abbas et al. 1996). *In vivo* gibt es jedoch Situationen (bzw. Infektionen), in denen beide Phänotypen gleichzeitig entwickelt werden (Übersicht bei Infante-Duarte und Kamradt 1999). Zudem zeigten IFN- $\gamma$ -defiziente Mäuse in mehreren Untersuchungen eine gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte Suszeptibilität bzgl. der Entwicklung einer experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) (Übersicht bei Gutcher und Becher 2007).

Vor allem jedoch die kürzlich entdeckte Th17-Subpopulation macht die Limitationen des Th1/Th2-Paradigmas deutlich und stellt die Bedeutung des Th1-Phänotyps bei der Genese vieler Autoimmunkrankheiten weitgehend in Frage (Übersicht bei Gutcher und Becher 2007). In den murinen Modellen der EAE und der autoimmunen Gelenkentzündung wurde die übergeordnete Bedeutung des IL-23, einem Heterodimer der IL-12p40-Untereinheit mit der p19-Untereinheit (Oppmann et al. 2000), gegenüber IL-12 für die Pathogenese nachgewiesen (Cua et al. 2003, Murphy et al. 2003). Infante-Duarte et al. (2000) fanden nach *in vitro*-Stimulation naiver Th-Zellen mit Lipopeptiden von *Borrelia burgdorferi* einen Th-Zell-Phänotyp, der IL-17, TNF- $\alpha$  und G-CSF produzierte, nicht jedoch IFN- $\gamma$  oder IL-4. Ein ähnlicher Effekt war dabei durch Stimulation mit IL-6 zu beobachten. Langrish et al. zeigten 2005, dass IL-23 die Differenzierung einer IL-17-produzierenden Th-Subpopulation induziert. Der passive Transfer von IL-23-stimulierten T-Zellen in Mäuse induzierte zudem ausgeprägte Zeichen einer EAE bei den Tieren, während ein solcher Effekt beim Transfer von IL-12-stimulierten T-Zellen ausblieb. In der Folge wurden die IL-17 produzierenden Zellen als eigener Th-Phänotyp, Th17, charakterisiert (Harrington et al. 2005). In inzwischen zahlreichen weiteren Untersuchungen konnte die Bedeutung des Th17-Phänotyps bei der Genese organspezifischer Autoimmunerkrankungen wie

Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn weiter überzeugend untermauert werden (Übersicht bei Gutcher und Becher 2007). Es gibt zudem Hinweise auf eine Rolle von Th17 Zellen bei der Abwehr insbesondere extrazellulärer Erreger (Übersicht bei Ouyang et al. 2008). Treg wird dagegen eine wesentliche Bedeutung bei der Toleranz von Autoantigenen und der Suppression von Autoimmunität beigemessen (Übersicht bei Bommireddy und Doetschmann 2007). Implizit stehen sie deshalb auch im Fokus von Untersuchungen zu einer Treg-induzierten unzureichenden Abwehr von Mikroorganismen (Übersicht bei Rouse und Suvas 2007) sowie einer Vermittlung von Toleranz gegenüber Cancerogenen (Übersicht bei Wang et al. 2008).

Das Zusammenspiel der neu charakterisierten Th17 und den schon länger beschriebenen Th1- und Th2-Phänotypen ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung und noch nicht ausreichend verstanden. Bemerkenswert ist, dass *in vivo* in Darmepithelien von Morbus Crohn-Erkrankten neben Th17-Zellen auch Zellen isoliert wurden, die sowohl IL-17 als auch IFN- $\gamma$  exprimieren (Annunziato et al. 2007).

## 1.2 Kostimulatoren der T-Zellaktivierung und –Effektorfunktionen

Die Aktivierung von T-Lymphozyten ist an mehrere Voraussetzungen gebunden. Protein-Antigene werden von den antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und anschließend als lineare Peptid-Epitope über unterschiedliche Klassen von MHC-Molekülen (*engl.* major histocompatibility complex) den T-Zellen präsentiert. Das CD4<sup>+</sup>-Molekül der Th-Zellen ist für die Erkennung von Molekülen der Klasse MHC-II zuständig (s.g. MHC-Restriktion). Darauf folgt die spezifische Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an das Antigen-Peptid. Die Signaltransduktion des TCR wird dann über den CD3-Komplex und die  $\xi$ -Kette vermittelt, Moleküle, die mit dem TCR assoziiert an der T-Zell-Oberfläche exprimiert werden (siehe Abbildung 2).

Das Signal des TCR ist jedoch für eine vollständige Aktivierung der Lymphozyten nicht ausreichend. Nach der s.g. „zwei-Signal-Hypothese“ ist ein zweites, kostimulatorisches Signal für eine suffiziente Funktion der naiven T-Zellen Voraussetzung.

Die Expression kostimulatorischer Moleküle wird durch Mikroorganismen verstärkt, zudem spielen solche Moleküle bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Dadurch sind sie mögliche Zielmoleküle für zahlreiche therapeutische Interventionen (Übersicht bei Riley und June 2005). Die verschiedenen Wege der Kostimulation sind äußerst komplex und werden zurzeit intensiv untersucht. Dargestellt werden sollen im Folgenden die beiden am besten charakterisierten und deshalb in dieser Arbeit untersuchten Systeme.

### **1.2.1 Das CD28/B7-System**

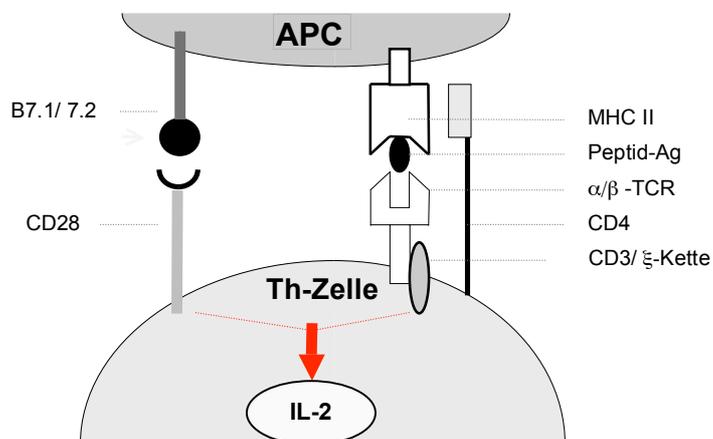
Am besten charakterisiert ist bisher das CD28/B7-System (Übersicht bei Lenschow et al. 1996, Alegre et al. 2001, Salomon und Bluestone 2001, Sharpe und Freeman 2002). Das Glykoprotein CD28 wird auf fast 100% der humanen CD4<sup>+</sup> und 50% der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten exprimiert. Die Expression von CD28 wird bei einer Aktivierung der T-Zellen noch zusätzlich verstärkt. Über die Interaktion dieses Moleküls mit den Glykoproteinen der B7-Familie erhält die T-Zelle kostimulatorische Signale. B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) weisen Unterschiede bezüglich ihrer Expression auf: B7.1 wird auf DC exprimiert, ebenso auf aktivierten B-Zellen, Monozyten und T-Zellen. B7.2 wird außerdem auch geringfügig auf ruhenden T-Zellen exprimiert sowie in höherem Ausmaß als B7.1 auf DC. Unterschiede bestehen auch hinsichtlich der Kinetik der Expression der beiden Moleküle: nach Aktivierung kommt es zu einem schnellen (nach ca.6h) Anstieg der B7.2-Expression mit maximalen Werten schon ab 24h. Die B7.1-Expression wird dagegen erst nach ca. 24h gesteigert. Maximale Werte findet man hier erst ab 48-72h und nach diesem Maximum nimmt die B7.1-Expression, anders als die B7.2-Expression rapide ab. Reguliert wird die differentielle Expression der B7-Moleküle durch eine Vielzahl von Faktoren, wie z.B. durch Zytokine (IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10) von aktivierten T-Zellen und durch direkte Interaktionen zwischen Zellen (CD40/CD40L-Bindung, siehe 1.2.2). Die Kreuzvernetzung von Immunglobulin-Rezeptoren der B-Zellen bei der Antigenbindung führt zu einer verstärkten B7.2-, nicht aber B7.1-Expression.

Die Bindung von CD28 an die B.7-Liganden der APC führt bei gleichzeitiger Aktivierung der TCR-Signaltransduktion zu einer starken Steigerung der IL-2-

Synthese (Jenkins et al. 1991) (siehe Abbildung 2). Die Aktivierung des TCR ohne gleichzeitige Kostimulation über CD28 führt zu einer unvollständigen Aktivierung der T-Zellen (De Silva et al. 1991, Harding et al. 1992). Zusätzlich induziert die CD28/B.7-Interaktion die Bildung eines anti-apoptotischen Proteins (Bcl-X<sub>L</sub>) und unterdrückt so den programmierten Zelltod (Boise et al. 1995).

Bemerkenswert ist, dass die CD28/B.7-Interaktion zwar ein obligates Signal bei der Aktivierung von naiven T-Zellen ist, bereits aktivierte oder Gedächtnis-(*engl.* memory)-T-Zellen zur Induktion einer Proliferation jedoch wesentlich geringerer kostimulatorischer Signale bedürfen (Croft et al. 1994, London et al. 2000).

Neben CD28 exprimieren T-Zellen noch ein antagonistisches Molekül, CTLA-4, das B7 mit erheblich höherer Affinität bindet. CTLA-4 übermittlelt bei Bindung an B7-Moleküle inhibitorische Signale an T-Lymphozyten und ist vermutlich für die Beendigung der Zellaktivierung verantwortlich (Übersicht in Chambers und Allison 1997, Salomon und Bluestone 2001).



**Abb.2:** Schematische Darstellung der Th-Zell-Aktivierung. Zwei Signale sind für die vollständige Aktivierung der Th-Zelle Voraussetzung: Signal 1: Aktivierung des TCR/CD3- Komplexes infolge Erkennung des MHC-gebundenen Antigens durch den TCR (mit Hilfe des Ko-Rezeptors CD4); Signal 2: Interaktion von CD28 mit den B.7 -Liganden.

Außer bei der T-Zellaktivierung spielt das CD28/B7-System noch bei anderen Abläufen der Immunantwort eine Rolle, so bei der Regulation der Zellmigration im

Rahmen von Entzündungen sowie bei der Entwicklung einer peripheren Toleranz (Übersicht bei Salomon und Bluestone 2001). Auch beeinflusst es wahrscheinlich die Th-Differenzierung, wobei hier nicht von einer prinzipiellen Induktion eines bestimmten Phänotyps auszugehen ist. *In vitro* konnte die IL-4-Produktion durch Blockade der CD28/B7-Interaktion mit einem Antikörper verhindert werden. Dieser Effekt war anscheinend auf eine mangelhafte Produktion von IL-2 zurückzuführen, da er sich durch die Zugabe von exogenem IL-2 aufheben ließ (Seder et al. 1994). Bei der Aktivierung von isolierten naiven Th-Zellen mit  $\alpha$ CD3-Ak ohne gleichzeitige Stimulation über CD28 entwickelten sich diese Zellen zu IFN- $\gamma$ - und IL-2-produzierenden Zellen. Die gleichzeitige Zugabe von  $\alpha$ CD3-Ak und  $\alpha$ CD28-Ak induzierte dagegen die Entwicklung von IL-4- und IL-5-produzierenden Zellen (King et al. 1995). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von CD28 bei der Th2-Entwicklung hin. In Abwesenheit von exogenem IL-2 *in vitro* scheint die CD28/B7-Interaktion allerdings bei der Entwicklung beider Th-Phänotypen obligat zu sein (Constant und Bottomly 1997). Die Expression von B7.2 wurde ebenfalls mit der Entwicklung eines Th2-Phänotyps in Zusammenhang gebracht (Kuchroo et al. 1995, Freeman et al. 1995), andererseits auch mit der Entwicklung eines Th1-Phänotyps (Lenschow et al. 1996) oder sogar beider Phänotypen (Lanier et al. 1995).

Ein Konzept (Lenschow et al. 1996) bringt diese vielfältigen Effekte der kostimulatorischen Moleküle mit der Kinetik und der Stärke des TCR-Signals in Verbindung. *In vitro* wurde gezeigt, dass bei schwacher TCR-Stimulation kostimulatorische Signale vornehmlich für die Th2-Differenzierung von Bedeutung waren. In einer Situation mit ausreichend starker Stimulation von CD28, war die Th-Differenzierung wiederum hauptsächlich von der Stärke des TCR-Signals abhängig. Dabei bewirkte ein starkes TCR-Signal eine Th1-Differenzierung ein schwaches hingegen eine Th2-Differenzierung (Tao et al. 1997). Zusätzlich spielt jedoch auch der Zeitpunkt der Kostimulation eine Rolle. So ist die Entwicklung eines Th2-Phänotyps aus naiven T-Zellen essentiell von der CD28/B.7-Interaktion abhängig, bei bereits aktivierten Zellen scheint jedoch auch die Aufrechterhaltung eines Th1-Phänotyps auf diese kostimulatorischen Signale angewiesen zu sein (Schweitzer und Sharpe 1998).

### 1.2.2 Das CD40/CD40L-System

Die Interaktion von CD40 mit dessen Liganden CD40L (CD154) (Übersicht bei van Kooten und Banchereau 1997, Grewal und Flavell 1998, Quezada et al. 2004) hat sowohl Einfluß auf die T-Zell-abhängige humorale als auch die zellvermittelte spezifische Immunreaktion. Beim X-chromosomal vererbten Hyper-IgM-Syndrom besteht ein Defekt im CD40L-Gen und die davon betroffenen Patienten zeigen eine insuffiziente IgG-, IgA- und IgE-Antikörperproduktion (Notarangelo und Peitsch 1996). Zusätzlich haben diese Patienten eine Schwäche der zellvermittelten Immunität, da das CD40/CD40L-System auch bei der Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen beteiligt ist.

CD40 wird auf B-Zellen, DC, Makrophagen, epithelialen Zellen und hämatopoetischen Progenitorzellen sowie aktivierten T-Zellen exprimiert. CD40L findet sich dagegen v.a. auf aktivierten - nicht jedoch auf ruhenden - T-Zellen sowie aktivierten B-Zellen und Thrombozyten, kann im Rahmen von Entzündungen jedoch auch auf anderen Zellen exprimiert werden.

B-Zellen präsentieren Peptid-Antigene MHC-II-gebunden an Th-Zellen, welche bei gleichzeitiger Kostimulation über CD28 CD40L auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die anschließende Interaktion mit dem CD40-Rezeptor von B-Zellen führt - neben einer verstärkten Expression von B7-Molekülen und somit Verstärkung der APC-Funktion von B-Zellen- zur klonalen Expansion der B-Zellen, Keimzentrumsformation, isotype-switch und Plasmazelldifferenzierung. Die CD40/CD40L-Interaktion spielt in analoger Weise auch bei der Aktivierung von Makrophagen durch Th-Zellen eine entscheidende Rolle (Übersicht bei Grewal und Flavell 1998, Quezada et al. 2004). Während ruhende Monozyten CD40 im Vergleich zu DC nur in relativ geringem Maße exprimieren, kann dies z.B. durch IFN- $\gamma$  im Rahmen einer Entzündung verstärkt werden. Auch hier kommt es nach Interaktion mit CD40L zur sekundären Hochregulation der B7-Expression. Zudem wird durch die Aktivierung die Eliminierung der zuvor phagozytierten Pathogene durch die Makrophagen initiiert. Makrophagen und vor allem DC bilden Zytokine wie IL-1 (Monozyten), IL-8, MIP-1 $\alpha$  (DC), TNF- $\alpha$  (Übersicht bei Grewal und Flavell 1998), vor allem aber kommt es zur Sekretion von IL-12 (Shu et al. 1995). Durch seine weite Verbreitung scheint CD40

auch bei der Interaktion von anderen Zellen mit T-Zellen eine Rolle zu spielen, so scheint beispielsweise die Interaktion von vaskulären Endothelzellen mit Th-Zellen über CD40/CD40L an der Migration von Entzündungszellen beteiligt zu sein (Grewal und Flavell 1998).

Während das CD40/CD40L-System eine große Bedeutung bei der Abwehr des extrazellulären Erregers *Pneumocystis carinii* sowie des intravesikulären Pathogens *Leishmania major* zu haben scheint, spielt es bei intrazytoplasmatischen Bakterien und Viren offenbar eine kleinere Rolle. So waren CD40L-defiziente Mäuse in der Lage, bei Infektion mit Viren bzw. *Listeria monocytogenes* eine suffiziente CTL-Antwort zu entwickeln (Übersicht bei Grewal und Flavell 1998). Im Gegensatz dazu zeigten CD40- und CD40L-defiziente Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Leishmania major* und in ihren T-Zellen fand sich ein Mangel an IFN- $\gamma$ . Zudem war die IL-12-Produktion in Splenozyten der Tiere im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert (Soong et al. 1996, Campbell et al. 1996, Kamanaka et al. 1996). Da eine erfolgreiche Abwehr von *L. major* wie bereits erwähnt an einen Th1-Phänotyp gekoppelt ist (s. Kapitel 1.1.2), könnte das infolge CD40/CD40L-Interaktion durch Makrophagen produzierte IL-12 Einfluß auf die Th-Phänotyp-Differenzierung haben.

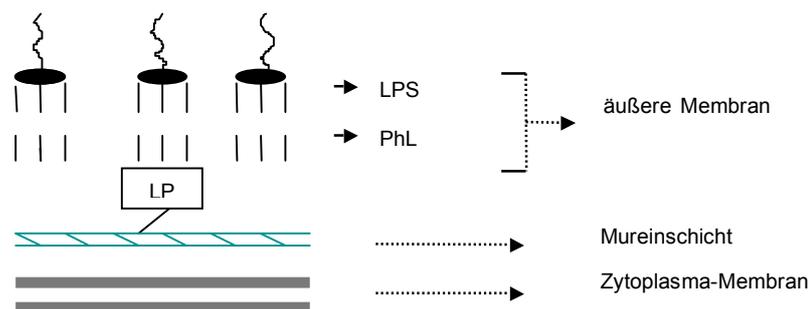
Das CD40/CD40L-System besitzt ein großes Potential in Bezug auf eine therapeutische Immunmodulation und ist deshalb Gegenstand umfassender Forschung. So gibt es zahlreiche murine Modelle diverser Autoimmunerkrankungen, bei denen die Blockade von CD40L mit Antikörpern einen protektiven Effekt hatte (Übersicht bei Vogel und Noelle 1998, Burkly 2001). Vielversprechend ist auch der Einsatz von CD40L-blockierenden Antikörpern zur Induktion einer Toleranz gegenüber Transplantaten (Übersicht bei Quezada et al. 2004).

### **1.3 Immunmodulatorische Eigenschaften bakterieller Lipoproteine und synthetischer Lipopeptidanaloga**

Bestandteile der Zellhülle von Mikroorganismen stellen bevorzugte Angriffsorte des Immunsystems dar. Manche dieser Membranmoleküle lassen sich bei einer Vielzahl

verschiedener Mikroorganismen finden. So ist z.B. das von gram-negativen Bakterien exprimierte Lipopolysaccharid (LPS) ein entscheidender Faktor sowohl bei der Entwicklung einer protektiven Immunantwort als auch einer pathologischen Reaktion in Form des Endotoxinschocks. Auch Lipoproteine sind ein häufig vorkommender Bestandteil von gram-negativen bakteriellen Zellhüllen (Wu und Tokunaga 1986, Bos et al. 2007). Am besten charakterisiert ist das Lipoprotein von *Escherichia coli* (Braun und Hantke 1974). Das für dieses Molekül kodierende Gen ist aber bei den Enterobacteriaceae wie z.B. *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter freundii* und *Klebsiella pneumoniae* hoch konserviert (Huang et al. 1983).

Lipoproteine sind im periplasmatischen Spalt der bakteriellen Membran lokalisiert (s. Abbildung 3). An ihrem N-terminalen Ende tragen sie die einzigartige Struktur des S-Glycerylcysteins, welches mit zwei Fettsäuren verestert und mit einer weiteren über eine Amidbindung gekoppelt ist (s. Abbildung 4). Diese Acyl<sub>3</sub>Cys-Struktur ermöglicht die Verankerung des Moleküls in der Phospholipidschicht der äußeren Bakterienmembran. C-terminal sind die Lipoproteine an den Peptidteil des Mureins (Peptidoglykan) gebunden (Hantke und Braun 1973). Außerdem gibt es auch freie, ungebundene Formen der Lipoproteine in der bakteriellen Zellhülle (Halegoua et al. 1974).



**Abb. 3:** Vereinfachter Aufbau der Zellhülle eines gramnegativen Bakteriums aus der Gruppe der *Enterobacteriaceae*. LPS = Lipopolysaccharid. PhL = Phospholipid. Die Lipoproteine (LP) sind mit ihrem N-terminalen, lipophilen Ende an der äußeren Membran verankert, während der C-terminale, hydrophile Teil am Peptidteil der Mureinschicht (Peptidoglykan) gebunden vorliegt.

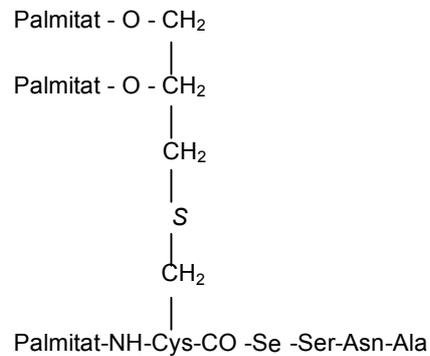
### 1.3.1 Wirkung bakterieller Lipoproteine auf B-Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile

Seit längerem ist bekannt, dass bakterielle Lipoproteine potente Mitogene für murine B-Lymphozyten sind (Melchers et al. 1975). Als für diesen Effekt entscheidende strukturelle Komponenten der Lipoproteine wurde die N-terminale Lipidmodifikation identifiziert: die Entfernung der beiden Ester-gebundenen Fettsäuren durch alkalische Hydrolyse führte zum Verschwinden der mitogenen Wirkung (Bessler et al. 1977). Synthetische Lipopeptid-Analoga (LP) des N-terminalen Teils des Lipoproteins von *E.coli* (Wiesmüller et al. 1983, siehe Abbildung 4) zeigten einen gleichartigen Effekt auf B-Zellen wie das native Molekül. Die Substitution unterschiedlicher Arten von Fettsäuren hatte keinen Effekt auf die Wirkung, dagegen war der mitogene Effekt von der Bindung mindestens einer weiteren Aminosäure (AS) an das S-Glycerylcystein abhängig. So war Pam<sub>3</sub>Cys-OH im Gegensatz zu Pam<sub>3</sub>CysSer wirkungslos (Bessler et al. 1985). Die typische N-terminale AS-Sequenz des *E.coli*-Lipoproteins (SerSerAsnAla) schien dagegen wiederum keine Bedeutung zu haben, auch mit anderen Aminosäuren substituierte Pam<sub>3</sub>Cys-LP zeigten einen gleichartigen Effekt. (Loleit et al. 1994).

An humanen B-Zellen entfalteten die Lipopeptide ihre Wirkung erst nach Übermittlung kostimulatorischer Signale mittels eines CD40-Antikörpers (Ak). Außerdem zeigte eine IL-4-Zugabe einen additiven Effekt bezüglich der Stärke der Proliferation (Edinger et al. 1994).

Murine Makrophagen und humane Monozyten wurden ebenfalls von den Lipopeptiden aktiviert und sezernierten IL-1 und Prostaglandin E<sub>2</sub> und -F<sub>2α</sub> (Hoffmann et al. 1988). Zusätzlich vermittelten die Lipopeptide bei diesen Zellen über Induktion einer TNF-α-Sekretion eine Tumor-Zytotoxizität (Hoffmann et al. 1989), induzierten eine IL-6-Sekretion und führten zu einer Abnahme der Phagozytoseaktivität sowie der Ia(MHC-II-Molekül)-Expression (Hauschildt et al. 1990a). Dosisabhängig wurden zudem die Expression der zytokin-induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) (Terenzi et al. 1995) sowie die NO-Abgabe (Hauschildt et al. 1990b) und damit direkt bakterizide

Mechanismen stimuliert. Gleichzeitig induzierten die Lipopeptide auch die Apoptose der Makrophagen (Terenzi et al. 1995).



**Abb. 4:** Strukturformel des synthetischen Lipopeptid-Analogons des N-Terminus des *E.coli*-Lipoproteins S-[2,3-bis(Palmitoyloxy)-(2*RS*)-Propyl]-*N*-Palmitoyl-(*R*)-Cysteinyl-Seryl-Seryl-Asparaginy-Alanin. (Nach Wiesmüller et al., 1983).

Weniger Daten liegen zur Wirkung von Lipopeptiden auf Granulozyten vor. Neutrophile Granulozyten wurden durch das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys-(Lys)<sub>4</sub>, dessen vier Lysin-Moleküle freie Aminogruppen in ihren Seitenketten tragen, aktiviert, nicht jedoch von weniger polaren Lipopeptiden (Seifert et al. 1990). Jüngere Untersuchungen zeigten auch eine Aktivierung Neutrophiler durch das dipalmitoylierte Lipopeptid MALP-2 (Wilde et al. 2007).

Der Einfluß bakterieller Lipopeptide auf T-Lymphozyten wurde erst später und in geringerem Maße untersucht. An isolierten Thymozyten mehrerer Spezies wurde im Vergleich zu B-Lymphozyten und zur Stimulation mit dem T-Zell-Mitogen Concanavalin A nur ein geringfügiger proliferativer Effekt des *E.coli*-Lipoproteins beobachtet (Bessler und Ottenbreit 1977), es wurden jedoch Membranveränderungen infolge der Inkubation mit dem Lipoprotein registriert (Resch und Bessler 1981).

Der Wirkungsmechanismus der Lipopeptide und der Lipoproteine blieb lange Zeit ungeklärt. 1999 wiesen dann Brightbill et al. nach, dass bakterielle Lipoproteine, nämlich das 19kD-Lipoprotein von *Mycobacterium tuberculosis*, OspA von *B.burdorferi* sowie das N-terminale Lipopeptid des *Treponema pallidum*-Lipoproteins, in humanen Monozyten die IL-12-Sekretion, die NFκB-Aktivierung und die iNOS-

Transkription über eine Bindung an den (*engl.*) Toll-like receptor (TLR)2 induzieren. Gleichzeitig fanden Aliprantis et al. (1999) ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung des synthetischen Lipopeptides Pam<sub>3</sub>Cys-Ser(Lys)<sub>4</sub> und eines synthetischen Analogons des N-Terminus des *E.Coli*-Lipoproteins. Inzwischen ist klar, dass ein Großteil der biologischen Effekte von Lipoproteinen über eine TLR2-Aktivierung vermittelt wird.

TLR stellen die entscheidenden Rezeptormoleküle der Zellen des natürlichen Immunsystems dar (Übersicht bei Takeda et al. 2003 und Miyake 2007). Unterschiedliche TLR erkennen ein definiertes Repertoire von bei Mikroorganismen musterhaft vorkommenden Molekülen (*engl.* pathogen associated molecular patterns, PAMPs) (Medzhitov und Janeway 1997), für welche die bakteriellen Lipoproteine wegen ihrer hochkonservierten Struktur prototypisch sind. Lipoproteine wirken somit über eine Aktivierung von APC durch Bindung an TLR und die sich daraufhin anschließende Zytokinexpression indirekt auch auf Zellen des spezifischen Immunsystems ein. Kürzlich wurde allerdings auch eine direkte Interaktion mit T-Zellen über auf deren Oberfläche exprimierte TLR2-Rezeptoren beschrieben (Imanishi et al. 2007).

Lipopeptide zeigen eine unterschiedliche Rezeptorbindung in Abhängigkeit von ihrer Lipidstruktur. Dipalmitoylierte Lipopeptide (Pam<sub>2</sub>Cys-), wie sie bei u.a. *Mycoplasmen* vorkommen (Mühlradt et al. 1997 & 1998), binden ein Heterodimer von TLR2 und TLR6 (Takeuchi et al. 2001, Morr et al. 2002), während trispalmitoylierte Lipopeptide (Pam<sub>3</sub>Cys-) ein Heterodimer von TLR2 und TLR1 binden (Takeuchi et al. 2002, Jin et al. 2007). Inzwischen wurde jedoch auch eine TLR6- bzw. TLR1-unabhängige TLR2-Aktivierung durch bestimmte Lipopeptide nachgewiesen (Buwitt-Beckmann et al. 2006). Auch scheint bei manchen dipalmitoylierten TLR2-Agonisten eine zusätzliche Bindung an CD36 eine Rolle zu spielen (Hoebe et al. 2005).

### **1.3.2 Einfluß des Lipoproteins OspA auf die Th-Phänotypdifferenzierung**

Weitere Untersuchungen an T-Lymphozyten wurden vor allem mit Lipoproteinen der Spirochäte *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme Borreliose, durchgeführt. Diese s.g. (*engl.*) outer surface proteins (Osp) werden auf der äußeren Membran des

Bakteriums exprimiert und besitzen wie das *E.coli*-Lipoprotein ein Pam<sub>3</sub>Cys-Motiv am N-Terminus, das für die biologischen Wirkungen der Moleküle ebenfalls von entscheidender Bedeutung ist (Weis et al. 1994). *B. burgdorferi* exprimiert allerdings im Gegensatz zu gram-negativen Bakterien kein LPS. Während bei *E. coli* die Lipoproteine infolge ihrer Lokalisation im periplasmatischen Raum (siehe Abbildung 3) durch immunkompetente Zellen schwer zu erreichen sind und erst bei Mutanten-Stämmen mit defektem oder inkompletten LPS zunehmend als Antigene in Erscheinung treten (Braun und Hantke 1974), stellen sie bei Spirochäten die dem Immunsystem bevorzugt exponierte Moleküle dar. So wurde rekombinantes OspA als Impfstoff gegen die Lyme-Borreliose bereits in einer großangelegten Studie getestet (Steere et al. 1998).

Die klinische Manifestation einer Lyme-Arthritis tritt bei bis zu 60% der mit *Borrelia burgdorferi* Infizierten auf und ist mit einer Besiedlung des Gelenkgewebes durch den Erreger verbunden. 10% der Erkrankten wiederum leiden an einer chronischen, therapieresistenten Form, die häufig erst nach mehreren Jahren ausheilt (Kamradt et al. 1995). Die mögliche Bedeutung eines bestimmten Th-Phänotyps für die Ausprägung der Lyme-Arthritis wurde erstmals an verschiedenen Mäusen beobachtet, die für die Erkrankung eine unterschiedliche genetische Anfälligkeit aufweisen. Dabei wurde einer IL-4-Produktion ein protektiver Effekt, dagegen einer IFN- $\gamma$ -Produktion ein disponierender Effekt in Bezug auf die Anfälligkeit für eine Lyme-Arthritis und deren Ausprägung nachgewiesen (Matyniak et al. 1995). In T-Zell-Linien (Yssel et al. 1991) und in den Gelenken (Yin et. al 1997) von Patienten mit Lyme-Arthritis fand man einen Th-1-Phänotyp vor.

Hypothetisch könnten *B.burgdorferi*-unspezifische T-Zellen über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine an der Auslösung bzw. Aufrechterhaltung der Entzündung beteiligt sein. Infante-Duarte und Kamradt konnten 1997 *in vitro* die Induktion eines Th1-Phänotypes durch ein *B.burgdorferi*-Lysat und synthetische Lipopetid-Analoga des OspA- und des OspB-N-Terminus nachweisen. Da der Effekt an  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor transgenen Mauszellen mit gleichzeitiger Administration des Antigens OVA beobachtet wurde, gingen die Autoren von einem TCR-unabhängigen Mechanismus aus. Für den Effekt der Lipopeptide auf die T-Zell-Differenzierung war das Vorhandensein des Trispalmitol-S-Glycerylcystein-Motivs (Pam<sub>3</sub>Cys-) obligat.

Die Induktion des Th1-Phänotyps war außerdem durch Antikörper gegen IL-12 hemmbar.

### 1.3.3 Lipopeptide als Adjuvantien

Neben ihrer möglichen infektiologischen Rolle sind bakterielle Lipoproteine und insbesondere deren synthetische Lipopeptidanaloga auch aus therapeutischer Sicht interessant. *In vitro* und im Rahmen einer Impfung kann eine zellvermittelte spezifische Immunreaktion auch ohne Verwendung eines kompletten Mikroorganismus ausgelöst werden. Zusätzlich zur Antigenadministration ist dabei jedoch die Verwendung eines sogenannten Adjuvanz notwendig. Adjuvantien sind Substanzen, die T-Zell-abhängige Immunantworten (d.h. die zelluläre Immunität als auch die T-Zell-abhängige Ak-Produktion) verstärken (Übersicht bei Cox und Coulter 1997, Schijns 2000). Adjuvantien schaffen einige entscheidende Voraussetzungen für die Aktivierung der zellulären Immunantwort. So stimulieren sie die zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen notwendigen kostimulatorischen Signale (s.o.), verstärken die Präsentation des Antigens über MHC-Moleküle und induzieren die Produktion von Zytokinen durch DC und Makrophagen.

Die Adjuvanz-Eigenschaft von bakteriellen Lipoproteinen ist schon seit längerem bekannt (Reitermann et al. 1989, Übersicht bei BenMohamed et al. 2002, Bessler et al. 2003). Bei der Anwendung von Adjuvantien am Menschen ist eine hochdefinierte synthetische Substanz einem nativen Bestandteil von Mikroorganismen aus toxikologischen und ökonomischen Erwägungen vorzuziehen (O'Hagan und Valiante 2003). Deshalb wurden zahlreiche synthetische Pam<sub>3</sub>Cys-haltige Lipopeptid-Analoga von Lipoproteinen hergestellt und deren mögliche Anwendungen in der Impfstoffentwicklung intensiv erforscht (Übersicht bei BenMohamed et al. 2002). Diese synthetischen Lipopeptide erwiesen sich *in vitro* und *in vivo* als stark wirksame Adjuvantien wenn sie simultan mit Antigenen oder kovalent gebunden an niedermolekulare Haptene verabreicht wurden (Reitermann et al. 1989).

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß synthetischer Lipopeptid-Adjuvantien auf T-Helfer-Lymphozyten und APC *in vitro* untersucht. Nativ findet sich das Pam<sub>3</sub>Cys- Motiv der Lipopeptide häufig als Bestandteil von Membran-Lipoproteinen zahlreicher gram-negativer Bakterien (s. Kapitel 1.3). Alle hier verwendeten synthetischen Lipopeptide sind zudem typische Adjuvantien und als solche Gegenstand zahlreicher Untersuchungen bezüglich einer therapeutischen Anwendung.

Pam<sub>3</sub>Cys-haltige Lipopeptid-Analoga des Lipoproteins OspA von *B.burgdorferi* können *in vitro* eine Th1-Phänotyp-Entwicklung bei  $\alpha/\beta$ -TCR transgenen Zellen, welche nicht spezifisch für OspA sind, induzieren (Infante-Duarte und Kamradt 1997). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob für diesen Effekt die am Lipidteil gebundene Aminosäuresequenz der Lipopeptide eine Bedeutung haben könnte. Bisher wurde der Aminosäuresequenz der Lipopeptide keine biologische Bedeutung zugemessen (Loleit et al. 1994 und Bessler et al. 1997). Durch Verwendung eines dipalmitoylierten Lipopeptides (Pam<sub>2</sub>Cys-) sollten zudem Rückschlüsse auf die Bedeutung der Lipidkomponente gewonnen werden.

Außerdem wurde untersucht, ob die Lipopeptide eine direkte, proliferative Wirkung auf T-Lymphozyten ausüben können. Dazu wurde die proliferative Reaktion von isolierten murinen CD4<sup>+</sup> Milz-Zellen auf die Lipopeptide mittels Messung des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus bestimmt. Bisher war lediglich die Reaktion von isolierten Thymozyten untersucht worden (Resch und Bessler 1981, Bessler et al.1985). Dabei wurde eine geringfügige Proliferation der Thymozyten beobachtet, die Autoren konnten jedoch eine Kontamination mit B-Zellen, für welche die Lipopeptide starke Mitogene darstellen, nicht ausschließen. Bessler et al. (1985) wiesen zusätzlich darauf hin, dass Thymozyten zu einem nicht unbeträchtlichen Teil unreife Zellen seien. Bei dieser Arbeit wurden die T-Helfer-Zellen aus Milzen von J<sub>H</sub>T-Mäusen isoliert. Diese Mäuse haben keine reifen peripheren B-Zellen (Gu et al. 1991 und 1993).

Da die vollständige Aktivierung von T-Lymphozyten an die Übermittlung der angemessenen kostimulatorischen Signale gebunden ist (s. Kapitel 1.2), wurde schließlich getestet, ob synthetische Lipopeptide die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Th-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen verstärken können. Dafür wurden Splenozyten von BALB/c Mäusen verwendet.

## 2 MATERIALIEN

### 2.1 Mäuse

Die Mäuse wurden von der Versuchstierzucht Berlin-Marienfelde des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) bezogen.

DO.11.10-Mäuse	Transgen für den $\alpha/\beta$ -TCR, BALB/c-background (Murphy et al. 1990). Die T-Zellen dieser Mäuse exprimieren den $\alpha/\beta$ -TCR der T-Zell-Hybridomlinie DO11.10., welcher für ein Peptid (323-339) des Ovalbumin-Proteines spezifisch ist. Das Peptid wird gebunden am MHC-Klasse II-Molekül I-A <sup>d</sup> erkannt
J <sub>H</sub> T-Mäuse	Konditionale Immunglobulin-defiziente-Mäuse, C57BL/6-background (Gu et al. 1991 und 1993). Durch Deletion der J <sub>H</sub> -Segmente und des intron-enhancers am IgH-Locus ist der Zusammenbau der schweren Ig-Ketten (H) gestört, infolgedessen sistiert die B-Zell-Differenzierung auf der Stufe der Prä-B-Lymphozyten.
BALB/c-Mäuse	H-2 <sup>d</sup> Haplotyp

### 2.2 Chemikalien, Seren, Zellkulturmedien und Puffer

#### 2.2.1 Chemikalien und Seren

Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck
BSK-H Medium	Sigma
Brefeldin A	Sigma

BSA (bovine serum albumin fraction V)	ICN Biomedicals
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
FCS (fetal calf serum)	Sigma
Ficoll Paque (Histopaque <sup>R</sup> -1083)	Sigma
Formaldehyd	Fluka ICN
L-Glutamin	Seromed
HCl	Merck
Ionomycin	Sigma
Kaninchen-Serum	Sigma
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma
NaCl	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Penicillin-Streptomycin	Seromed
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
RPMI (RoswellPark Memorial Institute) 1640	Seromed
Saponin	Sigma
[Methyl- <sup>3</sup> H]-Thymidin	Amersham
Tris-Hcl	Sigma
TryptanBlue Solution (0,4%)	Sigma

### 2.2.2 Zellkulturmedien

Komplettes Medium ( KM )	RPMI 1640 10% FCS
	10 mM L-Glutamin
	20 µM 2-Mercaptoethanol

	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
Wasch-Medium (WM)	RPMI 1640 1% FCS
<i>B. burgdorferi</i> - Medium	BSK – H 6 % Kaninchen- Serum

### 2.2.3 Puffer

PBS (Phosphate Buffered Saline)	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
	1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Erythrozyten-Lysis-Puffer	0,83% NH <sub>4</sub> Cl (w/v) in PBS
FACS-Puffer	PBS / 0,5% BSA (w/v)
MACS-Puffer	PBS/0,5% BSA(w/v)
	2 mM EDTA
Saponin-Puffer	0,5% Saponin (w/v), in PBS
Zell-Fixierungspuffer	PBS / 4% PFA (w/v)

## 2.3 Synthetische Lipopeptide, *B.burgdorferi*-Stamm N40 und Ovalbumin

### 2.3.1 Synthetische Lipopeptide

Die Lipoaminosäure Pam<sub>3</sub>Cys-OH wurde der Firma BACHEM-Feinchemikalien-KG bezogen. Alle weiteren Lipopeptide wurden freundlicherweise von Dr. Karl-Heinz Wiesmüller (NMI Reutlingen, D-72762 Reutlingen) zur Verfügung gestellt:

#### **Pam<sub>3</sub>Cys-Ser(Glu)<sub>4</sub>-OH** (MG 1694,26)

Dieses amphiphile Lipopeptid besitzt aufgrund seiner hydrophilen Glutaminsäure-Seitenketten eine besonders hohe Wasserlöslichkeit. Es zeigte im Vergleich mit

anderen Lipopeptiden eine besonders starke biologische Wirksamkeit (Metzger et al. 1991) und hatte eine besonders starke Adjuvanz-Wirkung (Reitermann et al. 1989).

**Pam<sub>3</sub>Cys-SerSerAsn** (MG 1334,26)

Das Lipopeptid entspricht dem N-Terminus des *E.coli*-Lipoproteins mit den Aminosäuren (AS) 1-4. Dieselbe N-terminale AS-Sequenz haben allerdings auch die Lipoproteine von *Serratia marcescens*, *Erwinia amylovora* und *Morganella morganii* (Übersicht bei Weyer et al. 1987). Im Gegensatz zum nativen Lipoprotein enthält dieses Lipopeptid ausschließlich die Hexadecansäure als Fettsäure, was jedoch auf den biologischen Effekt keinen Einfluß hatte (Bessler et al. 1985).

**Pam<sub>2</sub>Cys-SerSerAsnAla** (MG 1166,84)

Dieses Lipopeptid enthält die AS 1-5 des *E.coli*-Lipoproteins, es sind jedoch nur die beiden Ester-gebundenen Fettsäuren substituiert. Die bei nativen Lipoproteinen vorhandene dritte, amidgebundene Fettsäure fehlt. Eine solche Fettsäurekonstellation eines Lipoproteins wurde erstmals von Weyer et al. (1987) für die zytoplasmatische Membran eines Purpur-Bakteriums beschrieben. Bei humanpathogenen Bakterien findet sich eine solche Lipidstruktur bei verschiedenen Mycoplasmen (Mühlradt et al. 1997 und 1998, Matsumoto et al. 1998).

**Pam<sub>3</sub>Cys-LGGGSKPK-NH<sub>2</sub>** (MG 2176,26)

**Pam<sub>3</sub>Cys-SSCDSGPSNTPPEIHPV V** (MG 3219,26)

Dieses Lipopeptid stellt ein typisches Vakzin-Konstrukt dar, bei dem das Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Adjuvanz mit einem T-Zell-Epitop des Humanen Adenovirus No. 2 und 5 konjugiert ist. Erstmals wurde ein solches Konjugat mit einem Peptid des Influenzavirus hergestellt und damit *in vivo* die Bildung von virus-spezifischen CTL induziert (Deres et al. 1989).

**Pam<sub>3</sub>Cys-OH** (MG 910,5)

Da sich dieses Lipopetid bisher als biologisch unwirksam erwiesen hat, geht man davon aus, dass die Wirksamkeit der Lipopeptide an das Vorhandensein zumindest

zweier Aminosäuren (Dipeptid) am Trispalmitoyl-Motiv gebunden ist (Bessler et al. 1985). In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob diese Voraussetzung auch in Bezug auf die Wirkung auf T-Zellen gültig ist.

Von den Lipopeptiden war jeweils 1mg verfügbar. Die Lösung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys-OH wurde in Isopropanol gelöst. Dabei wurden schrittweise je 50µl des Lösungsmittels zugegeben und danach gemischt, bis sich das Peptid vollständig gelöst hatte.

Alle anderen Lipopeptide wurden in DMSO gelöst. Das Vorgehen war dabei der Lösung des Pam<sub>3</sub>Cys-OH analog. Durch Zugabe von KM wurden die Endkonzentrationen der Lipopeptide jeweils bei 100 µM festgelegt. Die Proben wurden vor der Verwendung steril filtriert.

### **2.3.2 *Borrelia burgdorferi*-Stamm N40**

*B.burgdorferi* (*B.b.*) N40, ein infektiöser, aus Zecken isolierter Stamm, wurde von J.Leong (Tufts University, Boston, Mass./USA) zur Verfügung gestellt. *B.b.*N40 exprimiert auf seiner Oberfläche die outer-surface-Proteine OspA, -B, -C und -D.

### **2.3.3 Ovalbumin**

Das Ovalbumin-Hühnereiweiß 17mer Peptid(323-339) wurde freundlicherweise vom Institut f. Med. Immunologie der Charité, CCM, Berlin zur Verfügung gestellt.

Aminosäuresequenz: 323 339

I S Q A V H A A H A E I N E A G R

MG: 2062 Da

## 2.4 Zytokine und Antikörper

### 2.4.1 Zytokine

rIL-12	Rekombinantes murines Interleukin-12 von Genetics Institute, Bosten, MA. Eingesetzte Konzentration: 10ng/ml
rIL-4	Rekombinantes murines Interleukin-4 von Genzyme. Eingesetzte Konzentration: 200U/ml
rIL-2	Rekombinantes murines Interleukin-2 von Eurocetus. Eingesetzte Konzentration: 100U/ml

### 2.4.2 Konjugierte Antikörper

Antikörper wurden teils kommerziell bezogen, teils aus Überständen von Hybridomlinien durch Frau Tuula Geske, DRFZ isoliert. Letztere wurden dann Fluoreszenz- (FITC oder PE, Amersham)-konjugiert.

$\alpha$ m IFN $\gamma$ -PE und -FITC	Klon XMG1.2. Von Pharmingen.
$\alpha$ m IL4-PE und -FITC	Clone 11B11. Von Pharmingen.
$\alpha$ mOVA-TCR (=KJ) -PE und -FITC	Klon KJ1-26.1. Dieser klonotypische Ak erkennt den DO11.10 $\alpha/\beta$ -TCR.
$\alpha$ m CD4-PE und -FITC	Klon GK1.5.
$\alpha$ m CD8-PE und -FITC	Klon 53.6.7.
$\alpha$ m Thy1-FITC	(Syn. CD90).
$\alpha$ m B220 -FITC und -PE	(Syn. CD45R). Klon RA3-6B2. Von Miltenyi Biotech.
$\alpha$ m MAC-1-FITC und -PE	(Syn.CD11b). Klon M1/17.15.11.
$\alpha$ m CD11c -Cy5 und -PE	Klon N418.
$\alpha$ m CD28-PE	Klon 37.51. Von Pharmingen.
$\alpha$ m CD80-FITC und -PE	(Syn. B7.1). Klon 16-10A4. Von Pharmingen.

$\alpha$ m CD86-FITC und -PE	(Syn. B7.2). Klon GL1. Von Pharmingen.
$\alpha$ m CD40L-PE	(Syn. CD154). Klon MR1. Von Pharmingen.
$\alpha$ m CD40-FITC	Klon 1C10. Von Pharmingen.
$\alpha$ m CD4-MicroBeads	Metallkonjugierte Ak (microbeads). Von Miltenyi Biotec.
$\alpha$ m CD8-MicroBeads	Metallkonjugierte Ak (microbeads). Von Miltenyi Biotec.

## 2.5 Kunststoffartikel, Pipetten und sonstige Materialien

American National Can	Parafilm "M"
Braun	Kanülen 0,9 x 70mm; Spritzen 12ml, 5ml
Corning/Costar	Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml; 24-, 48- und 96-well cluster; Dispenser tips 2-,5- und 12,5 ml; Bottle Top Filter 125ml; Reagent Reservoirs; Petrischalen
Dunn Labortechnik	Multichannel-Pipetten
eppendorf	Multipette; -reference; Combitips
Falcon	Cell-Strainer (70 $\mu$ m, Nylon); Röhrchen
GILSON	pipet man
Integra Biosciences	Pipetboy acu
Miltenyi Biotec	LS Separation Columns; Magnetischer Zell-Separator; MidiMACS precolumn-filter; MACS MultiStand
Packard	Unifilter GF/B-Platten; Abklebfolie;Versiegelungsfolie
Schleicher & Schuell	Einmal-Filterhalter Rotrand (0,2 $\mu$ m)

## 2.6 Geräte

Becton Dickinson: Durchflußzytometer „FACScan“ und FACScalibur“

Heraeus: Brutschrank „BB16Cu“; sterile Werkbank „Herasafe“;  
Zentrifuge Megafuge 1.0 und 1.0R, Biofuge 13R und 22R,  
Biofuge pico

Packard: Zellerntegerät „Filtermate 156 Harvester“  
Versiegelungsgerät Heatsealer Micromate 496“;  $\beta$ -  
Szintillationszähler „Microplate Scintillation counter“

## **3 METHODEN**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Splenektomie bei Mäusen**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Das Fell wurde mit 70% Rotisol desinfiziert. Die für den Eingriff verwendeten Instrumente waren zuvor sterilisiert worden. Es wurde ein links-lateraler, longitudinaler Hautschnitt vorgenommen und danach mit einem zweiten Instrument das Peritoneum eröffnet. Die Milz wurde mit einer sterilen Pinzette entnommen und in ein mit sterilem PBS gefülltes Röhrchen gegeben. Dieses Röhrchen wurde sofort mit Eis gekühlt.

#### **3.1.2 Gewinnung einer Einzelzellsuspension**

Das entnommene Organ wurde unverzüglich unter einer sterilen Werkbank weiterverarbeitet. Sämtliche dabei benutzten Materialien waren zuvor sterilisiert worden.

Die Milz wurde mit Hilfe einer Pipette aus dem Röhrchen entnommen und in ein steriles, feines Sieb überführt. Dieses wurde in einer mit 10 ml PBS gefüllten Petrischale abgelegt. Die Milz wurde mittels eines Spritzenkolbens homogenisiert. Das Sieb wurde mit 40ml PBS durchgespült, anschließend die so erhaltene Zellsuspension aus der Schale in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 x g 6 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 50ml PBS resuspendiert. Um Stroma- und Fettgewebsreste, welche die nachfolgende Gradientenzentrifugation beeinträchtigen könnten, zu entfernen, wurde die Lösung dann durch einen Filter (*engl.* cell-strainer; Porengröße 70 µm) gegeben, und nochmals für 6 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 5ml PBS (bei Raumtemperatur, RT) resuspendiert.

### 3.1.3 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung mononukleärer Zellen

Grundlage dieser Methode ist die unterschiedliche Dichte verschiedener Zellarten. Das Lymphozytentrennmedium, Ficoll-Paque, hat eine Dichte von 1,077 g/ml. Der Dichteunterschied zur Zellsuspension führt bei Zugabe zur Bildung zweier getrennter Phasen. Nach dem Zentrifugieren erhält man drei Phasen: die Erythrozyten und Granulozyten befinden sich in der untersten, das Ficoll-Paque in der obersten Phase und die mononukleären Zellen in der Interphase. Voraussetzung für das Gelingen der Methode ist die Vermeidung einer Vermischung der Phasen. Dazu ist auch auf eine gleichartige Temperatur des Ficoll-Paque und der Zellsuspension zu achten. Beide Lösungen wurden bei RT verwendet und ebenfalls bei RT zentrifugiert.

Nach Resuspension der isolierten Milzzellen in 5ml PBS (s. 3.1.2), wurden 5ml Ficoll-Paque langsam auf den Boden des Röhrchens pipettiert und die Zellsuspension so mit dem Trennmedium "unterschichtet". Das Röhrchen wurde bei 700 x g und ausgeschalteter Bremse für 20 Minuten zentrifugiert, die Interphase dann mit einer 5ml-Pipette abgenommen und mit 50ml Waschmedium versetzt. Daraufhin wurde diese Suspension 8 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in gleicher Weise noch einmal mit WM gewaschen und schließlich mit 10ml KM für die Zellzahlbestimmung resuspendiert.

### 3.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die Zählung wurde eine Probe aus der Zellsuspension entnommen und mit Trypitanblau im Verhältnis 1:1 angefärbt. Dieser Farbstoff diffundiert in tote Zellen und färbt ihre Kerne blau an, während lebende Zellen ihn aktiv ausschließen können. Abgestorbene und lebende Zellen lassen sich somit lichtmikroskopisch differenzieren.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Diese besteht aus 4 großen Quadraten, die jeweils in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Jedes der großen Quadrate hat eine Fläche von  $1\text{mm}^2$ , eine Tiefe von 0,1mm und ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ . Die Zahl der lebenden Zellen errechnet sich nach der Formel:

Zellzahl/ml =  $n \times 2 \times 10^4$  (Gesamt-Zellzahl =  $n \times 2 \times 10 \times 10^4$ ). Dabei gilt:  $n$  = Anzahl der Zellen in einem großen Quadrat. 2=Verdünnungsfaktor; 10= Suspensionsvolumen der Zellen (s. 3.1.3).

### 3.1.5 *In vitro* Kultur von $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Milzzellen

#### 3.1.5.1 Kulturbedingungen

Alle Mauszellen wurden in KM und unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Temperatur:	37°C
CO <sub>2</sub> -Konzentration:	5%
Luftfeuchtigkeit:	95%

#### 3.1.5.2 Primärstimulation

Nach der Zählung wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (6Min. bei 200 x g) und das Pellet in einem adäquaten Volumen KM resuspendiert.

Für die Zellkultur wurden 24-well-Platten mit einem Volumen von 2ml pro Vertiefung verwendet. Für jeden Ansatz wurden  $4 \times 10^6$  Zellen/well in die Vertiefungen einer 24-well-plate pipettiert. Pro Ansatz wurde das Antigen Ovalbumin in einer Konzentration von 0,3µM zugegeben.

Als negative Kontrolle wurden einer Vertiefung mit Zellen außer OVA keine weiteren Reagentien zugesetzt. Diese Zellen entwickeln sich dann zu sogenannten Th0-Zellen, welche geringe Mengen IFN- $\gamma$  und noch geringere Mengen IL-4 produzieren (Firestein et al. 1989).

Zur positiven Kontrolle der Induktion eines Th1-Phänotyps dienten ein Ansatz mit Zusatz von IL-12 (Openshaw et al. 1995) in einer Konzentration von 10 ng/ml und ein weiterer Ansatz mit Zusatz von *Borrelia burgdorferi* N40(=Bb)-Lysat (Infante-Duarte und Kamradt 1997) in einer Konzentration von 10µg/ml. Zusätzlich wurde eine Kultur mit Zusatz von 200U/ml IL-4 angesetzt. Diese Kontrolle diente zur Induktion eines Th2-Phänotyps (Le Gros et al. 1990).

Die Tripamitol-S-Glycerylcystein-Lipopeptide (s. Kapitel 2.3.1) wurden zunächst jeweils in Konzentrationen von 0,1µM, 1µM und 10µM eingesetzt, um so eine optimale Konzentration für die Induktion einer Zytokinproduktion zu ermitteln. Auf Basis dieser Experimente wurden die Lipopetide später in einer Konzentration von 10µM angewendet.

### 3.1.5.3 Expansion

Am 3. Tag der Kultivierung wurden die Kulturen expandiert. Die Zellen wurden resuspendiert, dann wurde der betreffende Primäransatz auf insgesamt 4 Vertiefungen (à 500µl) verteilt. IL-2 wurde in einer Konzentration von 100U/ml zugegeben (Infante-Duarte und Kamradt 1997). Schließlich wurde jeder Ansatz mit KM auf 2ml aufgefüllt, durchmischt und erneut inkubiert.

### 3.1.5.4 Stimulation der Zellen zur Zytokinexpression und Hemmung der Sekretion

Im Abschnitt 3.2.2 wird die intrazelluläre Zytokinfärbung beschrieben. Diese Methode ermöglicht es, die Expression von Zytokinen mit Hilfe der Durchflußzytometrie zu analysieren. Um die Zytokine anfärben zu können, müssen die Zellen zunächst jedoch zu einer genügenden Expression derselben stimuliert werden. Dazu wurden PMA und Ionomycin verwendet. Am 7.Tag der Kultivierung wurden alle Ansätze jeweils mit 5ng/ml PMA und 1ng/ml Ionomycin versetzt und nach Mischen für 3 Stunden inkubiert (Kulturbedingungen wie in 3.1.5.1).

Nach der Stimulation der Zellen wurde deren Sekretionsleistung blockiert, um so die Zytokine in der Zelle zu halten. Dazu wurde Brefeldin A, welches die Bildung der Transportvesikel am Endoplasmatischen Retikulum verhindert (Openshaw et al. 1995), in einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Zellen dann geerntet.

### 3.1.5.5 Ernte der Zellen am 7.Tag

Die Kulturen wurden in 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und einmal mit WM gewaschen. Nach dem Zentrifugieren (6 Min. bei 200 x g) wurden die Zellen in jeweils 10 ml KM resuspendiert und gezählt (s. 3.1.4). Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert.

#### 3.1.5.6 Fixierung der Zellen

Durch die Fixierung wird die Weiterverarbeitung der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht.

Die Zellen wurden jeweils in 4ml PBS resuspendiert und 10 Min. bei 200 x g zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen wurden das Pellet dann in 250µl PBS resuspendiert. 250µl Zell-Fixierungspuffer (PBS/4%PFA) wurden zugemischt und die Zellen danach 15 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Fixierungsvorgang durch Zugabe von 1ml PBS/0,5%BSA gestoppt und die Zellen wurden zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5ml PBS/ 0,5%BSA resuspendiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die fixierten Zellen bei 4°C gelagert.

#### 3.1.5.7. *in vitro* Kultivierung von CD8<sup>+</sup>-depletierten Zellen von $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Mäusen

In einem gesonderten Experiment sollte der Einfluss der Lipopeptide auf die IFN- $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup> Zellen von  $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Mäusen untersucht werden (s. 4.1.7).

Dazu wurden mononukleäre Zellen von  $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Mäusen wie in 3.1.1.–3.1.4 beschrieben gewonnenen und ein Teil der Zellen unter Zugabe von OVA und der Lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys-SSN bzw. Pam<sub>3</sub>Cys- LGGGSKPK-NH<sub>2</sub> wie in 3.1.5 beschrieben kultiviert. Zur Kontrolle wurden zudem Zellen unter alleiniger Zugabe von OVA kultiviert.

Der andere Teil der Zellen wurde im gleichen experimentellen Ansatz unter denselben Bedingungen kultiviert, zuvor wurden jedoch die CD8<sup>+</sup> Zellen depletiert worden. Die Depletion war wie in 3.1.6.2 beschrieben mittels MACS durchgeführt worden. Im Gegensatz zu der in 3.1.6.2 beschriebenen Isolation von CD4<sup>+</sup> Zellen

wurde bei der Depletion ein  $\alpha$ CD8-microbead-gekoppelter Antikörper (Ak) verwendet, anschließend wurden die nicht-markierten Zellen zur Weiterverarbeitung verwendet. Zur Kontrolle des Reinheitsgrades wurden jeweils eine Probe des nicht-CD8-depletierten Zellgemisches und eine des CD8-depletierten Zellgemisches wie in 3.2.3 beschrieben mit den fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern  $\alpha$ CD8-PE und  $\alpha$ Thy1-FITC doppelt gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (s. 3.2.1).

Die Zellkulturen wurden wie 3.1.5.2–3.1.5.5 weiterverarbeitet. Die intrazelluläre Zytokinfärbung mit  $\alpha$ IFN- $\gamma$ -FITC und die anschließende durchflusszytometrische Analyse der IFN- $\gamma$ -Produktion sind in Kapitel 3.2 beschrieben.

### **3.1.6 *in vitro* Kultivierung von selektierten Splenozyten aus BALB/c- und J<sub>H</sub>T-Mäusen für einen Proliferationstest**

#### 3.1.6.1 Vorbereitung

Eine Milz-Einzelzellsuspension der BALB/c- und der J<sub>H</sub>T-Mäuse wurde wie in 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben hergestellt. Dann wurden zunächst die Erythrozyten lysiert. Der Lysis-Puffer PBS/0,83%NH<sub>4</sub>Cl kann ungehindert in die Erythrozyten diffundieren. Da diesen die Fähigkeit zum aktiven Transport von Ionen und Wasser fehlt, führt der resultierende Wassereinstrom zu einem erhöhten osmotischen Druck und zum Platzen der Erythrozyten.

Die Zellsuspension wurde mit 10 ml PBS/0,83%NH<sub>4</sub>Cl versetzt und 8 Min. bei RT inkubiert. Dann wurde die Lyse durch Zugabe von 40 ml PBS/0,5%BSA gestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Es wurde noch einmal mit PBS/0,5%BSA gewaschen und das Pellet dann in 10 ml KM resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt (s. 3.1.4). Eine Probe der Zellen wurde als Referenz für die Kontrolle der CD4<sup>+</sup>-Selektion entnommen (s. 3.1.6.3).

#### 3.1.6.2 Isolation von CD4<sup>+</sup> Zellen mittels MACS

MACS (*engl.* Magnetically Associated Cell Sorting, Miltenyi Biotech) ist eine Methode zur Trennung von Zellen in Suspensionen auf Grundlage der Expression

verschiedener Oberflächenmoleküle. Je nachdem welche Zellart aus der Suspension isoliert bzw. entfernt werden soll, wird diese Population mit einem Antikörper (Ak) gegen das entsprechende Oberflächenantigen markiert. Die Ak sind wiederum an Metallpartikel (*engl.* beads) gekoppelt. Nachdem die Zellsuspension mit den Ak reagiert hat, wird sie auf eine mit Metallwolle gefüllte Säule pipettiert, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die Ak-markierte Population bleibt beim Durchlaufen der Säule infolge der Kopplung mit den beads im Magnetfeld hängen. Es ist möglich, sowohl die markierten Zellen, als auch die nicht-markierten Zellen zur Weiterverarbeitung zu verwenden.

Mittels MACS wurden die CD4-positiven Zellen aus der J<sub>H</sub>T-Maus Milzzellsuspension (s. 3.1.6.1) isoliert. Alle Reagentien und Geräte wurden dabei genau nach Angaben des Herstellers (Mitenyi Biotec) verwendet.

#### 3.1.6.3 Kontrolle des Reinheitsgrades der CD4<sup>+</sup>-Isolation

Eine Probe der isolierten Zellen wurde entnommen und für verschiedene Oberflächenantigenfärbungen aufgeteilt, ebenso die Probe für den Referenzwert (s. 3.1.6.1). Dabei wurde vorgegangen, wie in 3.2.3 beschrieben. Die durchflußzytometrische Analyse ist in 3.2.1 dargestellt. Folgende Einzelfärbungen wurden angefertigt:  $\alpha$ B220-FITC,  $\alpha$ MAC-1-PE und  $\alpha$ CD4-PE.

#### 3.1.6.4 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden auf einer 96-well-plate kultiviert. Das Volumen einer Vertiefung betrug jeweils 200  $\mu$ l. Die unterschiedlichen Ansätze wurden jeweils dreifach (in Triplikaten) angefertigt.

In jede Vertiefung wurden  $10^5$  CD4<sup>+</sup>-Zellen pipettiert. Als negative Kontrolle (*engl.* background) diente ein Ansatz mit KM und Zellen ohne Beimischung eines Lipopeptides. Die synthetischen Lipopeptide (s. 2.3.1) wurden jeweils in den Konzentrationen 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M verwendet. Die Zellen wurden schließlich unter den bereits erwähnten Bedingungen inkubiert

### **3.1.7 *in vitro* Kultivierung von BALB/c-Splenozyten zur Analyse der Expression kostimulatorischer Moleküle**

#### **3.1.7.1 Vorbereitung**

Einzelzellsuspensionen von BALB/c-Milzen wurden hergestellt (s. 3.1.1 und 3.1.2) und die Erythrozyten wurden lysiert (s. 3.1.6.1). Die Zellen wurden gezählt (s. 3.1.4) und eine Probe wurde wie in 3.2.4 beschrieben gefärbt (*ex vivo*-Färbung, 0h) und durchflußzytometrisch analysiert.

#### **3.1.7.2 Kulturbedingungen**

Die Zellen wurden auf zwei 6-well-plates (Volumen/well: 8ml) kultiviert. Pro Platte wurden in 3 Vertiefungen jeweils  $32 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 1ml KM pipettiert. Ein Ansatz diente dabei als Kontrolle und wurde mit KM auf das Endvolumen von 8ml aufgefüllt. Den beiden anderen Ansätzen wurde  $5\mu\text{M Pam}_3\text{Cys-SerSerAsn}$  bzw.  $\text{Pam}_3\text{Cys-OH}$  zugegeben und mit KM auf das Endvolumen aufgefüllt. Die beiden Mikrotiterplatten wurden anschließend bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Nach 24h wurde eine der Platten aus dem Brutschrank entnommen. Die Zellen wurden geerntet (s. 3.1.5.5) und mit Fluoreszenz-konjugierten Ak gegen kostimulatorische und andere Oberflächenmoleküle gefärbt (s. 3.2.4). Anschließend wurden sie durchflußzytometrisch analysiert. 48h nach Beginn der Inkubation wurden die Zellen der zweiten 6-well-plate in gleicher Weise geerntet und verarbeitet.

## **3.2 Durchflußzytometrie**

### **3.2.1 Grundlagen**

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspensionen anhand von Lichtstreuungseigenschaften und von Fluoreszenzemissionen. Ein Durchflußzytometer des verwendeten Typs *FACScan* (*engl.* Fluorescence Activated Cell Scan) mißt gleichzeitig die relative Zellgröße, die

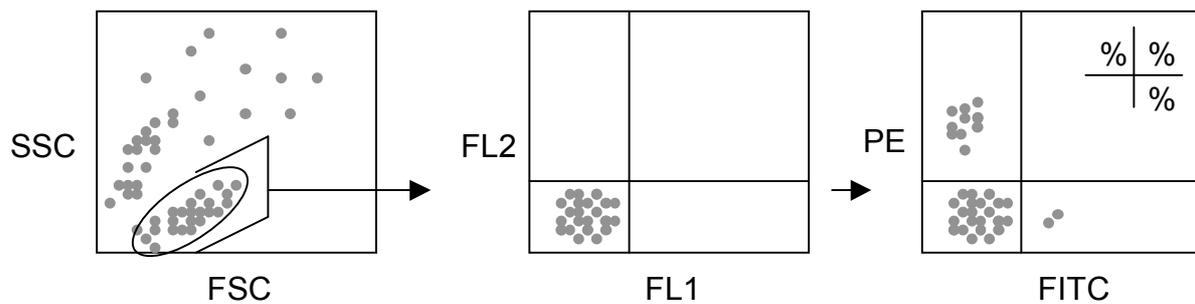
Granularität sowie 3 verschiedene Fluoreszenzen. Die Zellen werden zunächst mit Fluorochrom-gekoppelten Ak versetzt. Zur Analyse wird 1ml der Zellsuspension in ein Proberöhrchen gegeben. Die Zellen gelangen über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Meßbereich. Dort treten sie in eine haarfeine Meßküvette ein, die sie jeweils nur einzeln passieren können. Die Meßküvette wird von einem Argonlaser (488 nm, 200 mW) durchstrahlt. Die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden durch Spiegel- und Filtersysteme auf verschiedene Photodetektoren (Photodioden und Photomultiplier) geleitet, welche die optischen Signale in elektrische Pulse umwandeln. So können die Meßdaten über einen angeschlossenen Computer gespeichert und verarbeitet werden.

Von jeder Zelle werden folgende Parameter analysiert:

- Vorwärtsstreuung (*engl.* Forward Scatter, FSC): sie tritt in einem Bereich von 0-10° auf und ist abhängig von der Querschnittsfläche der Zellen. Sie ist proportional der Zellgröße.
- Seitwärtsstreuung (*engl.* Sideward Scatter, SSC): sie tritt in einem Bereich von 90° auf und ist abhängig vom Refraktionsindex. Sie ist proportional zur Granularität der Zelle.
- Fluoreszenzintensität 1 (FL1): sie ist proportional zu der Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). FITC hat ein Absorptionsmaximum von 492 nm ein Emissionsmaximum zwischen 520 nm und 530 nm.
- Fluoreszenzintensität 2 (FL2): sie ist proportional zu der Intensität der Anfärbung mit R-Phycoerythrin (PE). PE hat ein Absorptionsmaximum von 488 nm und ein Emissionsmaximum zwischen 570 nm und 576 nm.
- Fluoreszenzintensität 3 (FL 3): sie ist proportional zu der Intensität der Anfärbung mit Propidiumiodid (PI). PI hat ein Absorptionsmaximum von 536 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm.

Ein Durchflußzytometer der Marke FACScalibur kann zusätzlich noch eine weitere Fluoreszenz messen:

- Fluoreszenzintensität W (FLW): sie ist proportional zur Intensität der Anfärbung mit  $\alpha$ DIG-Cy5 (Cy5). Cy5 hat ein Absorptionsmaximum zwischen 625 und 650 nm und ein Emissionsmaximum von 670 nm.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung einer durchflußzytometrischen Analyse. Im SSC/FSC-Dot-Plot-Diagramm wird die betreffende Zellpopulation markiert (*gating*, links). Die markierten Zellen werden dann in einem FL1-FL2-Dot-Plot-Diagramm isoliert dargestellt (Mitte). Das Anlegen von Quadranten bei den noch ungefärbten Zellen (Mitte) ermöglicht dann bei gefärbten Zellen (rechts) Aussagen über den jeweiligen Anteil der positiv gefärbten Zellen an der Gesamtpopulation (*quadrant statistics*). SSC = sideward scatter; FSC = forward scatter; FL= Fluoreszenzintensität 1 und 2; PE = Phycoerythrin; FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte auf einem Macintosh-Rechner mittels des Programmes „CELLQuest“ (Becton Dickinson). Dabei wird anhand eines FSC-SSC-Dot-Plot-(oder Density Plot-) Diagrammes die betreffende Lymphozytenpopulation mit einem Fenster markiert (*engl. gating*). Danach werden die Zellen aus diesem Fenster in einem FL1-FL2-Dot-Plot-Diagramm dargestellt. Anhand einer ungefärbten Negativkontrolle werden Quadranten in dieses Diagramm eingefügt, welche die Abgrenzung zu positiven Zellen erlauben. Diese Markierung wird auch für die gefärbten Proben beibehalten, so dass eine statistische Auswertung ermöglicht wird („Quadrant Statistics“) (s. Abb. 5).

### 3.2.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Methode ermöglicht die Analyse der Zytokinproduktion von vorbehandelten (s. 3.1.5.4) Zellen. Von den Zellen aus den verschiedenen Kulturansätzen wurden jeweils 3 Proben angefertigt:

- eine ungefärbte Probe als Negativkontrolle
- eine mit anti- IFN- $\gamma$  -PE oder-FITC gefärbte Probe
- eine mit anti- IL-4 -PE gefärbte Probe

Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/0,5% Saponin resuspendiert. Diese Lösungen sowie die gefärbten Zellen wurden ständig auf Eis gekühlt. Die nach siebentägiger Kultivierung stimulierten und fixierten  $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Zellen (s. 3.1.5) wurden abzentrifugiert (10 Min. bei 200 x g). Dann wurden sie mit 1ml PBS/0,5% Saponin versetzt und 5 Min. bei RT stehengelassen. Saponin permeabilisiert die Zell-Membran, so dass die Färbeantikörper in die Zelle diffundieren können. Die Zellen wurden anschließend erneut zentrifugiert und in 300 $\mu$ l PBS/0,5% Saponin resuspendiert. Dieses Volumen wurde gleichmäßig auf drei 1,5 ml-Zentrifugengefäße verteilt. Diese Gefäße wurden bei 150 x g für 10 Min. zentrifugiert. Die Zellen, die zur Negativkontrolle bestimmt worden waren, wurden in 100 $\mu$ l PBS/0,5% Saponin resuspendiert, die Zellen in den anderen beiden Gefäßen wurden mit 100 $\mu$ l der jeweiligen Ak/Saponin-Puffer-Lösung (1:100) versetzt. Nach einer 15 min. Färbereaktion bei 4°C wurden die Zellen mit 1ml PBS/0,5% Saponin versetzt und zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen mit Saponin-Puffer wurde zweimal mit jeweils 1ml PBS/0,5% BSA gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 1ml PBS/0,5% BSA resuspendiert, auf Eis gekühlt und sofort durchflußzytometerisch analysiert.

### 3.2.3 Färbung von Oberflächenantigenen

Eine Zellkultur von OVA-stimulierten  $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Mauszellen wurde auf die Expression von Oberflächenantigenen untersucht. Eine Maus wurde splenektomiert (s. 3.1.1) und eine Einzelzellsuspension wurde hergestellt (s. 3.1.2). Nach einer Gradientenzentrifugation und Entnahme der mononukleären Zellen (s. 3.1.3) wurden diese Zellen gezählt (s. 3.1.4). Eine Probe der Zellen wurde entnommen und gefärbt, um die Oberflächenantigenexpression am Tag 0 (*ex vivo*) der Kultivierung zu bestimmen. Die Probe wurde auf 7 1,5ml-Gefäße verteilt und bei 150 x g für 10 Min. zentrifugiert. Es wurde einmal mit 1ml PBS/0,5% BSA gewaschen. Ein Gefäß mit

Zellen diente als ungefärbte Negativkontrolle und wurde mit 100µl PBS/0,5%BSA versetzt, die anderen wurden mit 100µl der jeweiligen Ak-PBS/0,5%BSA-Mischung (1:100) versetzt. Folgende konjugierte Ak wurden eingesetzt:

<b>Einzelfärbungen</b>	<b>Doppelfärbungen</b>
αB220-FITC	αCD4-PE / αKJ-FITC
αKJ-FITC	αCD8-PE / αTy1- FITC
αCD4-PE	
αCD8-PE	

Die Zellen wurden für 15 Min. bei 4°C gefärbt, anschließend mit 1ml PBS/0,5%BSA versetzt und zentrifugiert. Es wurde noch zweimal mit jeweils 1ml PBS/0,5% BSA gewaschen. Die Proben wurden dann auf Eis gestellt, abgedeckt und sofort per *FACScan* analysiert. Unmittelbar vor der Messung wurde zu jeder Probe 1µl PI gegeben. Propidiumiodid lagert sich in die DNS toter Zellen ein. Diese Markierung (FL3) ermöglicht es, tote (und somit eventuell unspezifisch angefärbte) Zellen von der Darstellung im FL1-FL2-Dot-Plotdiagramm (s. 3.2.1) auszuschließen.

Nach der Färbung der Probe wurden die gezählten Zellen unter alleiniger Ovalbumin-Zugabe kultiviert (s. 3.1.5.1 und 3.1.5.2). Am 3. Tag wurde die Kultur expandiert (s. 3.1.5.3) und am 7. Tag geerntet (s. 3.1.5.5). Die Zellen wurden nun wie oben beschrieben gefärbt und mit dem FACS analysiert.

### **3.2.4 Färbung von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen**

Die wie in 3.1.7 beschrieben kultivierten Zellen wurden zu den dort definierten Zeitpunkten geerntet. Kostimulatorische Oberflächenmoleküle wurden wie im Folgenden dargestellt mit Antikörpern gefärbt. Die Färbungen wurden wie in 3.2.3 geschildert durchgeführt. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Proben zusätzlich mit PI gefärbt.

## Doppelfärbungen

$\alpha$ CD40-FITC	/ $\alpha$ B220-PE / $\alpha$ CD11b-PE / $\alpha$ CD11c-PE	$\alpha$ CD86-FITC	/ $\alpha$ B220-PE / $\alpha$ CD11b-PE / $\alpha$ CD11c-PE
$\alpha$ CD80-PE	/ $\alpha$ B220-PE / $\alpha$ CD11b-PE / $\alpha$ CD11c-Cy5	$\alpha$ CD4-FITC	/ $\alpha$ CD28-PE / $\alpha$ CD40L-PE

Die durchflußzytometrische Analyse gestaltete sich hierbei anders als oben beschrieben. Es ist nicht möglich, die doppelpositiven Zellpopulationen in einem FL1/FL2-Dot-Plot-Diagramm hinreichend isoliert zu beurteilen und somit ist eine statistische Auswertung mittels Quadrantensetzung nicht verlässlich. Es ist jedoch möglich, die B220-, CD11b-, CD11c- und CD4-positiven Populationen in dieser Diagrammform zu indentifizieren. Diese Zell-Populationen wurden jeweils mit einem Gate markiert. Die Gates wurden dann in einer Einzelfloureszenzdarstellung (Histogramm) für die jeweils andere Floureszenz der Doppelfärbung dargestellt. Durch Vergleich der Veränderungen der mittleren Floureszenzintensitäten (*engl.* mean fluorescende intensity, mfi) in diesen Darstellungen im Zeitverlauf (*ex vivo*, 24h,48h,78h), konnten schließlich Veränderungen der Expression kostimulatorischer Moleküle auf den verschiedenen Zellen analysiert werden.

## 3.3 Analytische Methoden

### 3.3.1 Proliferationstest

Proliferierende Zellen haben einen von der Stärke der Proliferation abhängigen Substratbedarf. So ist z.B. der Umsatz des Pyrimidin-Nucleosids Thymidin ein Indikator für die proliferative Aktivität einer Zelle. Bei einem Proliferationstest läßt sich dieser Umstand ausnutzen, indem man den Zellen Tritium(<sup>3</sup>H)-markiertes Thymidin als Substrat zur Verfügung stellt. Der Einbau des Thymidins in die DNS in Abhängigkeit von der Proliferation der Zellen ist dann direkt proportional zu dem ( $\beta$ -)

Zerfall des Wasserstoffisotopes Tritium. Durch Messung dieser Radioaktivität mit einem  $\beta$ -counter kann man somit indirekt die proliferative Tätigkeit der Zellen analysieren.

Getestet wurde die proliferative Reaktion von  $CD4^+$ -T-Zellen auf den Kontakt mit den synthetischen Lipopeptiden (s. 2.3.1). Bei diesen Substanzen handelt es sich um starke B-Zell-Mitogene (Melchers et al. 1975), außerdem stimulieren sie auch Monozyten/Makrophagen (Hoffmann et al. 1988) sowie Granulozyten (Seifert et al. 1990). Da sich beim Proliferationstest keine Aussage über die Art der proliferierenden Zellen machen läßt, mußten alle diese Zellen zuvor aus der Suspension entfernt werden. Da sich eine vollständige Beseitigung besonders der B-Zellen aus Milzzellsuspensionen schwierig gestaltet, wurden neben Zellen von BALB/c- in einem zweiten Ansatz auch Zellen von  $J_H$ T-Mäusen für den Test verwendet, welche infolge gezielter Deletion der  $J_H$ -Segmente und des enhancers des IgH-Locus keine differenzierten B-Zellen produzieren können (Gu et al. 1991 und 1993).

Die Isolierung der  $CD4^+$ -T-Zellen und der Kulturansatz wurden in 3.1.6 beschrieben. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Beginn der Kultivierung aus dem Inkubator genommen. Die Zellansätze wurden jeweils unter sterilen Bedingungen mit 1mCurie  $^3H$ -Thymidin versetzt. Dann kamen die Platten für weitere 18 Stunden in den Brutschrank. Nach dieser Frist wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät auf eine Filterplatte überführt. Diese wurde insgesamt 9x gewaschen, um Überstandreste mit ungebundenem  $^3H$ -Thymidin zu entfernen. Nach 20minütiger Trocknung bei  $56^\circ C$  wurde die Plattenunterseite wasserdicht abgeklebt. Es wurden jeweil 30 $\mu$ l Szintillationsflüssigkeit auf die einzelnen Filterplättchen gegeben und die Platte dann versiegelt. Anschließend wurde die Platte in einem  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen.

### **3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes von *B.burgdorferi*-N40-Lysat**

Der Proteingehalt wurde mittels eines BCA-Protein Assay bestimmt. Die bicinchonische Säure (BCA) als wasserlösliches Natriumsalz ist ein spezifisches Reagenz für  $Cu^+$ -Ionen. Bei Zugabe von  $Cu^{2+}$ -Ionen (Reagenz B) reagieren diese mit

Proteinen und werden dabei (im alkalischem Milieu bedingt durch Reagenz A) zu  $\text{Cu}^+$  reduziert. Einwertiges Kupfer reagiert dann mit BCA und bildet dadurch ein wasserlösliches Farbprodukt, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562nm liegt.

Die Standards und Proben wurden nach Angaben des Herstellers für 30 Min. bei 60°C mit den Reagenzien inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 562nm gegen eine Referenz am Photospektrometer gemessen.

## **3.4 Mikrobiologische Methoden**

### **3.4.1 *Borrelia burgdorferi* Aufzucht**

Ein Kryoröhrchen mit 1ml gefrorenen *B.burgdorferi* wurde aufgetaut und in ein 15ml-Röhrchen überführt. 14 ml BSK-H Medium mit 6% Kaninchen-Serum wurden dazugegeben. Die mikroaerophilen Spirochäten wurden dann in dicht geschlossenen Röhrchen bei 32°C für 8 Tage im Brutschrank kultiviert. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden jeweils 5 ml der Kultur mit BSK-H/6% Kaninchen-Serum auf 50 ml aufgefüllt und erneut für 8 Tage inkubiert. Dieses Vorgehen wurde noch dreimal wiederholt.

Während der Aufzucht wurden mögliche Kontaminationen sowie der Vitalitätszustand der Borrelien regelmäßig im Dunkelfeld-Mikroskop überprüft. Die Zugabe von Medium und die Entnahme von Proben wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

### **3.4.2 Herstellung von *B. burgdorferi*-Lysat**

Die Borrelienkulturen wurden bei 10.000 x *g* für 20 Min. bei 4°C in speziellen Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Das Pellet wurde 3 x in PBS gewaschen (10 Min. bei 10.000 x *g*) und zuletzt in 5-10 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Borrelien mit einem sterilen Ultraschall-Sonicator lysiert. Die Suspension wurde dann 20 Min. bei 10.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand mit den wasserlöslichen Proteinen wurde mit einer 10ml-Pipette entnommen und steril filtriert. Das Pellet wurde

verworfen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe eines BCA-Protein-Assays (von Pierce) bestimmt (s. 3.3.2). Das Lysat wurde in 1ml Aliquots gegeben und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Proben, die für den Verbrauch innerhalb von 4 Wochen bestimmt waren wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Th-Phänotyp-Differenzierung von DO11.10 transgenen T-Zellen *in vitro*

Adjuvantien sind Substanzen, die die gegen ein Antigen gerichtete spezifische Immunantwort verstärken bzw. modifizieren (Übersicht bei Cox und Coulter 1997, Schijns 2000). Synthetische Lipopeptide wurden bereits erfolgreich als Adjuvantien bei Immunisierungen eingesetzt (Übersicht bei BenMohamed et al. 2002, Moyle und Toth 2008). Zur näheren Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften von synthetischen Lipopeptiden *in vitro* wurden in dieser Arbeit  $\alpha/\beta$ -TCR-transgene Zellen verwendet, welche spezifisch für ein Peptid des Ovalbumins (OVA) sind. Infante-Duarte und Kamradt (1997) zeigten in diesem Modell, dass das Lipoprotein A (LpA) des outer surface proteins A (OspA) von *B. burgdorferi* (*Bb*) bzw. ein *Bb*-Lysat die Entwicklung eines Th1-Phänotyps induzieren, und dass dieser Effekt nicht über den TCR vermittelt wird.

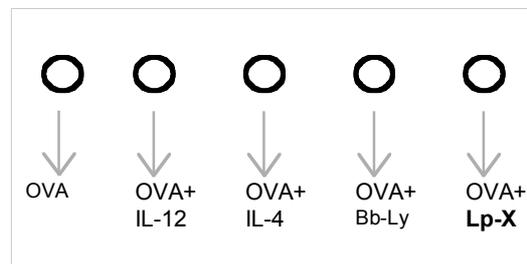
In der vorliegenden Arbeit wurden mononukleäre Splenozyten von  $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen Mäusen (DO11.10) unter Zugabe des spezifischen Antigens Ovalbumin (OVA) wie in 3.1.5 beschrieben kultiviert. Die gleichzeitige Zugabe von verschiedenen Lipopeptiden und die anschließende Analyse der Zytokinproduktion nach intrazellulärer Zytokinfärbung mittels Durchflußzytometrie (FACS, s. 3.2) erlaubte dabei Rückschlüsse auf den Einfluß der Lipopeptide auf die Th-Zelldifferenzierung. Das oben beschriebene *Bb*-Lysat (s. Kapitel 3.4) diente neben IL-12 als Positivkontrolle für die Induktion eines Th1-Phänotyps. Das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 6 dargestellt.



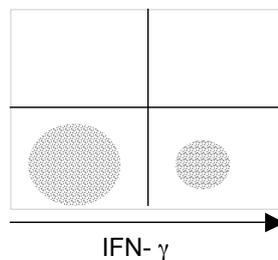
1. Splenektomie bei **DO.11.10- TCR** –  
transgenen Mäusen



2. *in vitro* **Stimulation** der  
mononukleären Zellen mit:



3. nach 7d **intrazelluläre Färbung** & Analyse der  
Zytokinproduktion am **FACS**:



**Abb. 6:** Schematische Darstellung eines Zellkulturrexperimentes zur Untersuchung des Einflusses der Lipopeptide auf die IFN- $\gamma$ -Produktion von Th-Zellen. Mononukleäre Zellen wurden aus Milzen von DO.11.10-TCR-Rezeptor-transgenen Mäusen gewonnen (1.) und *in vitro* mit dem Antigen OVA inkubiert (2.). Zusätzlich wurden die Zellen mit verschiedenen Lipopeptiden (Lp-X) stimuliert. Die Zugabe von Interleukin-12 (IL-12) und *Borrelia*-Lysat (Bb-Ly) diente als Postivkontrolle, die Zugabe von Interleukin-4 (IL-4) als Negativkontrolle zur Induktion eines Th1-Phänotyps. Nachdem die Zellen sieben Tage unter diesen Kulturbedingungen gehalten wurden erfolgte die intrazelluläre Zytokinfärbung und anschließende durchflußzytometrische (FACS) Analyse der Zytokinproduktion der Zellen (3.).

#### **4.1.1 Selektive Vermehrung von CD4<sup>+</sup> Zellen in einer Zellkultur mononukleärer Zellen von DO11.10- Mäusen in Gegenwart von OVA**

Da allein der Einfluß der Lipopeptide auf die Zytokinproduktion der T-Helferzellen untersucht werden sollte, wurde zunächst bestimmt, welchen Anteil Th-Zellen in einer mononukleären Mischkultur aus Milzen von DO.11.10-Mäusen vor und nach Stimulation mit dem spezifischen Antigen OVA einnehmen.

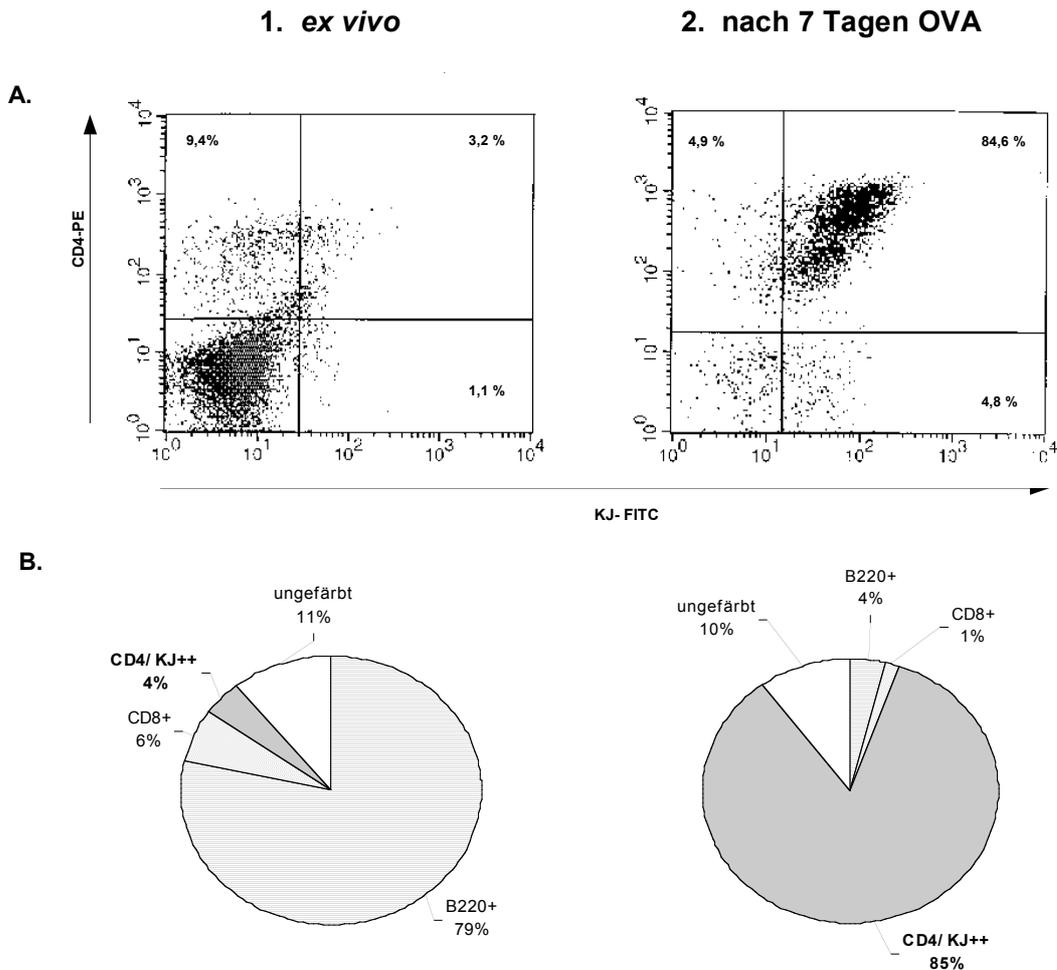
Aus den Milzen von DO.11.10-Mäusen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und einer Gradientenzentrifugation unterzogen. Bei einer Probe der so gewonnenen mononukleären Zellen wurden die Oberflächenantigene verschiedener Zellarten mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern gegen B220 (B-Zellen), CD8 (CTL), CD4 und KJ (transgene Th-Zellen, s.u.) wie in 3.2.3 beschrieben gefärbt und deren Expression durchflußzytometrisch analysiert. Durch Doppelfärbungen mit dem klonotypischen Antikörper KJ1-26.1, der spezifisch für den OVA-TCR ist (Haskins et al. 1983), ließen sich die  $\alpha/\beta$ -TCR-transgene Zellen identifizieren. Dabei zeigte sich, dass transgene Th-Lymphozyten (= CD4/KJ<sup>++</sup>) in einem solchen Zellgemisch nur in einem geringen Prozentsatz von durchschnittlich 4% enthalten sind (s. Abbildung 7.A.1).

Die restlichen mononukleären Zellen wurden anschließend für sieben Tage unter alleiniger Zugabe von OVA kultiviert, dann geerntet und wie oben beschrieben gefärbt. Die anschließende durchflußzytometrische Analyse ergab dabei einen durchschnittlichen Anteil von 85% KJ<sup>+</sup> Th-Zellen (s. Abbildung 7.A.2). Das Experiment wurde insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Somit konnte gezeigt werden, dass es bei der Kultivierung von DO11.10-mononukleären Zellen in Anwesenheit von OVA wie erwartet zu einer selektiven Vermehrung der Th-Zellen kommt, so dass bei Messung der Zytokinexpression nach einer Woche Kultivierung vor allem die der CD4<sup>+</sup> Zellen erfasst wird.

#### **4.1.2 Dosisabhängige Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion durch synthetische Lipopeptide**

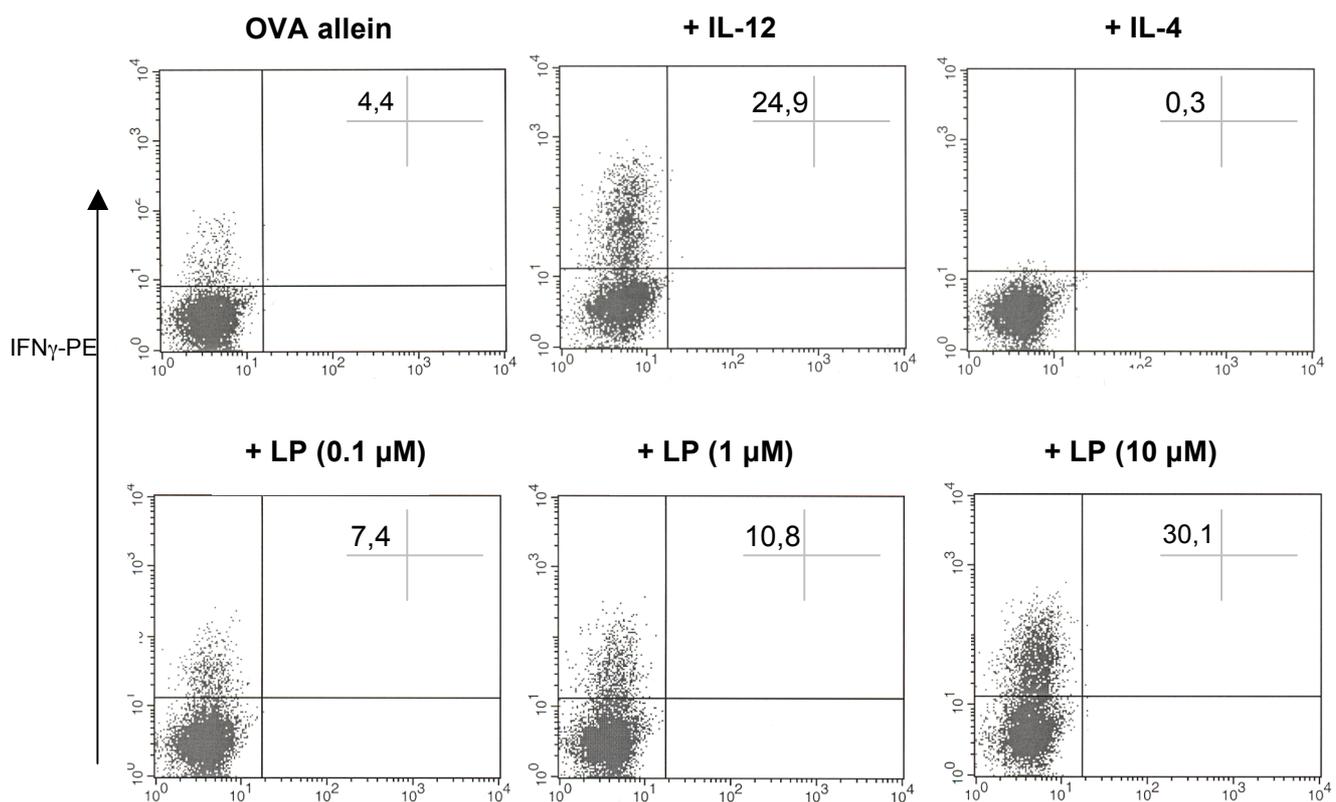
Die Analyse der IFN- $\gamma$ - und IL-4-Produktion von DO11.10-TCR transgenen Maus-Splenozyten erfolgte nach siebentägigem *in vitro*-priming mit OVA sowie OVA und

IL-12, IL-4, *Bb*-Lysat oder OVA mit den synthetischen Lipopeptiden (s. 3.1.5) und nach intrazellulärer Zytokinfärbung (s. 3.2.2) per Durchflußzytometrie (s. Abbildung 6).



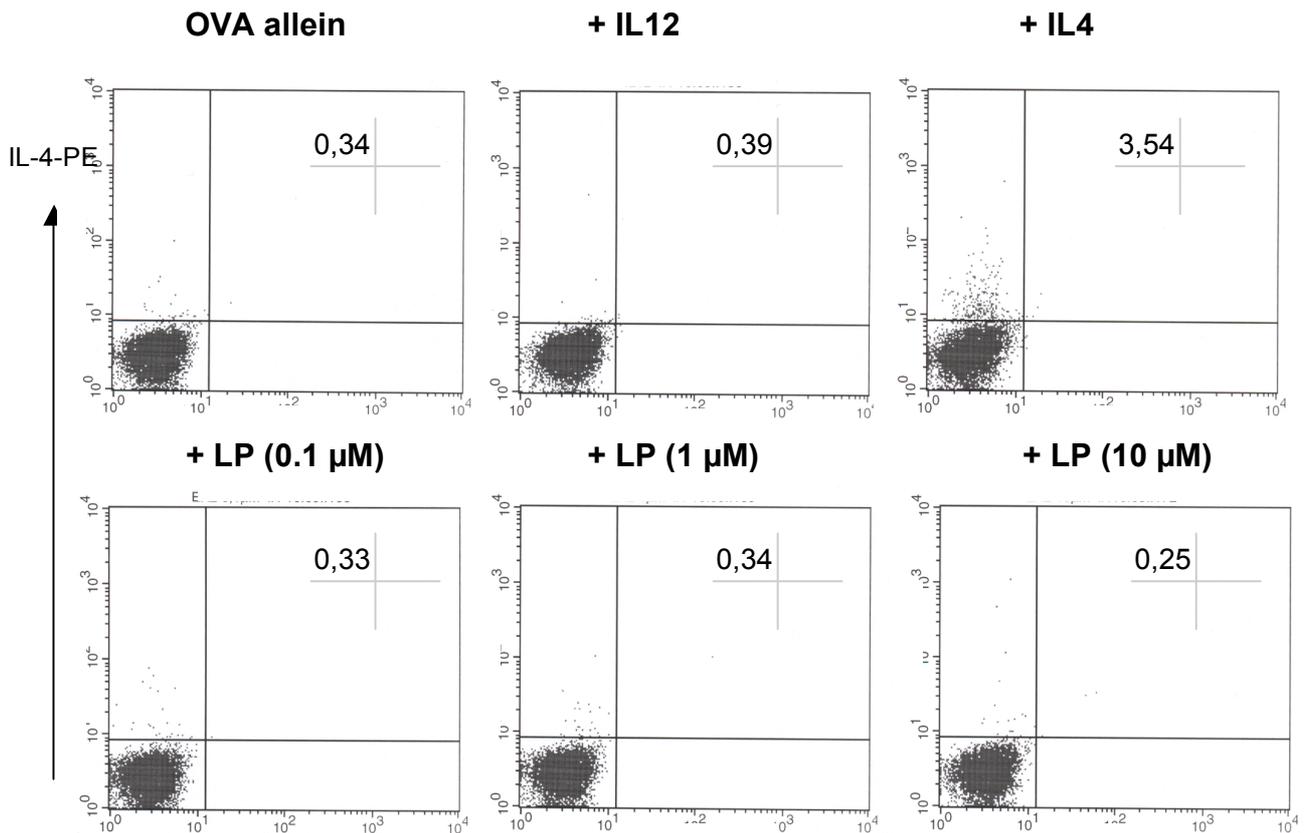
**Abb. 7:A.:** Dot- Blot- Darstellungen einer Doppelfärbung CD4-PE und KJ-FITC. 1. Frisch gewonnene mononukleäre DO.11.10- Splenozyten. 2. 7-tägig mit OVA stimulierte mononukleäre DO.11.10- Splenozyten. **7:B.:** Schematische Darstellung des Anteils von B220<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD4/KJ<sup>++</sup> (=  $\alpha/\beta$ -TCR-transgene CD4<sup>+</sup>-Zellen) Zellen in % der Gesamtzellzahl vor (1.) und nach (2.) 7-tägiger Stimulation mit OVA. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander wiederholten Experimenten.

Die IFN- $\gamma$ - sowie die IL-4-produzierenden Zellfraktionen waren bei alleiniger Stimulation mit OVA gering. Die Zugabe von IL-12 (1 ng/ml) oder *Bb*-Lysat (10  $\mu$ g/ml) erhöhte den Anteil der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen, während die Zugabe von IL-4 (200 U/ml) den Anteil der IL-4-produzierenden Zellen erhöhte. Die Zugabe ansteigender Konzentrationen (0,1/1/10 $\mu$ M) der synthetischen trispalmitoylierten Lipopeptide führte jeweils zu einem zunehmenden Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen in der Kultur, nicht jedoch des Anteils IL-4 produzierender Zellen. Beispielhaft sind in den Abbildungen 8A und 8B FACS-Daten nach Stimulation mit OVA, OVA+IL-12, OVA+IL-4 sowie OVA+ unterschiedlichen Konzentrationen des synthetischen Lipopeptides Pam<sub>3</sub>CysSer(Glu)<sub>4</sub> dargestellt.



**Abb. 8 A:** Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen (in %) an einer Kultur mononukleärer Zellen von DO11.10- Mäusen nach siebentägiger Stimulation mit OVA , OVA und Zytokinen (IL-12, IL-4) oder OVA und unterschiedlichen Konzentrationen von Pam<sub>3</sub>CysSer(Glu)<sub>4</sub> (=LP). Dargestellt ist die durchflußzytometrische Dot-Blot Analyse nach intrazellulärer Färbung mit IFN- $\gamma$ -PE. Zu den verwendeten Konzentrationen von OVA, IL-12 und IL-4 siehe auch Kapitel 3.1.5.2. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für die weiteren Lipopeptide, welche jeweils dreimal wiederholt in gleicher Weise untersucht wurden.

Alle übrigen Lipopeptide wurden in gleicher Weise jeweils mehrfach untersucht. Das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys-OH zeigte auch bei Verwendung höherer Dosen (bis 20µM) keinen Effekt auf die Th-Differenzierung.



**Abb. 8 B:** Anteil IL-4-produzierender Zellen (in %) an einer Kultur mononukleärer Zellen von DO11.10-Mäusen nach siebentägiger Stimulation mit OVA, OVA und Zytokinen (IL-12, IL-4) oder OVA und unterschiedlichen Konzentrationen von Pam<sub>3</sub>CysSer(Glu)<sub>4</sub> (=LP). Dargestellt ist die durchflußzytometrische Dot-Blot Analyse nach intrazellullärer Färbung mit IL-4-PE. Zu den verwendeten Konzentrationen von OVA, IL-12 und IL-4 siehe auch Kapitel 3.1.5.2. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für die weiteren Lipopeptide, welche in gleicher Weise untersucht wurden.

### 4.1.3 Vergleich der Induktion einer IFN- $\gamma$ -Produktion durch verschiedene Lipopeptide

Die Induktion einer IFN- $\gamma$ -Produktion durch strukturell unterschiedliche Lipopeptide wurde in dieser Arbeit qualitativ untersucht und quantitativ verglichen. Es wurden dazu 1.) vier trispalmitoylierte Lipopeptide (Pam<sub>3</sub>Cys-X), die sich bzgl. ihrer Aminosäuresequenz (X) unterscheiden, 2.) ein dipal mitoyliertes Lipopeptid (Pam<sub>2</sub>Cys-X) und 3.) eine trispalmitoylierte Lipoaminosäure (Pam<sub>3</sub>Cys-OH), welche keine weitere Aminosäure-Substitution aufweist, mehrfach zusammen im selben experimentellen Ansatz untersucht.

Bei den einzelnen Experimenten fanden sich teilweise deutliche Unterschiede der IFN- $\gamma$ -Produktion der Kontrollen, d.h. der allein mit OVA stimulierten Zellen. In deutlicher Relation dazu fand sich jeweils auch eine unterschiedliche absolute IFN- $\gamma$ -Produktion bei den mit den Lipopeptiden stimulierten Zellen. D.h. die Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten waren auf eine schwankende background- oder basale Produktion von IFN- $\gamma$  zurückzuführen. Aus Gründen der statistischen Vergleichbarkeit war deshalb eine background-Standardisierung notwendig. Es wurde in jedem Einzelnen der Experimente der prozentuale Wert der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen, die nur mit OVA stimuliert wurden (entsprechend dem background), von dem entsprechenden Wert der zusätzlich mit IL-12, IL-4, Bb oder den Lipopeptiden stimulierten Kulturen subtrahiert. In Abbildung 9 sind die Mittelwerte der so berechneten quantitativen Unterschiede des Anteils der prozentualen IFN- $\gamma$ -Produktion zu alleine mit OVA stimulierten Zellen aus drei unabhängig von einander wiederholten experimentellen Ansätzen dargestellt.

Es wurde eine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen durch Stimulation mit Lipopeptiden im Vergleich zu allein mit OVA stimulierten Zellen erwartet. Die in Abbildung 9 dargestellten Daten wurden statistisch mittels einer ein-faktoriellen Varianzanalyse (*engl.* oneway between subjects ANOVA) untersucht. Zur Analyse der Unterschiede des IFN- $\gamma$ -induzierenden Effektes zwischen den einzelnen Lipopeptiden wurde anschließend der Bonferroni-post-hoc-Test verwendet. Alle statistischen Verfahren wurden unter Zuhilfenahme des Statistik-Programmes SPSS 15.0 durchgeführt.

4.1.3.1 Die sich bezüglich ihrer Aminosäuresequenz unterscheidenden synthetischen trispalmitoylierten Lipopeptide induzierten gleichermaßen die Produktion von IFN- $\gamma$

Die Lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys-SEEEE (Lp1), Pam<sub>3</sub>Cys-SSN (Lp2), Pam<sub>3</sub>Cys-LGGGSKPK-NH<sub>2</sub> (Lp3) und Pam<sub>3</sub>Cys-SSCDGPSNTPPEIHPVV (Lp4) (s. 2.3.1) unterscheiden sich lediglich hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, gemeinsam ist ihnen jedoch die Struktur des Trispalmitol-S-Glycerylcysteins. Um die Wirkung dieser Lipopeptide quantitativ vergleichen zu können, wurden sie zusammen im selben experimentellen Ansatz untersucht. Diese Ansätze wurden insgesamt dreimal wiederholt. Dabei zeigte sich, dass diese vier Lipopeptide sieben Tage nach Zugabe zu den Zellen, eine gegenüber einer allein mit OVA stimulierten Kultur signifikant höhere Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen induziert hatten ( $F_{(9,20)} = 22,25$ ,  $p < 0.000$ ; s. Abbildung 9). Untereinander bestanden dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lipopeptiden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aminosäuresequenz der Lipopeptide für den Th1-induzierenden Effekt von untergeordneter Bedeutung ist.

4.1.3.2 Das dipalmitoylierte Lipopeptid Pam<sub>2</sub>Cys-SSNA induzierte keine signifikante IFN- $\gamma$ -Produktion

Um die für den Th1-induzierenden Effekt entscheidende Lipopeptidstruktur genauer charakterisieren zu können, wurde zusätzlich untersucht, ob ein dipalmitoyliertes Lipopeptid -Pam<sub>2</sub>Cys-SSNA- einen vergleichbaren Effekt auf die Th-Zelldifferenzierung hat. Bei diesem Lipopeptid fehlt die amidisch gebundene Fettsäure während die beiden estergebundenen Fettsäuren vorhanden sind (s. 2.3.1). Als Bestandteil humanpathogener Bakterien wurden dipalmitoylierte Lipopeptide bisher bei *Mycoplasmen* nachgewiesen (Mühlradt et al. 1997 und 1998, Matsumoto et al. 1998).

Pam<sub>2</sub>Cys-SSN induzierte keine signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Produktion gegenüber allein mit OVA stimulierten Zellen und eine signifikant geringere Produktion als bei Stimulation mit den Lipopeptiden Pam<sub>3</sub>Cys-SEEE ( $p < 0.001$ ), Pam<sub>3</sub>Cys-SSN ( $p = 0.047$ ) und Pam<sub>3</sub>Cys-SSCDGPSNTPPEIHPVV ( $p = 0.002$ ), nicht jedoch gegenüber Pam<sub>3</sub>Cys-LGGGSKPK-NH<sub>2</sub> ( $p = 0,495$ ) (s. Abbildung 9).

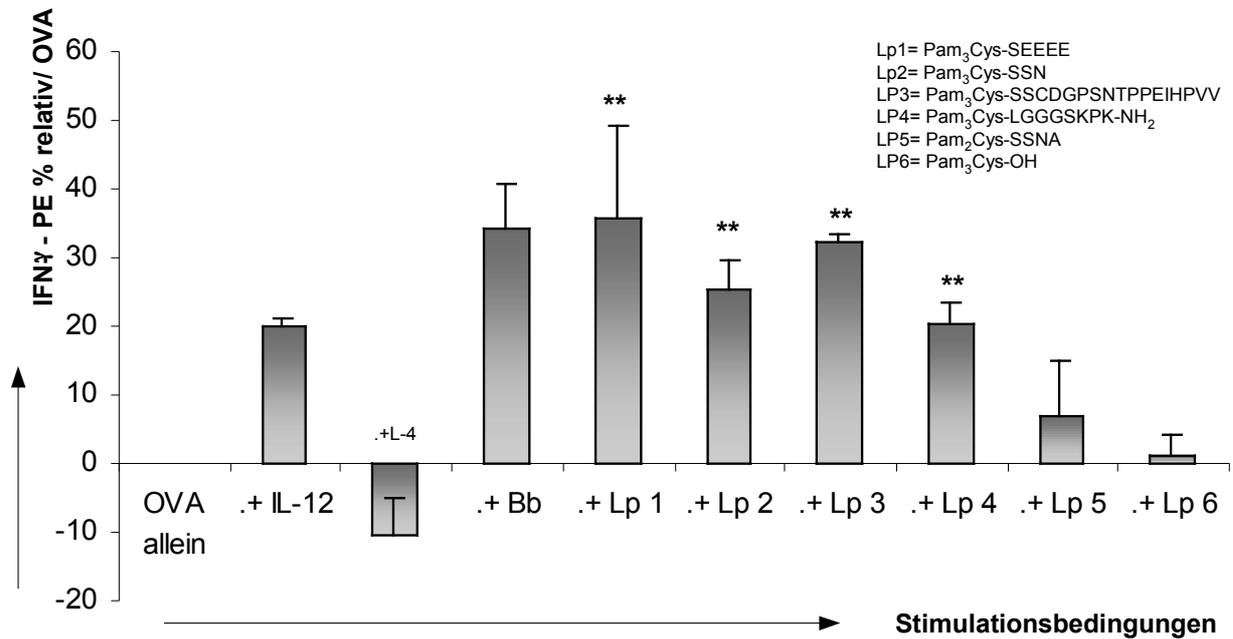
#### 4.1.3.3 Pam<sub>3</sub>Cys-OH induzierte keine IFN- $\gamma$ -Produktion

Auch der Lipid-Cystein-Anteil (Pam<sub>3</sub>Cys-OH; Lp6) der trispalmitoylierten Lipopeptide wurde untersucht. Dazu wurde Pam<sub>3</sub>Cys-OH mehrfach im gleichen Kulturansatz mit den anderen synthetischen Lipopeptiden getestet.

Im Gegensatz zur Stimulation mit IL-12, *Bb*-Lysat, Pam<sub>3</sub>Cys-SEEEE, Pam<sub>3</sub>Cys-SSN, Pam<sub>3</sub>Cys-LGGGSKPK-NH<sub>2</sub> und Pam<sub>3</sub>Cys-SSCDGPSNTPPEIHPVV fand sich bei Zellen, die mit Pam<sub>3</sub>Cys-OH stimuliert wurden kein erhöhter Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen im Vergleich zu allein mit OVA stimulierten Zellen.

#### 4.1.4 CD8<sup>+</sup> T-Zellen hatten keinen wesentlichen Anteil an der gemessenen IFN- $\gamma$ -Produktion

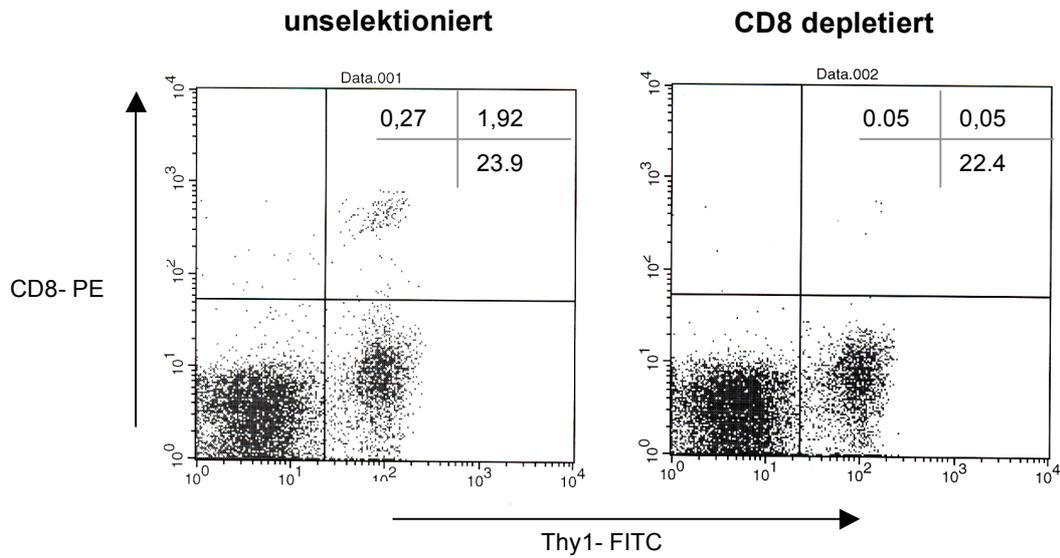
Da auch CD8<sup>+</sup> T- Zellen IFN- $\gamma$  bilden können (Lertmemongkolchai et al. 2001), wurde untersucht, ob diese an der durch die Lipopeptide induzierten IFN $\gamma$ -Produktion beteiligt sind (zur Methodik siehe Kapitel 3.1.5.7). Dazu wurden die CD8<sup>+</sup> Splenozyten von DO.11.10- Mäusen zunächst nach Färbung mit einem microbead-gekoppelten-Antikörper (Miltenyi Biotech) mittels MACS depletiert. Die Reinheit der Depletion wurde durchflußzytometrisch kontrolliert. Es wurde eine Doppelfärbung mit Thy1(CD90)-FITC und CD8-PE durchgeführt. In den dreifach wiederholt durchgeführten experimentellen Ansätzen betrug der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der Depletion durchschnittlich < 0,1 % (Abbildung 10).



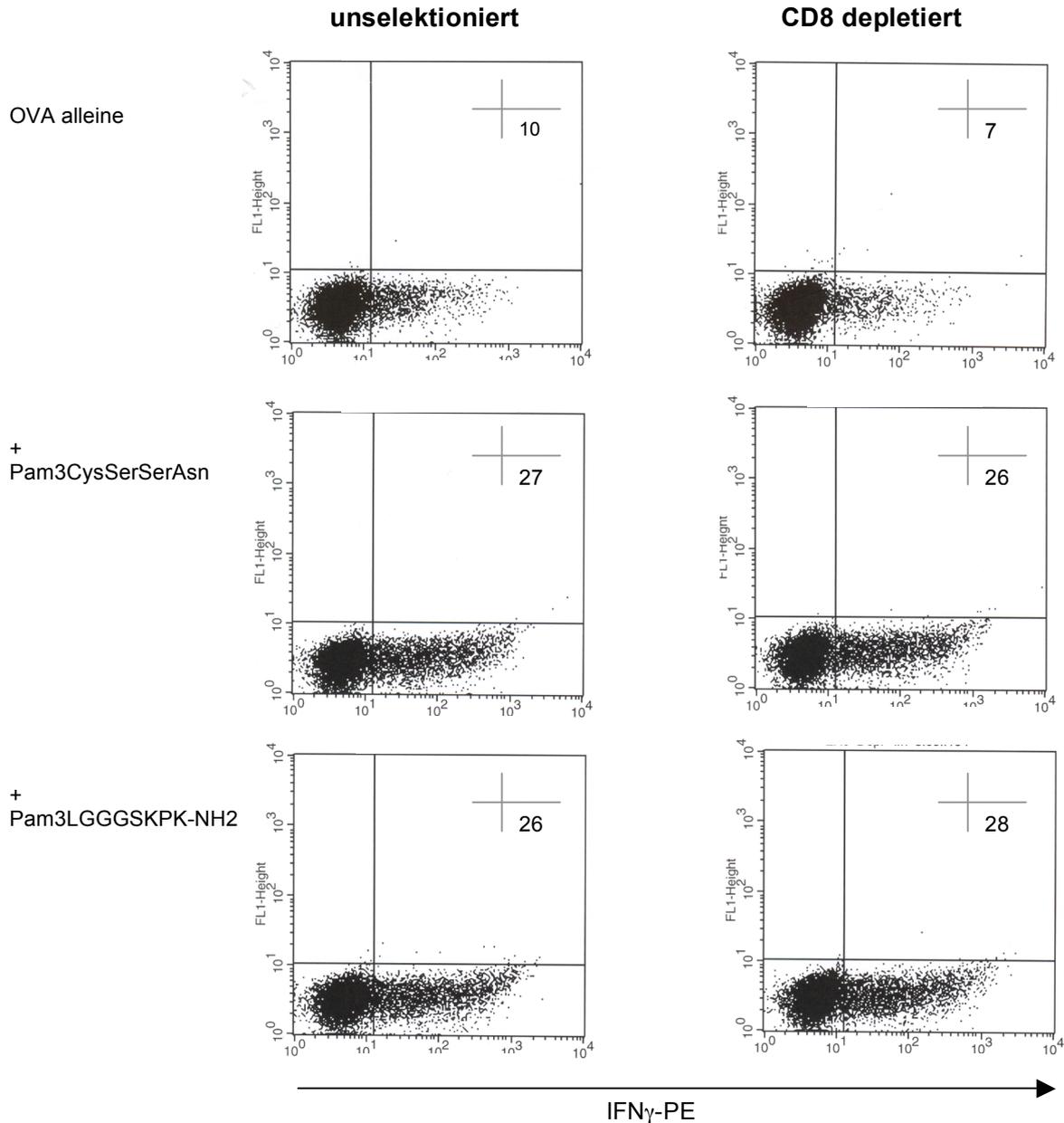
**Abb.9:** Quantitative Unterschiede des Anteils IFN- $\gamma$  produzierender Zellen nach siebentägiger Stimulation von DO.11.10 transgenen Maussplenozyten mit OVA und IL-12, IL-4, *Bb*-Lysat sowie verschiedenen Lipopeptiden (Lp1-6) im Vergleich zu allein mit OVA stimulierten Zellen (OVA allein). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen, *background*-standardisierten (s. S. 4.1.3) Experimenten mit Angabe der Standardabweichungen. Es fand sich ein signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion bei den zusätzlich mit IL-12 (\*  $p < 0.05$ ), *Bb*-Lysat und LP1-4 stimulierten Zellen (\*\*  $P < 0.001$ ). Kein signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion war bei Stimulation mit LP5 und 6 zu finden.

Die CD8-depletierten Zellen wurden anschließend wie bereits beschrieben unter Zugabe von OVA und den Lipopeptiden Pam<sub>3</sub>CysSerSerAsn bzw. Pam<sub>3</sub>Cys-LGGGSKPK-NH<sub>2</sub> für 7d kultiviert. Als Kontrolle dienten unter alleiniger Zugabe von OVA kultivierte Zellen. Zusätzlich wurden nicht CD8-depletierte Splenozyten unter den gleichen Bedingungen stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und eine intrazelluläre Zytokinfärbung mit IFN- $\gamma$ -PE wurde durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch (s. Abbildung 11). Bei den dreimal wiederholt durchgeführten Experimenten zeigten sich jeweils keine relevanten Unterschiede im Anteil der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen zwischen den CD8-depletierten und den

unselektionierten Kulturen. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren somit nicht wesentlich an der durch die Lipopeptide induzierten IFN- $\gamma$ -Produktion beteiligt.



**Abb. 10:** Anteil von CD8 positiven T-Zellen (CD8-PE-Thy1-FITC<sup>++</sup>, rechter oberer Quadrant) an Splenozyten von DO.11.10- Mäusen vor (links) und nach CD8- Depletion (rechts) mittels MACS. Angegeben sind die quadrant statistics in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.



**Abb 11:** Anteil IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen in Prozent einer Splenozytenmischkultur von DO11.10-Mäusen (links, unselektioniert) und einer CD8-T-Zell-depletierten Splenozytenmischkultur von DO11.10- Mäusen (rechts, CD8-selektioniert) nach 7d Stimulation mit OVA und Pam<sub>3</sub>CysSerSerAsn (Mitte) bzw. Pam<sub>3</sub>CysLGGGSKPK-NH<sub>2</sub> (unten) und intrazellulärer Färbung mit IFN- $\gamma$ -PE. Zur Kontrolle wurden jeweils allein mit OVA stimulierte Zellen analysiert (oben). Angegeben sind jeweils die Quadrantenstatistiken für den die rechten unteren Quadranten in Prozent. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

## 4.2 Einfluss synthetischer Lipopeptide auf die Proliferation von Th-Zellen

In diversen Arbeiten wurde gezeigt, dass synthetische Lipopeptide starke B-Zellmitogene sind (Melchers et al. 1975, Bessler et al. 1977, Wiesmüller et al. 1983, Johnson et al. 1983, Bessler et al. 1985). Weiterhin wurde in jüngerer Zeit nachgewiesen, dass Lipopeptide dendritische Zellen (Hertz et al. 2001, Weigt et al. 2003) und Makrophagen (Brightbill et al. 1999, Aliprantis et al. 1999) über TLR-2 aktivieren. Zu der direkten Wirkung der Lipopeptide auf T-Zellen wurden dagegen eher wenige und teilweise widersprüchliche Daten veröffentlicht. Bei diesen Arbeiten wurde die Reaktion von Thymozyten auf die direkte Stimulation mit Lipopeptiden untersucht und während manche Autoren eine Proliferation der Zellen beobachteten (Bessler et al. 1977) konnten andere Autoren diese nicht (Melchers et al. 1975) oder erst ab sehr hohen Lipopeptiddosen nachweisen (Resch und Bessler 1981).

Einigkeit besteht jedoch darüber, dass Lipopeptide wesentlich stärkere B-Zellmitogene als –wenn überhaupt– T-Zellmitogene sind. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Lipopeptide in der von uns verwendeten Konzentration von 10µM einen direkten proliferativen Effekt auf Th-Zellen ausüben und gegebenenfalls, ob dieser eine Bedeutung in Bezug auf die Th1-induzierende Wirkung der Lipopeptide hat.

Um eine mögliche Kontamination mit B-Lymphozyten zu vermeiden, wurde die Wirkung von trispamitoylierten Lipopeptiden auf Th-Zellen unter Verwendung von Splenozyten zweier Mausstämme untersucht. Neben BALB/c-Mäusen wurden J<sub>H</sub>T-Mäuse verwendet, welche durch eine Deletion im IgH-Locus keine reifen peripheren B-Zellen aufweisen (Gu et al. 1991 und 1993). Die isolierten Splenozyten dieser Tiere wurden magnetisch (mittels MACS) CD4<sup>+</sup> selektioniert. Nach der durchflußzytometrischen Kontrolle der Anreicherung wurden die Zellen 48h mit den Lipopeptiden inkubiert und die Proliferation anhand der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation bestimmt. Das experimentelle Vorgehen wird in Kapitel 3.1.6 genauer beschrieben.

#### **4.2.1. Mittels MACS war eine Selektion von CD4<sup>+</sup> Zellen aus den Milzen von BALB/c- und von J<sub>H</sub>T- Mäusen zu über 95% möglich**

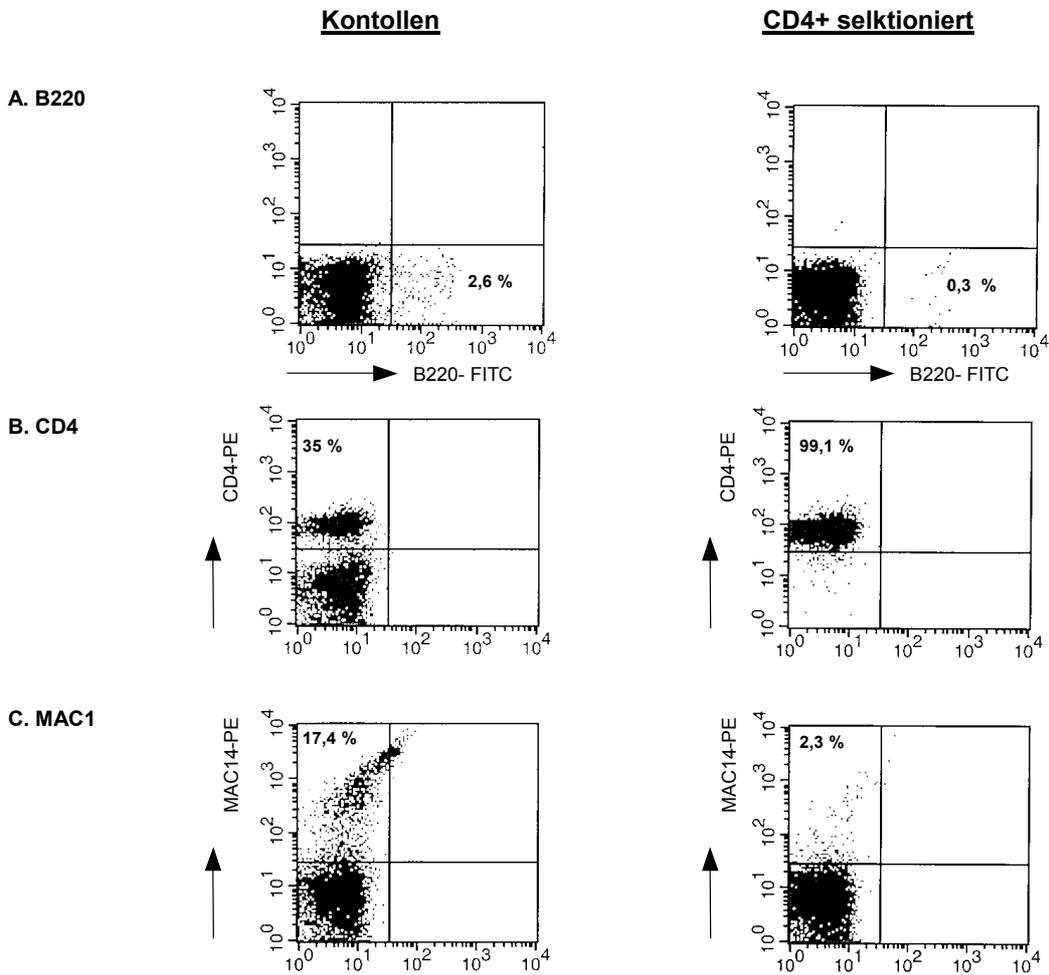
Mit Hilfe eines magnetischen Sortierungsverfahrens (MACS) erfolgte wie in 3.1.6.2 beschrieben die positive Selektion von CD4<sup>+</sup>-Splenozyten von BALB/c und J<sub>H</sub>T-Mäusen.

Um den Erfolg der magnetischen Selektion zu kontrollieren, wurden anschließend jeweils eine Probe der Zellen mit CD4-PE, B220-FITC und MAC1-PE wie in beschrieben angefärbt (s. 3.1.6.3) und die Expression dieser Oberflächenmoleküle durchflußzytometrisch analysiert. Dabei ergab sich nach der Selektion der BALB/c-Splenozyten in drei wiederholten Ansätzen für die CD4<sup>+</sup> Zellen ein Anteil von über 95 %, während der Anteil der B220<sup>+</sup> Zellen nicht über 1,8 % betrug.

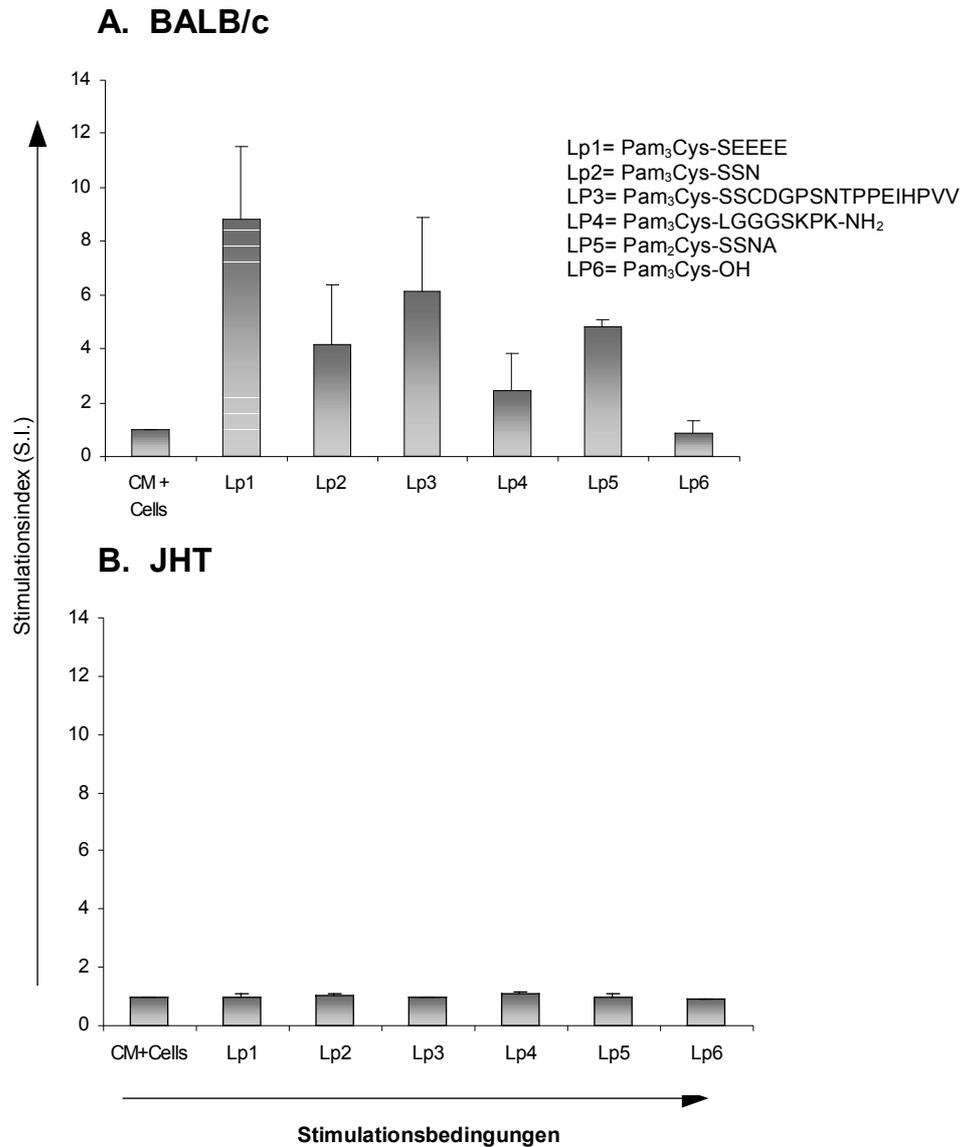
Bei der Selektion der J<sub>H</sub>T-Zellen wurde dagegen noch ein höherer Anteil von CD4<sup>+</sup> Zellen erreicht (durchschnittlich > 98%). B220<sup>+</sup> Zellen fanden sich bereits in den unselektionierten Zellen dieser Mäuse nur zu einem Anteil von maximal 3% und nach der Selektion zu unter 1% (s. Abbildung 12).

#### **4.2.2 Synthetische Lipopeptide hatten eine proliferative Wirkung auf CD4<sup>+</sup>-selektierte Zellen von BALB/c jedoch keine proliferative Wirkung auf CD4<sup>+</sup>-selektierte J<sub>H</sub>T- Zellen**

Die selektierten Zellen wurden unter Zugabe verschiedener Konzentrationen (1µM und 10µM) der synthetischen Lipopeptide für 48h bei 37°C inkubiert (s. 3.1.6.4). Anschließend wurde jeweils 1mCurie <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben und für weitere 18h kultiviert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines β- Szintillationszählers (s. 3.3.1). Während alle Lipopeptide bis auf Pam<sub>3</sub>Cys-OH eine signifikante Proliferation der BALB/c-Zellen induzierten (Abbildung 13A) blieb dieser Effekt unabhängig von der eingesetzten Konzentration bei den J<sub>H</sub>T-Zellen aus (Abbildung 13B).

**JHT**

**Abb.12:** Dot-Blot Darstellungen von Färbungen von  $J_{HT}$ - Maus- Splenozyten mit **A.:** B220- FITC **B.:** CD4- PE. **C:** MAC1-PE. Links sind jeweils die nicht-selektionierten Kontrollen, rechts die mittels MACS  $CD4^+$  selektionierten Zellen, welche für die nachfolgenden Proliferationsassays verwendet wurden, dargestellt. Jeweils angegeben ist der Anteil der  $B220^+$  bzw.  $CD4^+$  Zellen bzw.  $MAC1^+$  in % der gesamten analysierten Zellen. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.



**Abb. 13:** Einfluß der Lipopeptide auf die Proliferation von Maussplenozyten. Gemessen wurde die <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation in magnetisch CD4<sup>+</sup>-selektierten Zellen zweier verschiedener Mausstämme (BALB/c und J<sub>H</sub>T) nach 48h Inkubation mit je 10µM der Lipopeptide (Lp1-6). Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Zellen in Medium ohne Lipopeptidzugabe (CM +Cells). Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulationsindices (=Lipopeptidprobe/Kontrolle) aus drei unabhängigen Wiederholungen des Experimentes. Während die Lipopeptide 1-5 bei Verwendung von Zellen von BALB/c –Mäusen (**A.**) eine Proliferation induzierten, bleibt diese bei Verwendung von Zellen von J<sub>H</sub>T-Mäusen aus (**B.**) Pam3Cys-OH (Lp6) induzierte unter beiden Bedingungen keine Proliferation.

### **4.3 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Expression kostimulatorischer Moleküle**

Um den Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Kostimulation zu untersuchen, wurden Splenozyten von BALB/c- Mäusen für drei Tage unter Zusatz von Pam<sub>3</sub>CysSerSerAsn bzw. Pam<sub>3</sub>Cys-OH kultiviert. Zum Vergleich diente ein Ansatz ohne Lipopeptidzugabe. Die Expression kostimulatorischer Moleküle wurde nach 0, 24 und 48h nach Färbung mit Antikörpern für die kostimulatorischen Moleküle CD28, CD80, CD 86, CD40, CD40L analysiert. Um die Art der jeweils exprimierenden Zellen differenzieren zu können, wurden Doppelfärbungen mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 (Th-Zellen), B220 (B-Zellen), CD11b (Makrophagen) und CD11c (dendritische Zellen) durchgeführt, anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Nach Identifikation der entsprechenden Zellpopulation in im Dot-blot Diagramm wurde diese einer Einzelfluoreszenzanalyse (Histogramm) bezüglich der entsprechenden Kostimulationsmarker unterzogen. Die dynamische Expression wurde anhand der Veränderung der mittleren Fluoreszenzaktivität gemessen (*engl.* mean fluorescence intensity, mfi). Das experimentelle Vorgehen ist in Kapitel 3.2.4 ausführlicher dargestellt.

#### **4.3.1 Pam<sub>3</sub>Cys-SSN, jedoch nicht Pam<sub>3</sub>Cys-OH, verstärkte die Expression kostimulatorischer Moleküle des CD28/B7-Systems**

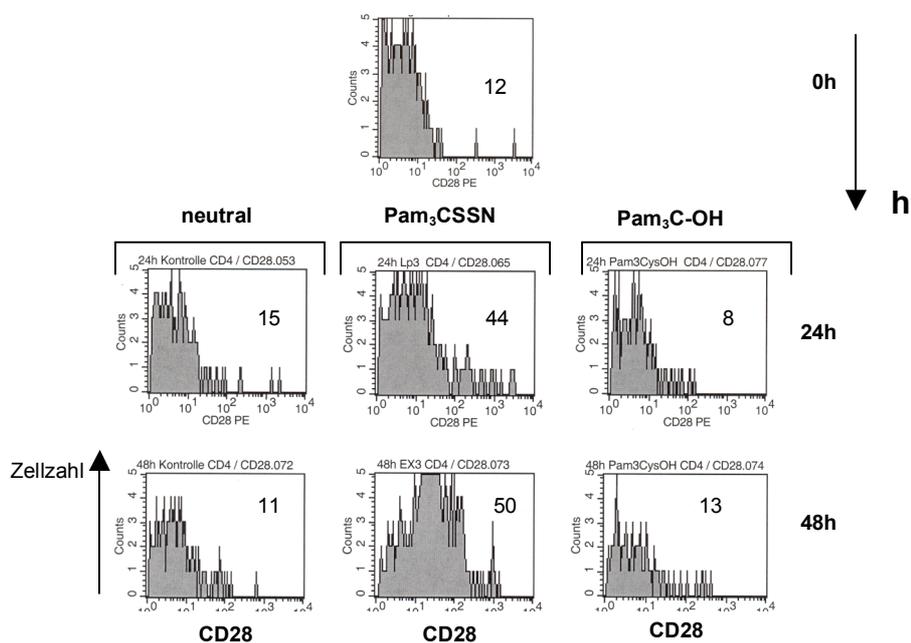
Pam<sub>3</sub>Cys-SSN verstärkte die Expression von CD28 auf Th-Zellen (Abbildung 15). Der Effekt zeigte ein Maximum nach 48h.

Pam<sub>3</sub>Cys-SSN verstärkte zudem mässig die Expression von CD80 auf B220-positiven Zellen (Abbildung 16). Die Expression von CD80 auf Makrophagen und dendritischen Zellen (nicht dargestellt) wurde dagegen nicht eindeutig beeinflusst, hier fanden sich keine reproduzierbaren Ergebnisse.

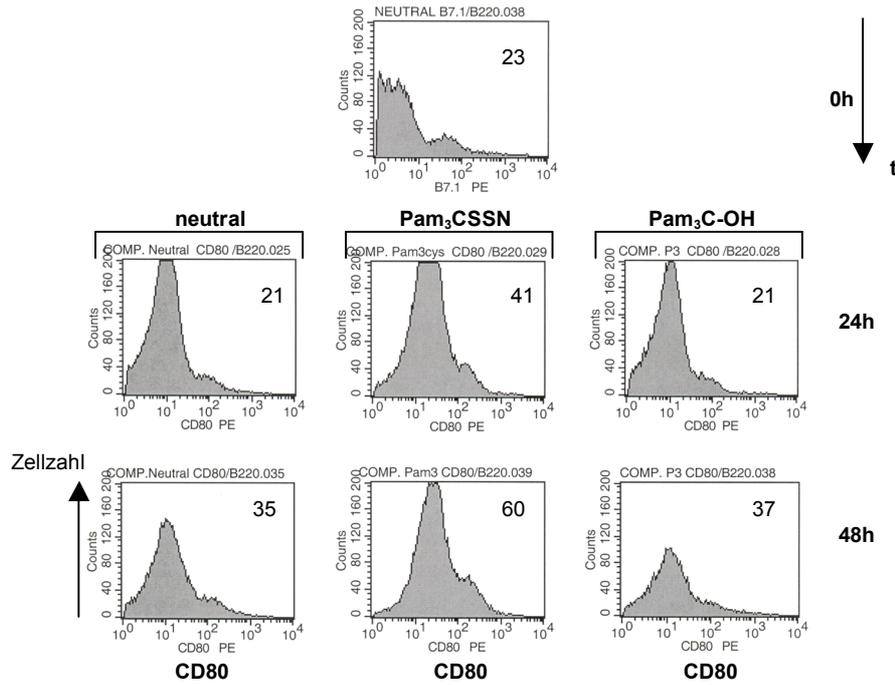
Die Expression von CD86 wurde dagegen auf B220-positiven Zellen (Abbildung 17A) Makrophagen (Abbildung 17B) und dendritischen Zellen (Abbildung 17C) unter Einfluß von Pam<sub>3</sub>Cys-SSN gesteigert. Die in Abbildung 17 A-C gezeigten Daten stammen

aus ein und demselben experimentellen Ansatz und sind repräsentativ für drei separat durchgeführte Experimente.

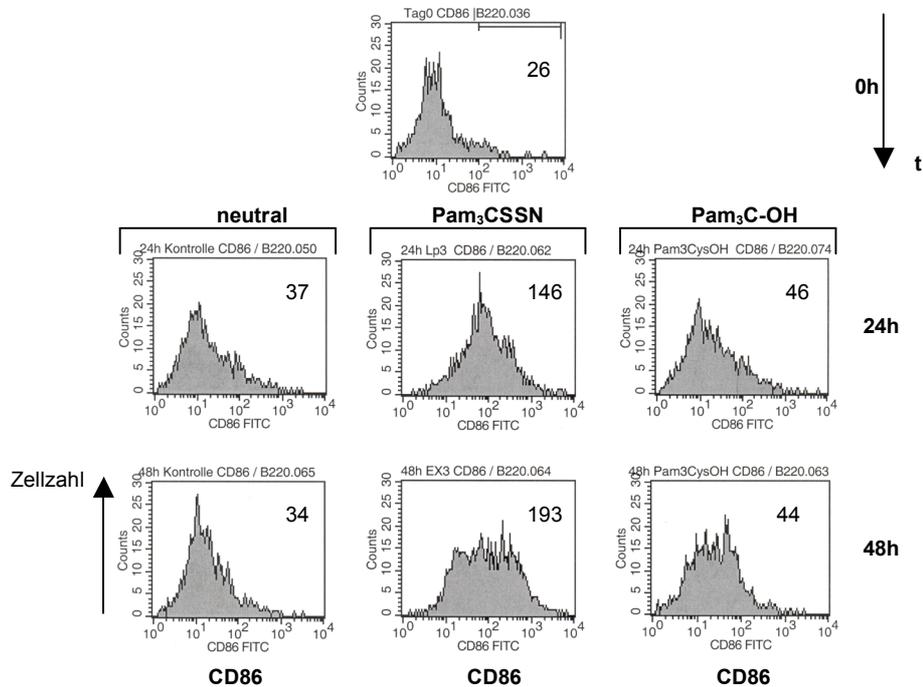
Pam<sub>3</sub>Cys-OH zeigte auf die Expression der oben genannten Moleküle keinen Effekt, der über eine background-Stimulation (gemessen an der Expression in einem unstimulierten Kontrollansatz) hinausging. Besonders ausgeprägt war eine solche background-Stimulation für die CD86-Expression auf DC (Abb. 17c) zu beobachten.



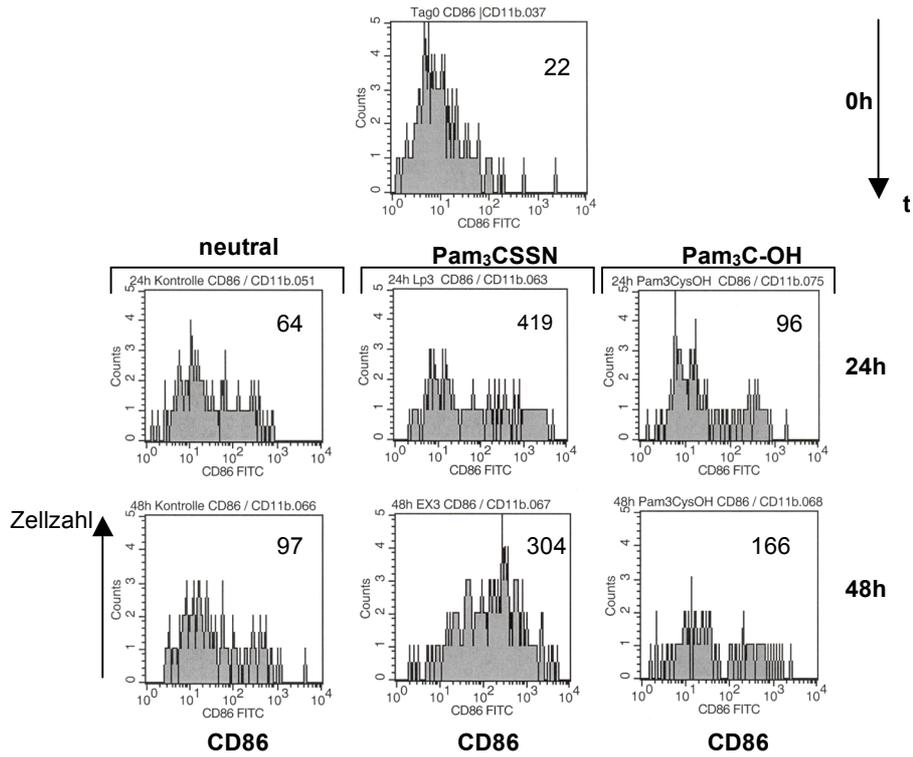
**Abb.15:** CD28- Expression auf Th-Zellen (CD4<sup>+</sup>) 0 (oben), 24 (Mitte) und 48 h (unten) nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>Cys-OH (rechts), Pam<sub>3</sub>Cys-SSN (mittlere Spalte). Die linke Spalte (neutral) entspricht einem parallelen Ansatz ohne Stimulation. Angegeben ist jeweils die gemessene mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit anti-CD28- FITC. Die Daten sind repräsentativ für mehrfach unabhängig wiederholte Experimente.



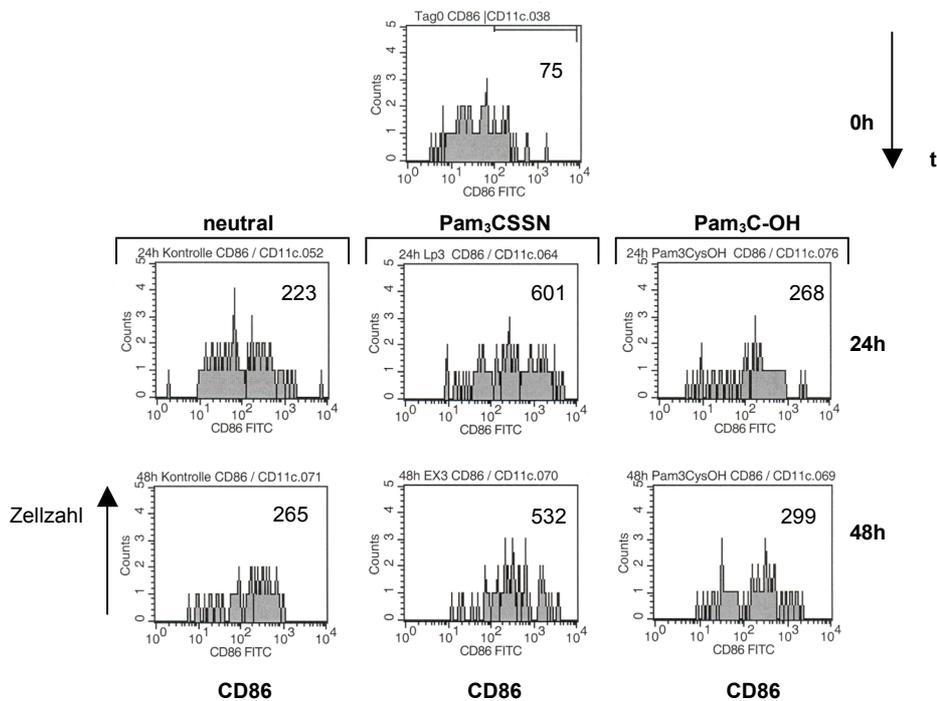
**Abb.16:** CD80- Expression auf B-Zellen (B220<sup>+</sup>) 0 (oben), 24 (Mitte) und 48 h (unten) nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>Cys-OH (rechts), Pam<sub>3</sub>Cys-SSN (mittlere Spalte). Die linke Spalte (neutral) entspricht einem parallelen Ansatz ohne Stimulation. Angegeben ist jeweils die gemessene mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit anti-CD80-PE. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig wiederholte Experimente.



**Abb.17 A:** CD86- Expression auf B-Zellen (B220<sup>+</sup>) 0 (oben), 24 (mittlere Reihe) und 48 h (untere Reihe) nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub> Cys-OH (rechte Spalte) Pam<sub>3</sub>Cys-SSN (mittlere Spalte) oder ohne Stimulation (neutral, linke Spalte) . Angegeben ist jeweils die gemessene mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit anti-CD80-PE. Die hier und in Abb. 17 B und C dargestellten Daten sind jeweils repräsentativ für drei unabhängig wiederholte Experimente.



**Abb.17 B:** CD86- Expression auf Makrophagen ( $CD11b^+$ ) 0, 24 und 48 h nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub> Cys-OH, Pam<sub>3</sub>Cys-SSN oder ohne Stimulation (neutral). Angegeben ist jeweils die mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit anti-CD86-PE.



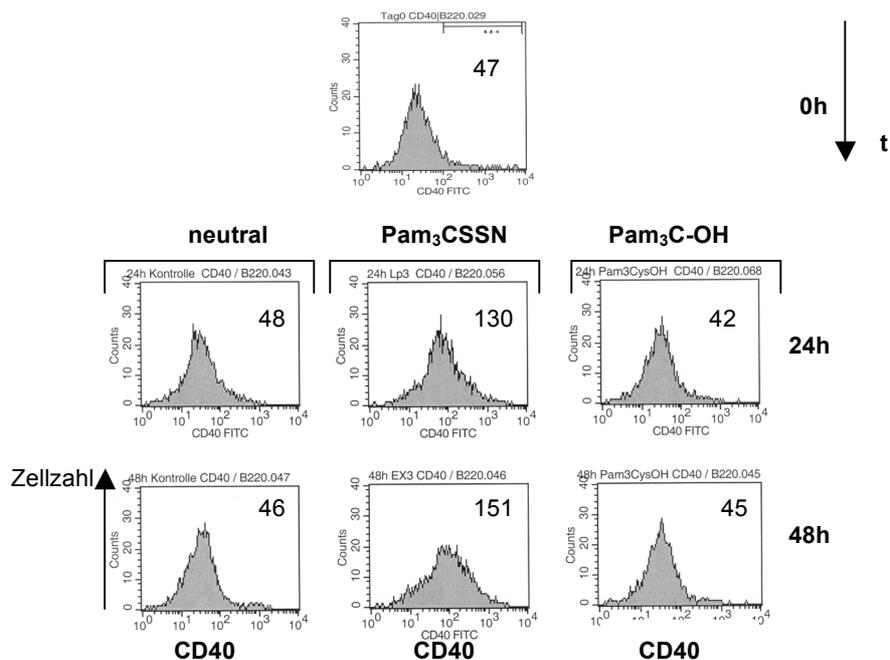
**Abb.17 C:** CD86- Expression auf dendritischen Zellen ( $CD11c^+$ ) 0, 24 und 48 h nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub> Cys-OH, Pam<sub>3</sub>Cys-SSN oder ohne Stimulation (neutral). Angegeben ist jeweils die gemessene mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit anti-CD86-PE.

#### 4.3.2 Pam<sub>3</sub>Cys-SSN, jedoch nicht Pam<sub>3</sub>Cys-OH, verstärkte die Expression kostimulatorischer Moleküle des CD40/CD40L-Systems

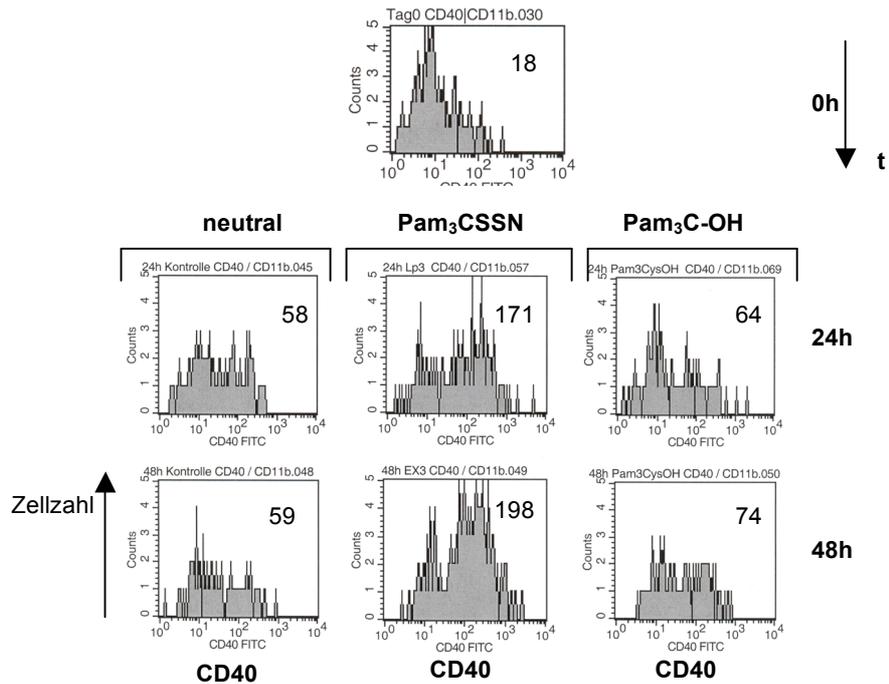
Das Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys-SSN, jedoch nicht Pam<sub>3</sub>Cys-OH, verstärkte die Expression von CD40 auf B220-positiven Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (Abbildung 18 A-C).

Pam<sub>3</sub>Cys-SSN, jedoch nicht Pam<sub>3</sub>Cys-OH, verstärkt die Expression von CD40-Ligand (CD40L) auf Th- Zellen (Abbildung 19) in geringem Ausmass.

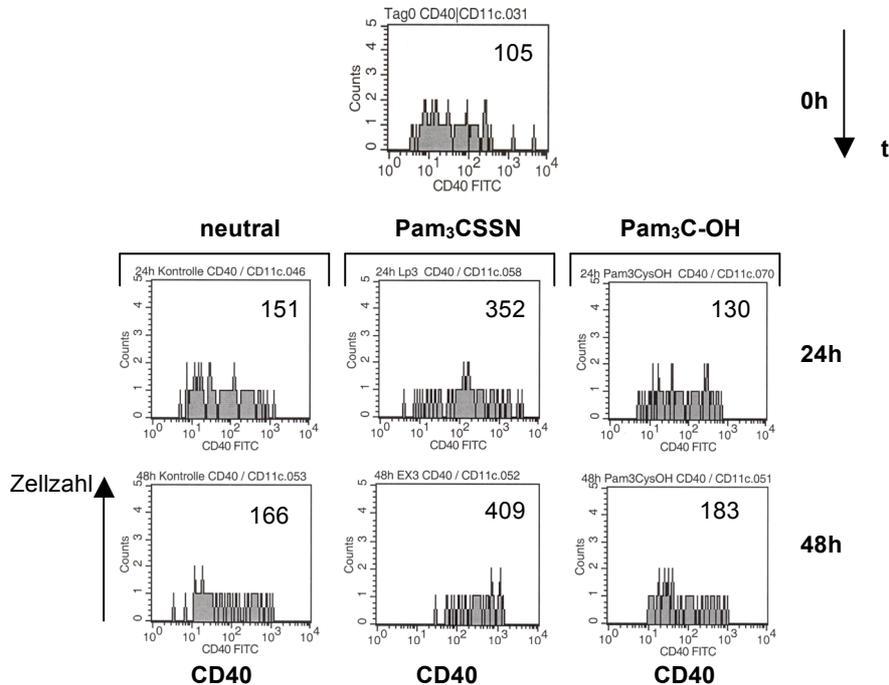
Die in den Abbildungen 18 A-C und 19 gezeigten Daten stammen aus ein und demselben experimentellen Ansatz und sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.



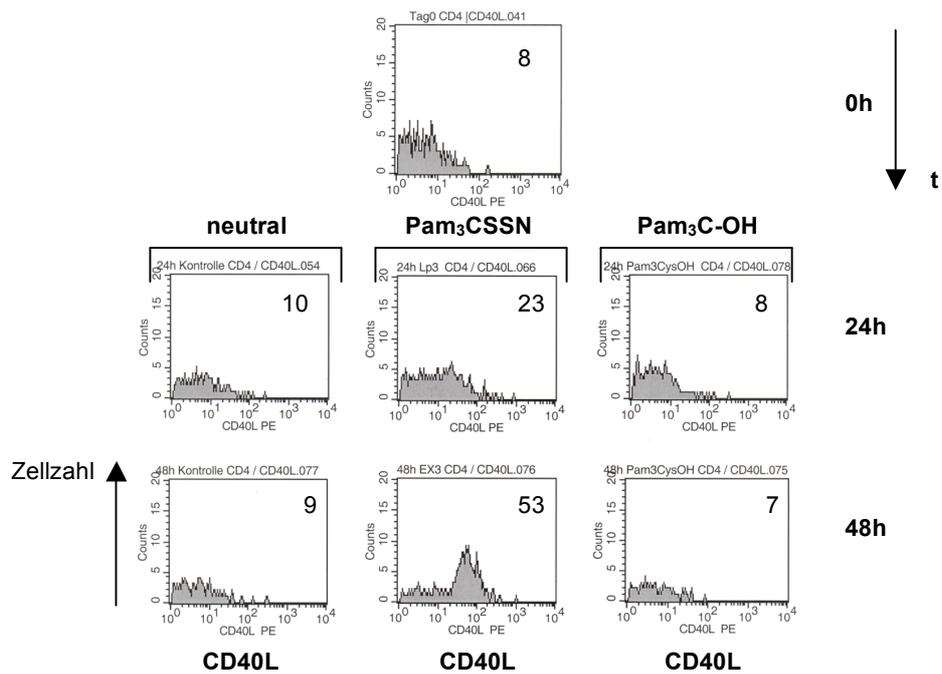
**Abb.18 A:** CD40- Expression auf B-Zellen (B220<sup>+</sup>) Zellen 0, 24 und 48 h nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>Cys-OH, Pam<sub>3</sub>Cys-SSN oder ohne Stimulation. Angegeben ist jeweils die mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit αCD40-FITC. Die hier und in Abb. 18 B und C dargestellten Daten sind jeweils repräsentativ für drei unabhängig wiederholte Experimente.



**Abb.18 B:** CD40- Expression auf Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>) Zellen 0, 24 und 48 h nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub> Cys-OH, Pam<sub>3</sub>Cys-SSN oder ohne Stimulation (neutral). Angegeben jeweils ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit  $\alpha$ CD40-FITC.



**Abb.18 C:** CD40- Expression auf dendritischen Zellen (CD11c<sup>+</sup>) Zellen 0, 24 und 48 h nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub> Cys-OH, Pam<sub>3</sub>Cys-SSN oder ohne Stimulation (neutral). Angegeben ist jeweils die mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit  $\alpha$ CD40-FITC.



**Abb.19:** CD40L- Expression auf Th-Zellen (CD4<sup>+</sup>) 0, 24 und 48 h nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub> Cys-OH, Pam<sub>3</sub>Cys-SSN oder ohne Stimulation. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (mfi) nach Färbung mit anti-CD40L-FITC. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander wiederholte Experimente.

## 5 DISKUSSION

Bestandteile von Mikroorganismen, die im Wirt die Synthese von Zytokinen induzieren und so die Immunantwort entscheidend determinieren, wurden von Henderson et al. (1996) als bakterielle Moduline charakterisiert. Nach einem Konzept von Medzhitov und Janeway Jr. (1997) erkennt das Immunsystem einen Mikroorganismus als solchen initial anhand einer Reihe von bei Pathogenen hochkonservierten und weit verbreiteten Merkmalen (*engl.* pathogen-associated-molecular patterns, PAMPs).

Lipoproteine stellen die mit am weitesten verbreiteten bakteriellen Moduline sowie PAMPs dar und sind sowohl bei gram-negativen als auch gram-positiven und zellwandlosen Mikroorganismen zu finden (Braun und Hantke 1974, Huang et al. 1983, Weyer et al. 1987, Mühlradt et al. 1997 & 1998, Haake 2000, Bos et al. 2007). Bakterielle Lipoproteine spielen möglicherweise bei pathogenen und autoimmunpathogenen Prozessen im Verlauf verschiedener Infektionskrankheiten wie z.B. Lues, Lyme-Borreliose (Übersicht bei Haake 2000) und Mycoplasmen-Infektionen (Übersicht bei Seya und Matsumoto 2002) eine Rolle. Zudem ist ihr Einsatz als Adjuvantien derzeit Gegenstand intensiver Forschungen und bezüglich des therapeutischen Potentials einer Anwendung entsprechender synthetischer Lipopeptidanaloga liegt bereits eine Anzahl an Veröffentlichungen vor (Übersicht bei BenMohamed et al. 2002, Moyle und Toth 2008).

Das Ziel dieser Arbeit war, die immunmodulatorischen Eigenschaften typischer synthetischer Lipopeptidanaloga in Abhängigkeit von strukturellen Aspekten näher zu beleuchten. Dazu standen mehrere trispalmitoylierte Lipopeptide mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation und ein dipalmitoyliertes Lipopeptid zur Verfügung. Zunächst wurde die Wirkung der Lipopeptide auf die Th-Differenzierung *in vitro* untersucht. Durch Verwendung von Splenozyten der  $\alpha/\beta$ -TCR-transgenen DO11.10-Maus, deren T-Zellen ein Ovalbumin-Peptid erkennen, wurde sichergestellt, dass antigen-unspezifische Effekte untersucht wurden. Zweitens wurde untersucht, ob die Lipopeptide eine direkte, APC-unabhängige Wirkung auf isolierte Th-Zellen ausüben, wofür die Proliferation von isolierten CD4<sup>+</sup>-Zellen von verschiedenen Mausstämmen nach Stimulation mit den Lipopeptiden analysiert wurde. Zuletzt wurde die Wirkung

der Lipopeptide auf APC und Th-Zellen anhand der Analyse der Expression kostimulatorischer Moleküle untersucht.

## **5.1. Modulation der Th-Phänotyp-Differenzierung durch synthetische Lipopeptide**

### **5.1.1 Untersuchung der Th-Differenzierung im $\alpha/\beta$ -TCR transgenen *in vitro*-Modell**

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchung des Einflusses von Lipopeptidadjuvantien auf die Th-Zelldifferenzierung Zellen von  $\alpha/\beta$ -TCR- transgenen Mäusen verwendet, die sich *in vitro* je nach Stimulation zu einem Th1- oder einem Th2-Phänotyp differenzieren lassen (Seder et al. 1993, Hsieh et al. 1993b, Abbas et al. 1996). Der TCR der T-Zellen dieser Mäuse erkennt ein an gebundenes I-A<sup>d</sup> Ovalbumin-Peptid (Murphy et al. 1990), bei Kultivierung der Zellen mit verschiedenen Lipopeptiden und OVA ließen sich also TCR-unabhängige Effekte der Lipopeptide untersuchen.

Der Th-Phänotyp der Zellen wurde anhand der Analyse der Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$  (als Ausdruck eines Th1-Phänotyps) und IL-4 (als Ausdruck eines Th2-Phänotyps) bestimmt. Bei der Analyse der IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation einer Splenozyten-Mischkultur mit bakteriellen Pathogenen oder deren Bestandteilen ist zu bedenken, dass es neben Th-Zellen noch andere IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen gibt. Zu Beginn einer Immunreaktion stellen NK- Zellen und verschiedene T-Zell-Subsets (NKT-Zellen, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma/\delta$ -T- Zellen) eine wichtige Quelle für IFN- $\gamma$  dar (Cui et al. 1997, Lertmemongkolchai et al. 2001). Zur weiteren Charakterisierung des *in vitro*-Modells wurden deshalb die Anteile verschiedener Zellpopulationen an der Gesamtkultur untersucht. Während der Anteil von transgenen (KJ<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> Th-Zellen an den Splenozyten von D0.11.10 Mäusen *ex vivo* 4% betrug erhöhte er sich nach einwöchiger *in vitro*-Stimulation mit dem Antigen OVA auf 85 %. Da trispalmitoylierte Lipopeptide auch als Adjuvantien bei MHC-I-restriktierten T-Zell-Antworten wirken können (Reschner et al. 2003, Cottalorda et al. 2006) untersuchten wir ergänzend, ob in unserem System eine relevante Induktion einer IFN- $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup>-

positiven T-Zellen infolge der Lipopeptid-Stimulation auftritt. Durch den Vergleich von CD8<sup>+</sup>-depletierten DO.11.10-Splenozyten mit unselektionierten Splenozyten nach Kultivierung in Anwesenheit von OVA und den (exemplarisch verwendeten) Lipopeptiden Pam<sub>3</sub>Cys-SerAsnAsn und Pam<sub>3</sub>Cys-LGGGSKPK-NH<sub>2</sub> konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> Zellen an der durch die Lipopeptide induzierten IFN- $\gamma$ -Produktion nicht wesentlich beteiligt sind.

Infante-Duarte und Kamradt (1997) untersuchten die Th-Differenzierung nach Stimulation mit dem *Borrelia burgdorferi*-Lipoprotein (OspA) und -Lipopeptid (LpA) im selben Modell. Bezüglich der durch LpA induzierten Zytokinexpression fanden sie keine relevanten Unterschiede zwischen isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen nach Zugabe von bestrahlten Splenozyten und unfraktionierten Splenozyten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Splenozyten-Mischkulturen von  $\alpha/\beta$ -TCR transgenen Mäusen sind folglich geeignet, um den Einfluß TCR-unabhängiger Stimuli auf die Th-Differenzierung *in vitro* zu untersuchen. Infolge der selektiven Proliferation der transgenen CD4<sup>+</sup> Zellen nach Antigenzugabe ist zudem eine Charakterisierung des Th-Phänotyps anhand der Analyse der Zytokin-Produktion (IFN- $\gamma$ , IL-4) zulässig, der Anteil des durch CD8<sup>+</sup> Zellen produzierten IFN- $\gamma$  ist zu vernachlässigen. Aussagen über den Wirkungsmechanismus der Lipopeptide bei der Induktion eines Th-Phänotyps lassen sich aus diesem Modell dagegen nicht ableiten.

### **5.1.2 Einfluß synthetischer Lipopeptide auf die Th-Phänotyp-Differenzierung *in vitro***

Ein Th1-induzierender Effekt von bakteriellen Lipoproteinen bzw. deren trispalmitoylierten Lipopeptidanaloga wurde durch Infante-Duarte und Kamradt (1997) für ein Membran-Lipoproteinprotein (OspA) von *B. burgdorferi* bzw. dessen Lipopeptidanalogen (LpA) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass trispalmitoylierte Lipopeptide *in vitro* einen Th1-induzierenden Effekt haben, welcher sowohl dosis-, als auch abhängig vom Vorhandensein weiterer an den Lipid-Cysteinteil gebundener Aminosäuren war. So ließ sich mit allen verwendeten vier trispalmitoylierten Lipopeptiden (Pam3Cys-SEEE, Pam3Cys-SSN, Pam3Cys-SSCDGPSNTPPEIHPVV und Pam3Cys-LGGGSKPK-NH<sub>2</sub>) eine IFN- $\gamma$ -

Produktion durch Th-Zellen induzieren. Signifikante quantitative Unterschiede in der Wirkung fanden sich dabei nicht. Die Lipoaminosäure Pam<sub>3</sub>Cys-OH hatte dagegen keinen Effekt auf die Th-Zelldifferenzierung. Außerdem hatte das dipalmitoylierte Lipopeptid Pam<sub>2</sub>Cys-SSNA keine statistisch signifikante Wirkung bezüglich der IFN- $\gamma$ -Produktion.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Infante-Duarte und Kamradt (1997) und einer neueren Arbeit (Sieling et al. 2003). Bei letzterer konnte durch Stimulation humaner mononukleärer Zellen mit den trispalmitoylierten Membranlipopeptiden von *Treponema pallidum* (TP47) und *Mycobacterium tuberculosis* (19kD) sowie Pam<sub>3</sub>Cys(Lys)<sub>4</sub> *in vitro* eine Th1-Phänotypdifferenzierung induziert werden. Durch Zugabe von blockierenden TLR2- bzw. IL-12-Antikörpern war dieser Effekt zudem aufhebbar.

Das Erkennen von mikrobiellen Modulinen durch TLR stellt nach aktuellen Konzepten den wesentlichen Schritt bei der Initiierung der natürlichen Immunantwort dar und hat entscheidende Auswirkungen auf die nachfolgende spezifische Immunreaktion (Übersicht bei Takeda et al. 2003). Insgesamt scheint eine TLR-Aktivierung zur Induktion von Th1-Antworten beizutragen, als dafür wesentlicher Mechanismus wurde eine Induktion der IL-12-Produktion durch DC und Monozyten postuliert (Übersicht bei Dabbagh und Lewis 2003). Es konnte gezeigt werden, dass mikrobielle Lipopeptide in Monozyten (Radolf et al. 1995) und DC die Produktion von IL-12 über eine TLR2-Aktivierung induzieren können (Thoma-Uszynski et al. 2000, Hertz et al. 2001).

Eine andere Arbeitsgruppe demonstrierte dagegen, dass Lipopeptide über eine TLR2-Aktivierung - im Gegensatz zur LPS vermittelten Stimulation von TLR4 - die Produktion des inhibitorischen IL-12p40-Homodimers induzieren können (Re und Strominger et al. 2001). Inzwischen gibt es weitere gegenteilige Ergebnisse, so fand man bei Stimulation von isolierten humanen monozytengereiften DC mit Pam<sub>3</sub>Cys-Ser(Lys)<sub>4</sub> im Gegensatz zur Stimulation mit LPS keine Induktion einer IL-12-Produktion und zudem bei Ko-Kultivierung der so stimulierten DC mit naiven Th-Zellen eine Th2-Differenzierung (Agrawal et al. 2003). Mehrere Aspekte sind bezüglich der möglichen methodischen Ursachen der Unterschiede zu unseren

Ergebnissen und denen der eingangs zitierten Arbeit von Sieling et al. (2003) erwähnenswert. So sind bei der Verwendung von isolierten DC verschiedene Punkte zu bedenken. Welchen der Th-Phänotypen aktivierte DC induzieren hängt von mehreren Einflussfaktoren ab (Übersicht bei Moser und Murphy 2000, Shortman und Liu 2002). Für humane und murine DC konnte gezeigt werden, dass die Induktion eines bestimmten Th-Phänotyps sowohl von der Kinetik der DC-Aktivierung, als auch der Antigen dosis abhängt. So korrelierte eine hohe Antigen dosis mit der Induktion eines Th1-Phänotyps (Langenkamp et al. 2000, Boonstra et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden  $\alpha/\beta$ -TCR-transgene Zellen in Anwesenheit des Antigens OVA mit den Lipopeptiden stimuliert. Agrawal et al. (2003) inkubierten dagegen naive Th-Zellen mit den prä-aktivierten DC, so dass hier ein wichtiger Unterschied liegen könnte.

In der Arbeit von Sieling et al. (2003) wurden dagegen Effekte an unfraktionierten mononukleären Zellen (PBMC) gemessen. Es gibt Hinweise darauf, dass Monozyten und DC auf dieselben TLR-Agonisten bzw. Mikroorganismen mit unterschiedlichen Zytokinsekretionsmustern reagieren können (Werling et al. 2004, Karlsson et al. 2004). DC werden zwar seit einigen Jahren zunehmend als die wichtigsten APC bei der Induktion der Th-Differenzierung angesehen, ein möglicher Beitrag von Monozyten und Makrophagen zur Th-Differenzierung könnte jedoch bei Untersuchung isolierter DC „verlorengehen“.

Schließlich könnten während der Stimulation einer gemischten Splenozytenkultur mit Lipopeptiden durchaus noch andere die Th-Differenzierung beeinflussende Faktoren zum Tragen kommen als bei der gezielten Reifung von isolierten DC erfassbar wären. Ergebnisse von Jankovic et al. (2002) stellen das Konzept der IL-12-Produktion als entscheidendes Signal für die Initiierung der Th1-Differenzierung in Frage. Anhand von Untersuchungen der Zytokin-Sekretionsmuster der T-Zellen von zuvor mit intrazellulären Erregern infizierten IL-12- defizienten Mäusen konnte dabei gezeigt werden, dass sich *in vivo* ein Th1-Phänotyp in Abwesenheit von IL-12 entwickeln kann. Mäuse, die defizient für das essentiell an der TLR-Signaltransduktion beteiligte Adapterprotein MyD88 waren, entwickelten dagegen bei Stimulation mit denselben Erregern einen Th2-Phänotyp. Die Autoren folgern aus ihren Ergebnissen, dass der entscheidende Anstoß für eine Th1-Differenzierung

somit durch noch unbekannte, über die Interaktion von Mikroorganismen mit TLRs getriggerte Faktoren erfolgt, und dass IL-12 eher eine Rolle bei der Aufrechterhaltung eines bereits differenzierten Th1-Phänotyps spielen könnte.

### **5.1.3 Die biologische Wirkung synthetischer Lipopeptide unter strukturellen Aspekten**

Der biologisch wesentliche strukturelle Bestandteil von bakteriellen Lipoproteinen ist ein N-terminales Acyl<sub>3</sub>Cys-Motiv (Bessler et al. 1977). Die von uns verwendeten, typischen Lipopeptide stellen Analoga des N-Terminus bakterieller Lipoproteine dar (Wiesmüller et al. 1983). S-Glycerylcystein ist dabei mit zwei Fettsäuren, in diesem Fall Hexadecansäure (Palmitinsäure), verestert, eine weitere Fettsäure liegt amidisch gebunden vor (s.a. Kapitel 1.3). An die Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur waren bei den Lipopeptiden jeweils unterschiedliche Aminosäuresequenzen gebunden (s.a. 2.3.1) zudem wurde eine Lipoaminosäure (Pam<sub>3</sub>Cys-OH) verwendet. Zur Untersuchung der Bedeutung des Lipidteils –insbesondere der N-amidisch gebundenen Fettsäuresetzten wir zusätzlich ein diacetyliertes Lipopeptid (Pam<sub>2</sub>Cys-Ser AsnAsnAla) ein.

#### **5.1.3.1 Die Aminosäurestruktur**

Während in älteren Veröffentlichungen v.a. die übergeordnete Bedeutung des Lipidteils der Lipopeptide für deren biologische Wirkung nachgewiesen wurde (Bessler et al. 1977, Bessler et al. 1985, Lien et al. 1999) reiht sich diese Arbeit in die vorliegenden Untersuchungen ein, die zeigen konnten, dass auch das Vorhandensein weiterer Aminosäuren (AS) an der Pam<sub>3</sub>Cys-Struktur eine maßgebliche Voraussetzung für die immunmodulatorische Potenz der Lipopeptide ist (Bessler et al. 1985, Radolf et al. 1995, Aliprantis et al. 1999, Nishiguchi et al. 2001). Die Sequenz dieser Aminosäuren war dagegen in dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung für den Effekt, da sich keine signifikanten quantitativen Unterschiede bei der induzierten IFN- $\gamma$ -Produktion fanden. Ähnliche Beobachtungen wurden bezüglich der polyclonalen Aktivierung von B-Zellen (Bessler et al. 1985) und bei der Analyse der TLR2-Aktivierung *in vitro* (Spohn et al. 2004) durch verschiedene Lipopeptide

gemacht. Hinweise für eine Rolle der Aminosäurestruktur der Lipopeptide fanden sich dagegen bei ihrer Wirkung auf Neutrophile, wo nur ein sehr polares Lipopeptid (Pam<sub>3</sub>Cys-Ser Lys<sub>4</sub>) eine Aktivierung der Zellen bewirken konnte (Seifert et al. 1990). Bei Untersuchungen mit dipalmitoylierten mycoplasmalen Lipopeptiden (Pam<sub>2</sub>Cys-) war dagegen in einer Arbeit eine hydrophobe AS-Struktur mit einer höheren Makrophagen-aktivierenden Wirkung verbunden (Okusawa et al. 2004). Möglicherweise besteht hier also ein Unterschied zwischen tris- und diacetylierten Lipopeptiden.

Pam<sub>3</sub>Cys-OH zeigte weder in Bezug auf die Th-Differenzierung noch in den übrigen durchgeführten Experimenten (siehe 5.2 und 5.3) eine Aktivität. Auch bei früheren Untersuchungen war es bisher nicht möglich, eine biologische Aktivität dieser Lipoaminosäure nachzuweisen. Im Vergleich zu Lipopeptidanaloga von *Borrelia burgdorferi*- und *Treponema pallidum*-Lipoproteinen fand sich keine Monozyten/Makrophagen-Aktivierung (Radolf et al. 1995), Pam<sub>3</sub>Cys-OH zeigte keine mitogene Wirkung auf B-Zellen (Bessler et al. 1985) und im Gegensatz zu Pam<sub>3</sub>Cys-Lys<sub>4</sub> keine Induktion der NfκB-Transkription (Aliprantis et al. 1999).

#### 5.1.3.2 Die N- Acylierung

Neben den trispalmitoylierten Lipopeptiden wurde auch ein dipalmitoyliertes - Pam<sub>2</sub>Cys-SerAsnAsnAla – eingesetzt. Dabei sind wie bei den übrigen Lipopeptiden N-terminal zwei Palmitinsäuren in Esterbindung substituiert, während die dritte, N-amidisch gebundene Palmitinsäure, fehlt. Im Gegensatz zum Effekt der trispalmitoylierten Lipopeptide war bei Verwendung dieses Lipopeptides keine signifikante IFN-γ-Produktion zu beobachten.

Ältere Veröffentlichungen betonten in Bezug auf die Aktivität der Lipopeptide zwar stets die Bedeutung der zwei estergebundenen Fettsäuren, der amidisch gebundenen Fettsäure wurde dagegen eine geringere Bedeutung zugemessen (Shimizu et al. 1994, Metzger et al. 1995), andere fanden eine stärkere biologische Aktivität von diacetylierten Lipopeptiden (Mühlradt et al. 1997, s.u.). Diacetylierte Lipopeptide konnten in der Natur bisher bei den potentiell humanpathogenen

Erregern *Mycoplasma fermentans* (Lipopeptide MALP-2 und M161Ag) (Mühlradt et al. 1997, Matsumoto et al. 1998) und *Mycoplasma hyorhinis* (Mühlradt et al. 1998) sowie bei dem Purpurbakterium *Rhodopseudomonas viridis* (Weyer et al. 1987) nachgewiesen werden. MALP-2 und M161Ag erwiesen sich als potente Aktivatoren von DC (Weigt et al. 2003, Link et al. 2004).

Ob die Interaktion der Lipopeptide mit unterschiedlichen TLR-Heterodimeren auch für den beobachteten unterschiedlichen Effekt auf die Th-Differenzierung von Bedeutung sein könnte, lässt sich anhand des derzeitigen Wissensstandes nicht beurteilen. Beide Arten von Lipopeptiden sind TLR2-Agonisten, wobei trispalmitoylierte Lipopeptide Makrophagen über ein Heterodimer von TLR2 mit TLR1 aktivieren (Takeuchi et al. 2002), während dipalmitoylierte ein Heterodimer von TLR2 und TLR6 binden (Takeuchi et al. 2001, Morr et al. 2002). Unterschiedliche biologische Wirkungen von verschiedenen TLR2-Agonisten auf Mastzellen wurden beschrieben (McCurdy et al. 2003). Gegen eine funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Rezeptorbindung spricht allerdings eine kürzlich erschienene Arbeit, bei der keine Hinweise auf eine unterschiedliche Signaltransduktion bei Aktivierung des TLR2/TLR1- bzw. TLR2/TLR6-Heterodimers durch entsprechende Lipopeptide gefunden wurden (Farhat et al. 2008).

Die bereits erwähnte Arbeit von Okusawa et al. (2004) zeigt, dass die Aminosäuresequenz bei dipalmitoylierten im Gegensatz zu trispalmitoylierten Lipopeptiden für die biologische Aktivität von Bedeutung sein könnte. So fand man beim Vergleich von MALP-2 mit einem synthetischen Lipopeptidanalogon des N-Terminus von *Mycoplasma salivarum*, welches ebenfalls dipalmitoyliert ist aber eine andere AS-Sequenz aufweist, eine deutlich stärkere Makrophagen-aktivierende Wirkung des letzteren. In einer anderen Arbeit aktivierten dipalmitoylierte Lipopeptide sowohl Makrophagen als auch B-Zellen. Dabei waren die sehr polaren Lipopeptide Pam<sub>2</sub>CysSK<sub>4</sub> und Pam<sub>2</sub>CysSE<sub>4</sub> im Gegensatz zu weniger polaren wie MALP-2 von TLR6 unabhängig (Buwitt-Beckmann et al. 2005). Interessanterweise wurden in einer in ihren Ergebnissen von der vorliegenden Arbeit abweichenden Untersuchung nur SK<sub>4</sub>-substituierte (und somit sehr polare) di- und trispalmitoylierte Lipopeptide untersucht. Diese zeigten dabei eine gleichartige Induktion einer IFN- $\gamma$ -Produktion durch Th-Zellen bei Zusatz zu Kulturen aus mononukleären Nabelschnurblutzellen

und allogenen DC (Ghielmetti et al. 2005). Neben einem sehr polaren trisipalmitoylierten ( $\text{Pam}_3\text{Cys-SE}_4$ ) wurden in der vorliegenden Arbeit nur weniger polare Lipopeptide (inklusive des dipalmitoylierten  $\text{Pam}_2\text{CysSS}$ ) eingesetzt. Die zukünftige Untersuchung weiterer und polarerer dipalmitoylierter Lipopeptide im gleichen experimentellen Modell wie in unserer Arbeit erscheint somit lohnenswert, um die mögliche Bedeutung der AS-Sequenz genauer zu charakterisieren.

Vor kurzem ist eine Bedeutung von CD36 für die Rezeptorbindung einiger diacylierter Lipopeptide beschrieben worden, wobei z.B.  $\text{Pam}_2\text{CysSK}_4$  aber von CD36 unabhängig zu sein scheint (Hoebe et al. 2005). Neben TLR scheint es also noch weitere Moleküle zu geben, die für die Wirkung von Lipopeptiden von Bedeutung sind und deren weitere Untersuchung möglicherweise Aufschluß über die in dieser Arbeit gefundenen Effekte geben könnte.

Es wurde auch gezeigt, dass MALP-2 und *M. hyorhinis*-Lipopeptide unabhängig von der Art der substituierten Fettsäuren in Makrophagen die Produktion von NO stimulieren und dabei eine deutlich höhere spezifische Aktivität als trisipalmitoylierte Lipopeptidanaloga aufweisen (Mühlradt et al. 1997 und 1998). So wirkten dipalmitoylierte Lipopeptide schon im picomolaren, trisipalmitoylierte jedoch erst im mikromolaren Bereich. Diese Unterschiede waren nicht auf die bessere Löslichkeit der diacetyl- bzw. dipalmitoylierten Lipopeptide zurückzuführen (Mühlradt et al. 1998). In einer 1998 erschienenen Veröffentlichung von Huang et al. konnte gezeigt werden, dass NO die IL-12-Synthese auf transkriptioneller Ebene hemmt und die Entwicklung eines Th1-Phänotyps inhibiert. Bereits zuvor fand man bei NOS2-defizienten Mäusen, denen die induzierbare NO-Synthase (NOS2) fehlt, bei Konfrontation mit verschiedenen intrazellulären Pathogenen verstärkte Th1-Antworten (Wei et al. 1995). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte später, dass durch Makrophagen produziertes NO in niedrigen Dosen eine induzierende Wirkung auf die Th1-Differenzierung hat (Niedbala et al. 1999). Die von uns gefundenen Unterschiede bezüglich der Induktion eines Th1-Phänotyps in Abhängigkeit von der N-Acylierung der Lipopeptide könnten also möglicherweise auf eine unterschiedliche Wirkung auf die NO-Sekretion zurückzuführen sein. Zur Überprüfung dieser

Hypothese müssten weitere Experimente mit dipalmitoylierten Lipopeptiden, beispielsweise unter Verwendung chemischer iNOS-Inhibition, durchgeführt werden.

Für di- und trispalmitoylierte Lipopeptide sind also eine unterschiedliche Rezeptorbindung und Wirkung auf die NO-Synthese von Makrophagen bereits beschrieben worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun, dass sich aus dem Unterschied der N-Acylierung auch ein Unterschied bezüglich der Induktion der Th-Differenzierung ergibt. Meiner Ansicht nach sind weitere vergleichende Experimente mit tris- und dipalmitoylierten Lipopeptiden auch deshalb lohnenswert, weil sich daraus Hinweise über die Mechanismen der Th-Zell-Differenzierung ableiten lassen könnten.

## **5.2. APC-unabhängige Wirkung von Lipopeptiden auf Th-Zellen**

Adjuvantien stimulieren die zelluläre Immunantwort über die primäre Interaktion mit Zellen der natürlichen Immunität (Übersicht bei Schijns 2000). Lipopeptid-Adjuvantien sind zudem starke B-Zell-Mitogene (Melchers et al. 1975, Bessler et al. 1977, Wiesmüller et al. 1983, Bessler et al. 1985, Loleit et al. 1994). In der Literatur fanden sich wiederholt Hinweise auf eine geringfügige direkte proliferative Wirkung der Lipopeptide auch auf isolierte Thymozyten (Resch und Bessler 1981, Bessler et al. 1985), wobei die Autoren kritisch einräumten, dass es sich dabei zu einem beträchtlichen Anteil um unreife Zellen handelt. In unserer Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Lipopeptid-Adjuvantien eine direkte, d.h. APC-unabhängige Wirkung auf isolierte, adulte T-Helfer-Zellen ausüben.

Zunächst wurden CD4<sup>+</sup> Zellen aus einer Splenozytensuspension von BALB/c-Mäusen mittels eines magnetischen Selektionsverfahrens (MACS) isoliert (s.a. 3.2.6. und 3.3.1). Bei der anschließenden durchflußzytometrischen Reinheitskontrolle des Isolates zeigte sich ein CD4<sup>+</sup>-Anteil von über 95% bei einem Anteil von 1,8% B220-positiven Zellen. Bei der Kultivierung dieser Zellen in Gegenwart der Lipopeptide ließ sich durch alle bis auf Pam<sub>3</sub>Cys-OH eine deutliche Proliferation induzieren. Da wir vermuten, dass es sich bei dem gemessenen Effekt um eine Proliferation weniger

verbliebender B-Zellen und nicht der CD4<sup>+</sup> Zellen handelt, wurde das Experiment unter Verwendung von CD4<sup>+</sup>-selektionierten Zellen von J<sub>H</sub>T- Mäusen wiederholt. Bei diesen Mäusen sind die J<sub>H</sub>-Segmente und der intron-enhancer des IgH-Locus mittels eines Cre-LoxP-Rekombinationssystems des Bacteriophagen P1 deletiert, die Folge ist eine profunde Störung der B-Zellentwicklung und der Phänotyp weist keine reifen peripheren B-Zellen auf (Gu et al. 1991 und 1993). Bei Verwendung der CD4<sup>+</sup> Zellen dieser Mäuse hatte im Gegensatz zum ersten experimentellen Ansatz keines der Lipopeptide einen proliferativen Effekt.

Wir interpretieren unsere Ergebnisse als möglichen Hinweis darauf, dass Lipopeptide keine direkten, also keinen APC-unabhängigen Effekt auf Th-Zellen haben. Bereits 2000 konnten Infante-Duarte et al. dies für ein Lysat von *Borrelia burgdorferi* bzw. synthetische Lipopeptidanaloga nachweisen. Gestützt wird diese Vermutung weiter durch die Ergebnisse von Sieling et al. (2003), welche keinen direkten proliferativen Effekt von Lipopeptiden auf isolierte humane T-Zellen fanden. Selbstkritisch anzumerken ist jedoch, dass in unserem Experiment zwar eine hohe Aufreinigung von CD4<sup>+</sup> erzielt werden konnte, ein APC-freies System konnte jedoch durch die verwendete Methode nicht gewährleistet werden, lediglich die B-Zellen konnten durch Verwendung von J<sub>H</sub>T-Zellen sicher ausgeschlossen werden. Ein weiterer kritischer Punkt bezüglich der Aussagekraft unserer Ergebnisse ist zudem der unterschiedliche genetische Hintergrund (*engl.* background) der verwendeten Mausstämme.

Der Phänotyp von transgenen bzw. knock-out-Mäusen ist maßgeblich vom genetischen Hintergrund abhängig, d.h. er unterscheidet sich bei für ein und dasselbe Gen transgenen (bzw. knock-out-) Mäusen mit verschiedenen Hintergrund oft erheblich (Übersicht bei Montagutelli 2000). Bei älteren Arbeiten wurde ein gleichartig starker proliferativer Effekt von Lipopeptiden auf die B-Zellen verschiedener Mausstämme nachgewiesen, unter anderem wurden dabei auch Zellen von BALB/c und des J<sub>H</sub>T-background-Stammes C57BL/6 verwendet (Bessler et al. 1977). Angesichts dieser Daten ist die Schlussfolgerung zwar zulässig, dass die Lipopeptide bei Zellen von Mäusen des C57BL/6-backgrounds keinen direkten proliferativen Effekt auf Th-Zellen, sondern auf B-Zellen haben. Der fehlende Effekt

der Lipopeptide auf die CD4<sup>+</sup> J<sub>H</sub>T-Zellen in unserer Arbeit erlaubt aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes jedoch nicht den eindeutigen Rückschluß, dass es sich bei dem bei den BALB/c-Zellen gemessenen Effekt um eine Proliferation von wenigen nach der CD4<sup>+</sup> Selektion verbliebenen B-Zellen handelt. Zum Beweis dieses Rückschlusses wäre eine Identifizierung der bei den BALB/c-Zellen proliferierenden Zellpopulation -beispielsweise durch Färbung von Oberflächenmolekülen und anschließende durchflußzytometrische Analyse- sinnvoll gewesen.

Bemerkenswert ist angesichts der zuvor diskutierten Ergebnisse bzgl. der Th-Differenzierung (s. 5.1), dass das dipalmitoylierte Lipopeptid Pam<sub>2</sub>Cys-SerAsnAsnAla in der Kultur von BALB/c-Zellen einen proliferativen Effekt aufwies und folglich – im Gegensatz zu Pam<sub>3</sub>Cys-OH- keineswegs biologisch inaktiv war.

### **5.3 Einfluß synthetischer Lipopeptidadjuvantien auf die Expression kostimulatorischer Moleküle**

Wie im vorherigen Kapitel erläutert wurde, gehen wir von einem indirekten Effekt der Lipopeptide auf Th-Zellen aus. Deshalb wurde auch der Einfluss synthetischer Lipopeptide auf APC untersucht. Für eine vollständige Aktivierung sind Th-Zellen neben der MHC-Restriktion und der Erkennung des Antigens durch den TCR auf kostimulatorische Signale durch die APC angewiesen. Das am besten charakterisierte kostimulatorische System ist das CD28/B7-System. Die Interaktion des auf Th-Zellen exprimierten CD28 mit dem vornehmlich auf professionellen APC exprimierten B7.2 (CD86) und dem weit verbreiteten B7.1 (CD80) führt zu einer Aktivierung der IL-2-Transkription und somit zur klonalen Expansion der Th-Zellen (Jenkins et al. 1991). Bleibt diese Interaktion jedoch aus resultiert eine Anergie der T-Zellen (Appleman und Boussiotis 2003).

Ein zusätzlich gut untersuchtes kostimulatorisches System ist die CD40/CD40L-Interaktion. Während CD40 v.a. auf den professionellen APC jedoch z.B. auch auf Endothelzellen exprimiert wird findet sich sein Ligand, CD40L (CD154), vornehmlich auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen. Die Ligation von CD40 ist ein entscheidender Punkt bei der

Initiierung sowohl der Th-abhängigen humoralen als auch der zellvermittelten spezifischen Immunantwort (Übersicht bei van Kooten und Banchereau 1997, Grewal und Flavell 1998, Quezada et al. 2004).

Bei den zuvor dargestellten Experimenten wiesen alle trispalmitoylierten Lipopeptide eine vergleichbare Wirkung auf, die Lipoaminosäure Pam<sub>3</sub>Cys-OH zeigte dagegen keinen Effekt. Zur Untersuchung des Einflusses der Lipopeptide auf die Kostimulation wurden deshalb nur Pam<sub>3</sub>Cys-SerAsnAsn und Pam<sub>3</sub>Cys-OH verwendet.

Das dipalmitoylierte Lipopeptid Pam<sub>2</sub>Cys-SerAsnAsnAla wurde dagegen nicht eingesetzt. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass dipalmitoylierte Lipopeptide die Expression von CD40, B7.1 und B7.2 auf DC steigern können (Weigt et al. 2003, Link et al. 2004).

### **5.3.1 Effekt auf das CD28/B7-System**

Nach Stimulation von BALB/c- Splenozyten (s. 3.1.7) mit Pam<sub>3</sub>Cys-SerAsnAsn jedoch nicht mit Pam<sub>3</sub>Cys-OH kam es im Vergleich zu unstimulierten Kulturen (= Kontrollbedingung) zeitabhängig zur vermehrten Expression von CD86 (B7.2) auf dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen. Das Maximum der Expression fand sich bei DC und Makrophagen nach 24h während bei B-Zellen die Expression nach 48h noch weiter zugenommen hatte. Bemerkenswert ist, dass auch unter den Kontrollbedingungen ohne Zugabe von Lipopetid im Zeitverlauf eine (relativ geringere) Zunahme der Expression kostimulatorischer Moleküle, insbesondere auf Makropagen und DC zu beobachten war. Für diesen Effekt könnten besondere Umstände bei der Kultivierung wie z.B. Adhäsion an der Zellkulturplatte oder auch interzelluläre Kontakte verantwortlich sein. Für CD80 (B7.1) war dagegen lediglich auf B- Zellen eine vermehrte Expression nachweisbar. Bereits frühere Arbeiten konnten in Übereinstimmung mit der vorliegenden eine Induktion der CD86-Expression durch verschiedene bakterielle Lipoproteine bzw. deren Lipopeptidanaloga nachweisen. Dabei induzierten Pam<sub>3</sub>Cys-Lys<sub>4</sub>, das 19kDa-Lipoprotein von *Mycobacterium tuberculosis* (19kD-LP) und das 47kDa-Lipoprotein

von *Treponema pallidum* (TP47) eine vermehrte Expression von CD86 auf DC (Hertz et al. 2001), wobei dieser Effekt TLR2-abhängig war. Zudem wurde eine verstärkte CD86-Expression auf Monozyten nach Stimulation mit TP47 nachgewiesen (Sieling et al. 2003).

Eine uneinheitlichere Datenlage findet sich bezüglich CD80. Während in einer Arbeit Pam<sub>3</sub>Cys-Lys<sub>4</sub>, 19kD-LP und TP47 eine vermehrte Expression von CD80 auf dendritischen Zellen bewirkten (Hertz et al. 2001), konnte in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit kein Effekt von TP47 bzgl. der Expression auf Monozyten gemessen werden (Sieling et al. 2003). B-Zellen wurden jeweils nicht untersucht. Die Analyse der CD80-Expression wurde jeweils -wie in unserer Arbeit- durchflußzytometrisch mittels Kalkulation der mittleren Fluoreszenz-Intensität durchgeführt, zudem waren die Zeitpunkte der Messungen vergleichbar, so dass die Unterschiede nicht auf eine divergierende Methodik zurückzuführen sind.

Zusätzlich fanden wir eine Induktion der CD28-Expression auf CD4<sup>+</sup> Zellen durch Pam<sub>3</sub>Cys-SerAsnAsn, Pam<sub>3</sub>Cys-OH zeigte dagegen wiederum keinen Effekt. Wir gehen hier von einer indirekten Hochregulation aus: Infante Duarte (unveröffentlichte Daten) konnte zeigen, dass ein *B. burgdorferi*-Lysat die Expression von CD28 auf CD4<sup>+</sup> in Anwesenheit von APC steigerte, bei Verwendung von isolierten Th- Zellen blieb dieser Effekt jedoch aus.

### **5.3.2 Effekt auf das CD40/CD40L-System**

Pam<sub>3</sub>Cys-SerAsnAsn verstärkte im Gegensatz zu Pam<sub>3</sub>Cys-OH die Expression von CD40 auf DC, Makrophagen und B-Zellen. Die Hochregulation war bereits nach 24h nachweisbar und hatte nach 48h weiter zugenommen. Zusätzlich fand sich eine vermehrte Expression von CD40L (CD154) auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *Borrelia burgdorferi*-Lysat, welches als wesentlichen biologisch wirksamen Bestandteil Lipoproteine enthält, nur im Beisein von APC, d.h. nicht an isolierten Th-Zellen eine Expression von CD40L induzierte (Infante-Duarte, unveröffentlichte Daten). Somit ist hier von einer indirekten Wirkung auf Th-Zellen auszugehen.

Es gibt seit längerem Hinweise darauf, dass eine Stimulation der IL-12-Produktion über die CD40-Ligation Einfluß auf die Th-Differenzierung hat (Shu et al. 1995). Die Hochregulation der CD40/CD40L-Expression durch die Lipopeptide könnte also zur Induktion und Aufrechterhaltung eines Th1-Phänotyps beitragen. Neuere Untersuchungen sprechen allerdings dagegen, dass die CD40-Bindung durch seinen Liganden alleine ein ausreichendes Signal zur DC-„Reifung“ darstellt. In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass eine TLR-Aktivierung ein entscheidender Ko-Stimulus der CD40-Ligation bei der Produktion von IL-12p70 durch DC war (Schulz et al. 2000, Krug et al. 2001). Es wurde zudem gezeigt, dass MyD88-defiziente Mäuse keine Th1-Antwort auf Immunisierung mit OVA und Freund's Adjuvant entwickeln können (Schnare et al. 2001). MyD88 fungiert als Adaptermolekül der TLR-Signaltransduktion (Übersicht bei Takeda et al. 2003), die fehlende Th1-Antwort könnte also somit eine Folge der Störung der TLR-Signaltransduktion sein. Lipopeptide als bekannte TLR-Agonisten (Takeda et al. 2003) und - wie in dieser Arbeit gezeigt wurde- Induktoren des CD40/CD40L- Systems könnten somit beide Signale zur Induktion einer DC-Reifung bereitstellen.

Ein interessanter Ansatz zur weiteren Erforschung des Wirkungsmechanismus der synthetischen Lipopeptide ergibt sich aus den in jüngster Zeit zunehmenden Erkenntnissen über DC-Subtypen (Übersicht bei Shortman und Liu 2002) und deren Einfluß auf die Th-Differenzierung (Übersicht bei Moser und Murphy 2000, Kapsenberg 2003). In der Maus ist die Expression von CD11b, MHCII, CD80, CD86 und CD40 bei allen splenischen DC gleich (Moser und Murphy 2000), so dass ein experimenteller Ansatz wie der in der vorliegenden Arbeit verwendete keine Subtypen-Differenzierung zulässt. Inzwischen konnten mindestens drei murine und zwei humane Subpopulationen von DC anhand ihrer differentiellen Expression von CD4 und CD8 charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass DC-Subpopulationen, die sich anhand der Expression von CD8 $\alpha$  unterscheiden, einen unterschiedlichen Einfluß auf die Th-Zelldifferenzierung ausüben können. Diese Unterschiede fanden sich jedoch nicht bei unreifen, das heißt nur bei prästimulierten DC. Ein vorheriger externer Stimulus ist somit die wahrscheinliche Voraussetzung für die unterschiedlichen Effektorfunktionen der DC-Suppopulationen (Übersicht bei

Shortman und Liu 2002). Eine Arbeit konnte zeigen, dass sowohl der  $CD8\alpha^+$ - als auch der  $CD8\alpha^-$ -Subtyp in Abhängigkeit von der Antigen dosis *in vitro* jeweils beide Th-Phänotypen induzieren kann (Boonstra et al. 2003): beide DC-Subsets induzierten bei hohen Antigen dosen einen Th1-Phänotyp und bei niedrigen Dosen einen Th2-Phänotyp. Bei niedrigen Antigen dosen konnte jedoch bei Vorliegen zusätzlicher Signale trotzdem ein Th1-Phänotyp induziert werden:  $CD8\alpha^+$  DC, die eine hohe TLR9-Expression aufweisen, konnten bei zusätzlicher Administration eines TLR9-Liganden (CpG-reiche DNA) auch in Gegenwart niedriger Antigen dosen einen Th1-Phänotyp induzieren. Derselbe Effekt konnte bei  $CD8\alpha^-$  DC, die eine hohe TLR4-Expression aufweisen, durch LPS-Zugabe erzielt werden. Die Abhängigkeit der Th1-Differenzierung von der Antigen dosis könnte möglicherweise auf einer konsekutiv erhöhten CD40L-Expression beruhen (Ruedl et al. 2000). Hier böte sich ein guter Ansatzpunkt zu weiteren Experimenten mit den Lipopeptiden.  $CD8\alpha^-$  DC exprimieren neben TLR4 noch weitere TLR, darunter die zur Lipopetidbindung notwendigen TLR2 und TLR1 (Übersicht bei Shortman und Liu 2002). Die Untersuchung des Einflusses von Lipopeptiden auf einzelne DC-Subpopulationen bzw. auf Zellgemische nach Depletion bestimmter Subpopulationen könnte weiteren Aufschluß über den Wirkungsmechanismus liefern. Da die Aktivierung bestimmter DC-Subsets offenbar einen entscheidenden Schritt bei der Th-Differenzierung darstellt, wäre hier zudem ein Vergleich zwischen tris- und dipalmitoylierten Lipopeptiden sinnvoll.

#### **5.4 Implikationen für die Rolle bakterieller Lipoproteine bei Infektionen und für die therapeutische Anwendung von Lipopeptiden**

Es ist anzunehmen, dass mehrere und teilweise noch nicht verstandene Effekte zur Induktion eines Th1-Phänotyps durch Lipopeptide beitragen. Ob eine Beeinflussung der Th-Phänotyp-Differenzierung durch Lipoproteine auch im Rahmen von Infektionen eine Rolle spielt, lässt sich bisher nicht eindeutig sagen. Es wurde gezeigt, dass Bestandteile intrazellulärer Mikroorganismen wie *L. monocytogenes* (Hsieh et al. 1993a) und *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli et al. 1994) einen Th1-

Phänotyp induzieren können und es wurde postuliert, dass eine solche Immunantwort die angemessene Verteidigungsstrategie sein könnte. Anders verhält es sich bei *B. burgdorferi*, ein extrazellulärer Erreger, der kein LPS, dafür aber zahlreiche Pam<sub>3</sub>Cys-Lipoproteine in seiner äußeren Membran enthält (Brandt et al. 1990). Eine dadurch induzierte Th1-Antwort könnte hier möglicherweise zur ungenügenden Eliminierung des Erregers und nachfolgend zu einem immunpathologischen Prozeß beitragen (Yssel et al. 1991, Kamradt et al. 1995, Übersicht bei Haake 2000). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass das Immunsystem bei den meisten Erregern mit mehreren Modulinen gleichzeitig konfrontiert wird. Pam<sub>3</sub>Cys-Lipoproteine sind bei gram-negativen Bakterien der Gruppe der *Enterobacteriaceae* zwar weit verbreitet, sie stellen aufgrund ihrer Lokalisation im periplasmatischen Spalt der Membran aber nicht die dem Immunsystem primär exponierten Moleküle dar (Braun und Hantke 1974). Denkbar ist jedoch, dass Lipoproteine bei solchen Erregern in bestimmten Situationen in Erscheinung treten und so die Immunantwort unter Umständen beeinflussen könnten.

Der in dieser Arbeit dargestellte Einfluß der synthetischen Lipopeptide auf die Expression kostimulatorischer Moleküle macht deren mustergültigen Adjuvanzeigenschaften (Cox und Coulter 1997, Schijns 2000, O'Hagan und Valiante 2003) deutlich. Auch die Th1-induzierende Wirkung der Lipopeptide macht sie für eine therapeutische Anwendung als Adjuvantien interessant. Synthetische Lipopeptide haben sich als Adjuvantien bei prophylaktischen oder therapeutischen Immunisierungen als hochwirksam erwiesen und sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (BenMohamed et al. 2002, Huber et al. 2002, Mittenbühler et al. 2003, Bessler et al. 2003).

Das Konzept einer Manipulation der Th-Differenzierung zugunsten eines Th1-Phänotyps zur Behandlung allergischer (Stirling und Chung 2000, Wohlleben und Erb 2001) und bestimmter infektiöser Erkrankungen wie z.B. Mykobakteriosen (Kawakami 2003) wurde in den letzten Jahren wiederholt propagiert und klinische Studien über Th1-induzierende Adjuvantien sind am laufen (Moingeon et al. 2001). Eine konkrete Anwendung am Menschen zeichnet sich derzeit jedoch noch nicht ab. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie andere kürzlich erschienene

Veröffentlichungen (Huber et al. 2002, Sieling et al. 2003) zeigen, dass sich mit trispalmitoylierten Lipopeptiden eine Th1-Differenzierung von T-Zellen induzieren lässt. Zudem konnte durch trispalmitoylierte Lipopeptide *in vitro* sowohl bei humanen als auch bei murinen Zellen eine Th2-Antwort supprimiert und *in vivo* bei Mäusen nach Exposition mit bestimmten Allergenen und Mikroorganismen eine IgE-Produktion sowie Eosinophilie verhindert werden (Akdis et al. 2003, Revets et al. 2005) und sogar ein „shift“ eines bereits etablierten Th2-Phänotyps zu einem Th1-Phänotyp erreicht werden (Patel et al. 2005). Bereits einige Jahre zuvor konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe von Adjuvantien (in diesem Fall complete Freund's adjuvant, CFA) die Th1-Differenzierung auch *in vivo* beeinflussen lässt (Yip et al. 1999). Ob eine Anwendung in der Allergie-Therapie generell von Nutzen ist, ist in Anbetracht der Tatsache, dass bei atopischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale auch eine chronische Entzündungsreaktion eine Rolle spielt, welche durch eine Th1- Antwort noch verstärkt werden könnte, noch nicht zu beantworten (Übersicht bei Lewis 2002). Zudem ist die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort möglicherweise mit weiteren Risiken behaftet (Brunet et al. 2002). Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt muss zudem der simplifizierende und teils überholte Charakter des Th1/Th2- Paradigmas –insbesondere seit der Entdeckung des Th17-Phänotyps- in Bezug auf die Autoimmunpathogenese betont werden (Bach und Herbelin 1999, Gor et al. 2003, Gutcher und Becher 2007).

Eine starke Induktion der Th1-Differenzierung könnte theoretisch auch in der immunmodulatorischen Therapie von Tumoren von Nutzen sein. Neben der durch Th1-Zytokine bedingten Aktivierung zellulärer Abwehrmechanismen ist auch eine direkte inhibitorische Wirkung von IFN- $\gamma$  auf Tumorzellen beschrieben worden (Übersicht bei Blattman und Greenberg 2004, Mesa und Fernández 2004).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Lipoproteine mit der N-terminalen Struktur des Trispalmitoyl-Cysteins (Pam<sub>3</sub>Cys) finden sich in den Membranen einer Vielzahl von Bakterien. Strukturanaloge synthetische Lipopeptide sind zudem Gegenstand intensiver Forschungen bezüglich einer therapeutischen Anwendung als Adjuvantien. In dieser Arbeit wurde der Einfluß verschiedener synthetischer trispalmitoylierter sowie eines dipalmitoylierten Lipopeptides auf die T-Helfer-Zell(Th)-Phänotypdifferenzierung und die Expression kostimulatorischer Moleküle *in vitro* untersucht.

$\alpha/\beta$ -TCR-transgene Splenozyten von DO.11.10-Mäusen, die ein Peptid des Ovalbumins als Antigen erkennen, zeigten bei *in vitro*-Kultivierung in Anwesenheit des Antigens eine selektive Proliferation der CD4<sup>+</sup> Th-Zellen. Bei gleichzeitiger Zugabe verschiedener trispalmitoylierter Lipopeptide, nicht jedoch der Lipoaminosäure Pam<sub>3</sub>Cys-OH sowie eines dipalmitoylierten Lipopeptides (Pam<sub>2</sub>Cys-), kam es dosisabhängig und unabhängig von der an Pam<sub>3</sub>Cys gebundenen Aminosäuresequenz zur Induktion eines Th1-Phänotyps.

Keines der Lipopeptide induzierte bei isolierten Th-Zellen von J<sub>H</sub>T-Mäusen eine Proliferation. Dieses Ergebnis legt zwar den Schluss nahe, dass die Lipopeptide nicht direkt auf T-Zellen wirken, das hier verwendete experimentelle Setting lässt jedoch eine eindeutige Beantwortung dieser Frage nicht zu.

Sowohl auf antigen-präsentierenden Zellen (APC) als auch auf Th-Zellen verstärkte das trispalmitoylierte Lipopeptid Pam<sub>3</sub>Cys-SSN im Gegensatz zu Pam<sub>3</sub>Cys-OH die Expression kostimulatorischer Moleküle des CD40/CD40L- und des CD28/B7-Systems.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass synthetische Lipopeptide *in vitro* eine proinflammatorische Immunantwort induzieren können, was auch *in vivo* im Rahmen diverser bakterieller Infektionen eine Rolle spielen könnte. Zudem liefert diese Arbeit Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Lipopeptide, was für die Synthese von Adjuvantien für therapeutische Anwendungen von Nutzen sein könnte.

## 7 ABKÜRZUNGEN

### 7.1. Allgemein

Ak	Antikörper
Ag	Antigen
APC	<i>engl.</i> antigen-presenting cell
Bb	<i>Borrelia burgdorferi</i>
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumine
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CM	<i>engl.</i> complete medium
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DC	<i>engl.</i> dendritic cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTH	<i>engl.</i> delayed- type- hypersensitivity
FACS	<i>engl.</i> fluorescence- activated cell sort
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>engl.</i> forward scatter
G-CSF	<i>engl.</i> granulocyte-colony stimulating factor
h	<i>engl.</i> hour
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INOS	<i>engl.</i> inducible Nitric-Oxide-Synthase
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>engl.</i> magnetic associated cell sort
MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex
MIP	<i>engl.</i> macrophage inflammatory protein
NfκB	nukleärer Faktor kappa-b
NK	Natürliche Killerzelle
NO	<i>engl.</i> nitric oxide

OspA	<i>engl.</i> outer surface lipoprotein A
OD	<i>engl.</i> optical density
OVA	Ovalbumin- Peptid 323-339
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol 12-Myristat 13- Acetat
ROR	<i>engl.</i> retinoic acid-related ophan-receptor
Rpm	<i>engl.</i> rotations per minute
SSC	<i>engl.</i> sideward scatter
TCR	T-Cell-Receptor
Th	T-Helferzelle
TGF	<i>engl.</i> tumor growth factor (Tumor-Wachstumsfaktor)
TLR	<i>engl.</i> Toll-like receptor
TNF	Tumor- Nekrose-Faktor
Treg	<i>engl.</i> T-regulatory cells

## 7.2 Abkürzungen von Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1999;383:787-93.
- 2 Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, et al. Cutting Edge: Different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-9.
- 3 Akdis CA, Kussebi F, Pulendran B, et al. Inhibition of T helper 2-type responses, IgE production and eosinophilia by synthetic lipopeptides. *Eur J Immunol* 2003;33:2717-26.
- 4 Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA 4. *Nat Rev Immunol* 2001;1:220-8.
- 5 Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285:736-9.
- 6 Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.
- 7 Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 2003;192:161-80.
- 8 Bach JF, Herbelin A. On the present limitations of the Th1/Th2 Paradigm. *Immunologist* 1999;7:1-2.
- 9 BenMohamed L, Wechsler SL, Nesburn AB. Lipopeptide vaccines- yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect Dis* 2002;2:425-31.

- 10 Bessler WG, Resch K, Hancock E, Hantke K. Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipopeptide derivatives of the lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Z Immun Forsch* 1977;153:11-22.
- 11 Bessler WG, Ottenbreit BP. Studies on the mitogenic principle of the lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Comm* 1977;76:239-46.
- 12 Bessler WG, Cox M, Lex A, Suhr B, Wiesmüller KH, Jung G. Synthetic lipopeptide analogues of bacterial Lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J Immunol* 1985;135:1900-5.
- 13 Bessler WG, Heinevetter L, Wiesmüller KH, et al. Bacterial cell wall components as immunomodulators--I. Lipopeptides as adjuvants for parenteral and oral immunization. *Int J Immunopharmacol* 1997;19:547-50.
- 14 Bessler WG, Mittenbühler K, Esche U, Huber M. Lipopeptide adjuvants in combination treatment. *Int Immunopharm* 2003;3:1217-24.
- 15 Bettelli E, Carrier Y, Gao W. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
- 16 Bird JJ, Brown DR, Mullen AC. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998;9:229-37.
- 17 Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: treatment for the masses. *Science* 2004;305:200-5.
- 18 Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995;3:87-98.

- 19 Bommireddy R, Doetschman T. TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol Med* 2007;13:492-501.
- 20 Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, et al. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential Toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 2003;197:101-9.
- 21 Bos MP, Robert V, Tommassen J. Biogenesis of gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* 2007;61:191-214.
- 22 Braun V, Hantke K. Biochemistry of bacterial cell envelopes. *Annu Rev Biochem* 1974;43:89-121.
- 23 Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infect Immun* 1990;58:983-91.
- 24 Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285:732-6.
- 25 Brunet LR, Hunt J, Rook GAW. Dangers of therapeutic manipulation of the Th1-Th2 balance. *Trends Immunol* 2002;23:127-8.
- 26 Burkly LC. CD40 pathway blockade as an approach to immunotherapy. *Adv Exp Med Biol* 2001;489:135-52.
- 27 Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmüller KH, et al. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol* 2005;35:282-9.

- 28 Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmüller KH, et al. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* 2006;281:9049-57.
- 29 Campbell KA, Owendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* 1996;4:283-9.
- 30 Chambers CA, Allison JP. Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol* 1997;9:396-404.
- 31 Chang JT, Segal BM, Nakanishi K, Okamura H, Shevach EM. The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur J Immunol* 2000;30:1113-9.
- 32 Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;5:297-322.
- 33 Cottalorda A, Vershelde C, Marçais A, et al. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol* 2006;36:1684-93.
- 34 Cox JC, Coulter AR. Adjuvants- a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997;15:248-56.
- 35 Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naïve versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 1994;152:2675-85.

- 36 Croft M, Swain SL. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J Immunol* 1995;154:4269-82.
- 37 Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421:744-8.
- 38 Cui J, Shin T, Kawano T, et al. Requirement for V $\alpha$  14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997;278:1623-6.
- 39 Dabbagh K, Lewis DB. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:199-204.
- 40 Deres K, Schild H, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 1989;342:561-4.
- 41 De Silva DR, Urdahl KB, Jenkins MK. Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J Immunol* 1991;147:3261-7.
- 42 Edinger M, Bessler WG, Kleine B. Synergistic stimulation of human B lymphocytes by anti-CD40 monoclonal antibodies and synthetic lipopeptide analogues from *Escherichia coli* lipoprotein. *Immunology* 1994;81:205-10.
- 43 Farhat K, Riekenberg S, Heine H, et al. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* 2008;83:692-701.
- 44 Feng C, Watanabe S, Maruyama S, et al. An alternate pathway for type 1 T cell differentiation. *Int Immunol* 1999;11:1185-94.

- 45 Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, et al. A new murine CD4<sup>+</sup> T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 1989;143:518- 25.
- 46 Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993;178:2249-54.
- 47 Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995;2:523-32.
- 48 Gajewski TF, Pinnas M, Wong T, Fitch FW. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol* 1991;146:1750-8.
- 49 Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994;153:2533-43.
- 50 Ghielmetti M, Zwicker M, Ghielmetti T, Simon MM, Villiger PM, Padovan E. Synthetic bacterial lipopeptide analogs facilitate naive CD4<sup>+</sup> T cell differentiation and enhance antigen-specific HLA-II-restricted responses. *Eur J Immunol* 2005;35:2434-42.
- 51 Gor DO, Rose RR, Greenspan NS. Th1-Th2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol* 2003;4:503-5.
- 52 Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Ann Rev Immunol* 1998;16:111-35.

- 53 Gu H, Kitamura D, Rajewsky K. B cell development regulated by gene rearrangement: arrest of maturation by membrane-bound D mu protein and selection of DH element reading frames. *Cell* 1991;65:47-54.
- 54 Gu H, Zou YR, Rajewsky K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 1993;73:1155-64.
- 55 Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 2007;117:1119-27.
- 56 Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 2000;146:1491-504.
- 57 Halegoua S, Hirashima A, Inouye M. Existence of a free form of a specific membrane lipoprotein in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1974;120:1204-8.
- 58 Hantke K, Braun V. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem* 1973;34:284-96.
- 59 Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature* 1992;356:607-9.
- 60 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
- 61 Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1983;157:1149-69.

- 62 Hauschildt S, Hoffmann P, Beuscher HU, et al. Activation of bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopeptide: cytokine production, phagocytosis and Ia expression. *Eur J Immunol* 1990a;20:63-8.
- 63 Hauschildt S, Bassenge E, Bessler W, Busse R, Mulsch A. L-arginine-dependent nitric oxide formation and nitrite release in bone marrow-derived macrophages stimulated with bacterial lipopeptide. *Immunology* 1990b;70:332-7.
- 64 Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 1996;60:316-41.
- 65 Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 2001;166:2444-50.
- 66 Heufler C, Koch F, Stanzl U, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996;26:659-68.
- 67 Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433:523-7.
- 68 Hoffmann P, Heinle S, Schade UF, et al. Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology* 1988;177:158-70.
- 69 Hoffmann P, Wiesmüller KH, Metzger J, Jung G, Bessler WG. Induction of tumor cytotoxicity in murine bone marrow-derived macrophages by two synthetic lipopeptide analogues. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1989;370:575-82.

- 70 Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in a  $\alpha\beta$  T-cell-transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6065-9.
- 71 Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Qwolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of Th1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993a;260:547-51.
- 72 Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ -TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int Immunol* 1993b;5:371- 82.
- 73 Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med* 1995;181:713-21.
- 74 Huang YX, Ching G, Inouye M. Comparison of the Lipoprotein gene among the Enterobacteriaceae. *J Biol Chem* 1983;258:8139-45.
- 75 Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, et al. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 1998;28:4062-70.
- 76 Huber M, Baier W, Bessler WG, Heinevetter L. Modulation of the Th1/Th2 bias by lipopeptide and saponin adjuvants in orally immunized mice. *Immunobiology* 2002;205:61-73.
- 77 Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S, Saito T. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* 2007;178:6715-9.

- 78 Infante-Duarte C, Kamradt T. Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in  $\alpha/\beta$  T-cell receptor transgenic mice. *Infect Immun* 1997;65:4094-9.
- 79 Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Sem Immunopathol* 1999;21:317-38.
- 80 Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000;165:6107-15.
- 81 Jankovic D, Kullberg MC, Hieny S, Caspar P, Collazo CM, Sher A. In the absence of IL-12, CD4<sup>+</sup> T cell responses to intracellular pathogens fail to default a Th2 pattern and are host protective in a IL-10 <sup>-/-</sup> setting. *Immunity* 2002;16:429-39.
- 82 Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 delivers a costimulatory signal in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991;147:2461-6.
- 83 Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007;130:1071-82.
- 84 Johnson RB, Köhl S, Wiesmüller K, Jung G, Bessler WG. Synthetic analogues of the N-terminal lipid part of bacterial lipoprotein are B-lymphocyte-mitogens in vitro and in vivo. *Immunobiology* 1983;165:27-35.
- 85 Kamanaka M, Yu P, Yasui T, et al. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immunity* 1996;4:275-81.
- 86 Kamradt T, Krause A, Burmester GR. A role for T- cells in the pathogenesis of treatment resistant Lyme arthritis? *Mol Med* 1995;1:486-90.

- 87 Kaplan MH, Wurster AL, Grusby MJ. A signal transducer and activator of transcription (Stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 1998;188:1191-6.
- 88 Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984-93.
- 89 Karlsson H, Larsson P, Worls AE, Rudin A. Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun* 2004;72:2671-8.
- 90 Kawakami K. Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother* 2003;9:201-9.
- 91 King CL, Stupi RJ, Craighead N, June CH, Thyphronitis G. CD28 activation promotes Th2 subset differentiation by human CD4<sup>+</sup> cells. *Eur J Immunol* 1995;25:587-95.
- 92 Kooten van C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:330-37.
- 93 Krug A, Towarowski A, Britsch S, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001;31:3026-37.
- 94 Kuchroo VK, Das MP, Brown J, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707-18.

- 95 Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 2000;1:311-6.
- 96 Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-40.
- 97 Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995;154:97-105.
- 98 Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 1990;172:921-9.
- 99 Leitenberg D, Bottomly K. Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Sem Immunol* 1999;11:283-92.
- 100 Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 System of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
- 101 Lertmemongkolchai G, Cai G, Hunter CA, Bancroft GJ. Bystander activation of CD8<sup>+</sup> T cells contributes to the rapid production of IFN- $\gamma$  in response to bacterial pathogens. *J Immunol* 2001;166:1097-105.
- 102 Lewis DB. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr Opin Immunol* 2002;14:644-51.
- 103 Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunolgy Today* 1995;16:34-8.

- 104 Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999;274:33419-25.
- 105 Link C, Gavioli R, Ebensen T, Canella A, Reinhard E, Guzmán CA. The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *Eur J Immunol* 2004;34:899-907.
- 106 Löhning M, Stroehmann A, Levinson D, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6930-5.
- 107 Loleit M, Deres K, Wiesmüller KH, Jung G, Eckert M, Bessler WG. Biological activity of the *Escherichia coli* lipoprotein: detection of novel lymphocyte activating peptide segments of the molecule and their conformational characterization. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1994;375:407-12.
- 108 London CA, Lodge MP, Abbas AK. Functional responses and costimulator dependence of memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2000;164:265-72.
- 109 Macatonia SE, Hsieh CS, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4<sup>+</sup> T cells from  $\alpha\beta$  TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN- $\gamma$  production is IFN- $\gamma$ -dependent. *Int Immunol* 1993;5:1119-28.
- 110 Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 1995;154:5071-9.
- 111 Matsumoto M, Nishiguchi M, Kikkawa S, Nishimura H, Nagasawa S, Seya T. Structural and functional properties of complement-activating protein M161Ag, a

Mycoplasma fermentans gene product that induces cytokine production by human monocytes. *J Biol Chem* 1998;273:12407-14.

112 Matyniak JE, Reiner SL. T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. *J Exp Med* 1995;181:1251-4.

113 McCurdy JD, Olynych TL, Maher LH, Marshall JS. Cutting edge: Distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol* 2003;170:1625-9.

114 Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295-8.

115 Melchers F, Braun V, Galanos C. The Lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B- lymphocyte mitogen. *J Exp Med* 1975;142:473-82.

116 Mesa C, Fernández L. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2004;82:644-50.

117 Metzger J, Wiesmüller KH, Schade R, Bessler WG, Jung G. Synthesis of novel immunologically active tripalmitoyl-S-glycerylcysteinyl lipopeptides as useful intermediates for immunogen preparations. *Int J Pept Protein Res* 1991;37:46-57.

118 Metzger JW, Beck-Sickinger AG, Loleit M, Eckert M, Bessler WG, Jung G. Synthetic S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteinyl peptides derived from the N-terminus of the cytochrome subunit of the photoreaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* enhance murine splenocyte proliferation. *J Pept Sci* 1995;3:184-90.

119 Mittenbühler K, Esche U, Heinevetter L, Bessler WG, Huber M. Lipopeptides: adjuvant activity in conventional and genetic immunisation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;37:193-200.

- 120 Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007;19:3-10.
- 121 Moingeon P, Haensler J, Lindberg A. Towards a rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 2001;19:4363-72.
- 122 Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1- specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415:536.
- 123 Montagutelli X. Effect of genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:S101-5.
- 124 Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM, Mühlradt PF. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur J Immunol* 2002;32:3337-47.
- 125 Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2 development. *Nat Immunol* 2000;1:199-205.
- 126 Mosmann TR, Coffman RL. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 1989;46:111.
- 127 Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996;17:138-46.
- 128 Moyle PM, Toth I. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. *Curr Med Chem* 2008;15:506-16.
- 129 Mühlradt PF, Kieß M, Meyer H, Süßmuth R, Jung G. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory Lipopeptide from

Mycoplasma fermentans acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 1997;185:1951-8.

130 Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Süßmuth R, Jung G. Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyohinis*. *Infect Immun* 1998;66:4804-10.

131 Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR<sup>lo</sup> thymocytes in vivo. *Science* 1990;250:1720-3.

132 Murphy KM. T lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol* 1998;10:226-32.

133 Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:933-44.

134 Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951-7.

135 Nembrini C, Abel B, Kopf M, Marsland BJ. Strong TCR signaling, TLR ligands, and cytokine redundancies ensure robust development of type 1 effector T cells. *J Immunol* 2006;176:7180-8.

136 Niedbala W, Wei XQ, Piedrafita D, Xu D, Liew FY. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. *Eur J Immunol* 1999;29:2498-505.

137 Nishiguchi M, Masumoto M, Takao T. *Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: Role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J Immunol* 2001;166:2610-6.

- 138 Notarangelo LD, Peitsch MC. CD40Lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol Today* 1996;17:511-6.
- 139 O'Garra A, Steinman L, Gijbels K. CD4<sup>+</sup> Tcell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1997;9:872-83.
- 140 O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogenous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8:275-83.
- 141 O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Disc* 2003;2:727-35.
- 142 Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 1998;10:259-64.
- 143 Okusawa T, Fujita M, Nakamura JI, et al. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacetylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* 2004;72:1657-65.
- 144 Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, et al. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med* 1995;182:1357-67.
- 145 Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25.
- 146 Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28:454-67.

- 147 Patel M, Xu D, Kewin P, et al. TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol* 2005;174:7558-63.
- 148 Peng SL. The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2006;3:87-95.
- 149 Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2004;22:307-28.
- 150 Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, et al. *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol* 1995;154:2866-77.
- 151 Re F, Strominger JL. Toll like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276:37692-9.
- 152 Reitermann A, Metzger J, Wiesmüller KH, Jung G, Bessler WG. Lipopeptide derivatives of bacterial lipoprotein constitute potent immune adjuvants combined with or covalently coupled to antigen or hapten. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1989;370:343-52.
- 153 Resch K, Bessler W. Activation of lymphocyte populations with concavalin A or with Lipopeptide from the outer cell wall of *Escherichia coli*. Correlation of early membrane changes with induction of macromolecular synthesis. *Eur J Biochem* 1981;115:247-52.
- 154 Reschner A, Moretta A, Landmann R, Heberer M, Spagnoli GC, Padovan E. The ester-bonded palmitoyl side chains of Pam3CysSerLys4 lipopeptide account for its powerful adjuvant activity to HLA class I-restricted CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2003;33:2044-52.

- 155 Revets H, Pynaert G, Grooten J, De Baetselier P. Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J Immunol* 2005;174:1097-03.
- 156 Riley JL, June CH. The CD28 Family: a T cell rheostat for therapeutic control of T cell activation. *Blood* 2005;105:13-21.
- 157 Rogers PR, Huston G, Swain SL. High antigen density and IL-2 are required for generation of CD4 effectors secreting Th1 rather than Th0 cytokines. *J Immunol* 1998;161:3844-52.
- 158 Rogers PR, Croft M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol* 1999;163:1205-13.
- 159 Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-57.
- 160 Romagnani S. Regulation of T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1357-66.
- 161 Rouse BT, Suvas S. Regulatory T cells and immunity to pathogens. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7:1301-9.
- 162 Ruedl C, Bachmann MF, Kopf M. The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand. *Eur J Immunol* 2000;30:2056-64.
- 163 Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Ann Rev Immunol* 2001;19:225-52.
- 164 Schijns VE, Haagmans BL, Wierda CM, et al. Mice lacking IL-12 develop polarized Th1 cells during viral infection. *J Immunol* 1998;160:3958-64.

- 165 Schijns VE. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:456-63.
- 166 Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479-90.
- 167 Schnare M, Barton GM, Holt A, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001;2:947-50.
- 168 Schulz O, Edwards AD, Schito M, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 2000;13:453-62.
- 169 Schweitzer AN, Sharpe AH. Studies using antigen-presenting cells lacking both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J Immunol* 1998;161:2762-71.
- 170 Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St. Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4<sup>+</sup> T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;176:1091-8.
- 171 Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4<sup>+</sup> T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10188-92.
- 172 Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-73.

- 173 Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 1994;179:299-304.
- 174 Seifert R, Schultz G, Richter-Freund M. Activation of superoxide formation and lysozyme release in human neutrophils by the synthetic lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>. *Biochem J* 1990;267:795-802.
- 175 Seya T, Matsumoto M. A lipoprotein family from *Mycoplasma fermentans* confers host immune activation through Toll-like receptor 2. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:901-6.
- 176 Sharpe AH, Freeman GJ. The B7/CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-26.
- 177 Shimizu T, Iwamoto Y, Yangahira Y, Kurimura M, Achiwa K. Mitogenic activity and the induction of tumor necrosis factor by lipopeptide analogs of the N-terminal part of lipoprotein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull* 1994;17:980-2.
- 178 Shortman K, Liu Y. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;2:151-6.
- 179 Shu U, Kuniwa M, Wu CY, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* 1995;25:1125-8.
- 180 Sieling PA, Chung W, Duong BT, Godowski PJ, Modlin RL. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *J Immunol* 2003;170:194-200.

- 181 Soong L, Xu JC, Grewal IS, et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* 1996;4:263-73.
- 182 Sousa CR, Hieny S, Scharon-Kersten T, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997;186:1819-29.
- 183 Spohn R, Buwitt-Beckmann U, Brock R, Jung G, Ulmer AJ, Wiesmüller KH. Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2--structure-activity relationships. *Vaccine* 2004;22:2494-9.
- 184 Steere AC, Sikand VK, Meurice F, et al. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Eng J Med* 1998;339:209-15.
- 185 Stirling RG, Chung KF. Future treatment of allergic diseases and asthma. *Br Med Bull* 2000;56:1037-53.
- 186 Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7:937-45.
- 187 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
- 188 Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001;13:933-40.
- 189 Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002;169:10-4.

- 190 Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Immunol* 1997;159:5956-63.
- 191 Terenzi F, Díaz-Guerra MJM, Casado M, Hrtelano S, Leoni S, Boscá L. Bacterial lipopeptides induce nitric oxide synthase and promote apoptosis through oxide- independent pathways in rat macrophages. *J Biol Chem* 1995;270:6017-21.
- 192 Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol* 2000;165:3804-10.
- 193 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:133-46.
- 194 Vogel LA, Noelle RJ. CD40 and its crucial role as a member of the TNFR family. *Semin Immunol* 1998;10:435-42.
- 195 Wang RF, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene* 2008;27:181-9.
- 196 Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-52.
- 197 Wei XQ, Charles IG, Smith A, et al. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995;375:408-11.
- 198 Weigt H, Mühlradt PF, Emmendorffer A, Krug N, Braun A. Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. *Immunobiology* 2003;207:223-33.

- 199 Weis JJ, Ma Y, Erdile LF. Biological activities of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: dependence on lipid modification. *Infect Immun* 1994;62:4632-6.
- 200 Wenner CA, Guler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 1996;156:1442-7.
- 201 Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 2004;111:41-52.
- 202 Weyer KA, Schäfer W, Lottspeich F, Michel H. The cytochrome subunit of the photosynthesis reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* is a Lipoprotein. *Biochemistry* 1987;26:2909-14.
- 203 Wiesmüller KH, Bessler WG, Jung G. Synthesis of the mitogenic S-[2,3-bis(palmitoyloxy)propyl]-N-palmitoylpentapeptide from *Escherichia coli* lipoprotein. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1983;364:593-606.
- 204 Wilde I, Lotz S, Engelmann D, et al. Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes. *Med Microbiol Immunol* 2007;196:61-71.
- 205 Wohlleben G, Erb KJ. Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol* 2001;22:618-26.
- 206 Wu HC, Tokunaga M. Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986;125:127-57.

- 207 Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008;28:29-39.
- 208 Xu D, Chan WL, Leung BP, et al. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998;188:1485-92.
- 209 Yin Z, Braun J, Neure L, et al. T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines. *Arthritis Rheum* 1997;40:69-79.
- 210 Yip HC, Karulin AY, Tary-Lehmann M, et al. Adjuvant-guided Type-1 and Type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines class of response. *J Immunol* 1999;162:3942-9.
- 211 Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998;161:3400-7.
- 212 Yssel H., Shanafelt MC, Soderberg C, Schneider PV, Anzola J, Peltz G. *Borrelia burgdorferi* activates a T Helper Type-1 like T cell subset in Lyme arthritis. *J Exp Med* 1991;174:593-601.

## **DANKSAGUNG**

Mein Dank gebührt an erster Stelle Carmen Infante-Duarte und Thomas Kamradt für ihre absolut unentbehrliche und geduldige praktische sowie theoretische Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für den Austausch und die sehr gute Stimmung danke ich der Arbeitsgruppe Kamradt am DRFZ, insbesondere: Orissa Bender, Johannes Falk, Jane Grogan, Bert Meier, Christian Meisel, Marc Molinger und Axel Nogai.

Allen Mitarbeitern des DRFZ habe ich für die immer freundliche Hilfsbereitschaft zu danken.

Herrn Karl-Heinz Wiesmüller gebührt Dank für die Bereitstellung der Lipopeptide.

Meinen Eltern, Christa und Nader Ahmadi, und meinem Bruder, Christoph, für ihre Liebe und ihren Beistand und ihre Geduld.

Meinem Großvater, Hans Neumann, in liebevollem Gedenken.

Und meiner Frau Tine dafür, dass sie das Allerwichtigste ist.

## **LEBENS LAUF**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## ERKLÄRUNG

„Ich, Michael Ahmadi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Synthetische Lipopeptide: Adjuvanzeigenschaften unter strukturellen Aspekten *in vitro*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 03.05.2009

Michael Ahmadi