

Analyse der Beteiligung von Toll-like Rezeptoren an der DC-Aktivierung nach Parvovirus H-1 Infektion

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Maike Sieben

geb. am 23.10.1978 in Mainz

Mainz 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2012

Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es die funktionelle Rolle der Toll-like Rezeptoren (TLRs) und ihrer Signalwege bei der Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) durch Parvovirus H-1 (H-1PV) induzierte Tumorzelllysate (TCL) zu untersuchen.

Das angeborene Immunsystem bekämpft die Bildung und das Wachstum von Tumoren, insbesondere durch Interaktion von Effektor-Immunzellen mit Tumorzellen. Die Aktivierung dieser Immunreaktionen in der Antitumortherapie ist wünschenswert, aber in vielen Situationen nicht zufriedenstellend, da sie durch klassische systemische Therapie allein nicht immer erreicht werden kann. Die therapeutische Anwendung von onkolytischen Viren bei Patienten mit malignen Erkrankungen (Virotherapie) ist ein vielversprechendes Gebiet der Forschung. Die onkosuppressive und immunstimulierende Wirkung von H-1PV auf humane Tumor- und Immunzellen spricht für eine Verwendung in der Krebstherapie. Eine Aktivierung des Immunsystems durch H-1PV konnte bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden.

In dieser Arbeit wurden wichtige Aspekte bezüglich der Aktivierung von Toll-like Rezeptoren bei einer H-1PV Infektion untersucht. Zunächst wurde die Rolle von TLRs nach der H-1PV Infektion untersucht. Humane embryonale Nierenzellen (HEK293) wurden stabil mit humanen TLRs transfiziert, um die Rolle spezifischer TLRs während der Aktivierung des Immunsystems zu untersuchen. TLR3 und TLR9 wurden durch eine H-1PV Infektion, die mit der NF κ B-Translokation in den Zellkern korreliert, aktiviert. Mit Hilfe eines Reporterplasmides (pNiFty-Luc), wurde durch erhöhte Expression eines NF κ B-induzierbaren Reportergens die NF κ B-Aktivität im Anschluss an eine H-1PV Infektion nachgewiesen. Zudem wurde die immunologische Wirkung von H-1PV-induzierten Tumorzelllysaten (TCL) auf die humane antitumor-gerichtete Immunantwort analysiert. Ein humanes *ex vivo*-Modell, bestehend aus einer HLA-A2-positiven humanen Melanom-Zelllinie (SK29Mel) wurde verwendet, um Immunreaktionen mit entsprechenden HLA-restringierten humanen DCs zu untersuchen. DCs die mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen koinkubiert wurden, zeigten eine erhöhte TLR3- und TLR9-Expression. Diese Daten deuten darauf hin, dass H-1PV-induzierte TCLs humane DCs stimulieren und dies zumindest teilweise durch TLR-abhängige Signalwege geschieht. Demnach wird eine DC-Reifung durch Kokultur mit H-1PV-induzierten TCLs über den TLR-Signalweg erreicht und führte u.a. zu einer NF κ B-abhängigen Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Die onkolytische Virotherapie mit H-1PV erhöht so durch unterschiedliche Auswirkungen auf DCs die Immunreaktion und verstärkt die Anti-Tumor-Immunität. Diese Ergebnisse zeigen einen neuen potenziellen Ansatz für den Einsatz onkolytischer Viren für TLR-zielgerichtete Therapieoptionen und stellen eine ideale Möglichkeit zur Erweiterung der Krebsbehandlung dar.

Summary

The aim of this thesis was to investigate the functional role of Toll-like receptors (TLRs) and their signaling pathways in activation of dendritic cells (DC) by parvovirus H-1 (H-1PV)-induced tumor cell lysates.

The innate immune system combats the formation and growth of tumors, mainly relying on the interaction of effector immune cells with tumor cells. The implementation of these immune reactions into antitumor therapy is desirable but in many situations cannot be satisfactorily achieved through classical systemic therapy alone. The therapeutic use of oncolytic viruses in patients with malignancy (virotherapy) is a promising area of investigation. The oncosuppressive and immune-stimulating effect in the mode of action of H-1PV infection in human tumor cells makes it an attractive candidate for use in cancer therapy. An activation of the immune system by H-1PV could already be demonstrated in our working group.

This work examined important aspects regarding the activation of Toll-like receptors in H-1PV infection. Firstly the role of TLR activation following H-1PV infection was characterized. Human embryonic kidney cells (HEK293) transfected to stably express TLRs were used to further investigate the role of specific TLRs during immune activation. TLR3 and TLR9 were activated by H-1PV infection, which correlated with NF κ B translocation to the nucleus. Using a reporter plasmid (pNiFty-Luc), NF κ B activity, assessed by increased expression of an NF κ B-inducible reporter gene, was increased following H-1PV infection.

Secondly the immunologic effects of H-1PV induced tumor cell lysates (TCL) on human antitumor immune responses were evaluated. A human *ex vivo* model, HLA-A2-positive human melanoma cell line (SK29Mel) was used to study immune responses with corresponding HLA-restricted human dendritic cells (DCs). DCs cocubated with H-1PV-infected SK29Mel cells demonstrated increased TLR3 and TLR9 expression. These data suggest that H-1PV-induced TCLs stimulate human DCs at least in part through TLR dependent signaling pathways. Thus, DC maturation occurred through exposure to H-1PV-induced TCLs through TLR-signaling leading to NF κ B-dependent activation of the adaptive immune system.

Thus H-1PV oncolytic virotherapy enhances immune priming by different effects on DCs and generates antitumor immunity. The selective activation of dendritic cells through therapeutic targeting of TLRs could increase the activation of anti-tumor immune responses.

These results indicate a potential new approach for the use of oncolytic viruses for TLR-targeted therapy and offer a potentially new approach for the expansion of tumor therapy.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| Zusammenfassung | 3 |
| Summary | 4 |
| INHALTSVERZEICHNIS | 5 |
| 1 EINLEITUNG | 9 |
| 1.1 Autonome Parvoviren..... | 9 |
| 1.1.1 Taxonomie | 9 |
| 1.1.2 Parvovirus H-1 | 10 |
| 1.1.3 Genomorganisation | 12 |
| 1.1.4 Parvovirale Proteine | 14 |
| 1.1.5 Onkotropismus und Onkosuppression..... | 15 |
| 1.2 Parvovirus und Immuntherapie | 17 |
| 1.2.1 Rekombinante Viren zur Krebs-Gentherapie..... | 17 |
| 1.2.2 Autonome Parvoviren in der onkolytischen Therapie | 18 |
| 1.2.3 Immuntherapie von Tumorerkrankungen..... | 18 |
| 1.2.4 Tumor-Escape-Mechanismen..... | 19 |
| 1.2.5 Immuntherapie von malignen Erkrankungen | 21 |
| 1.3 Das humane Immunsystem | 22 |
| 1.3.1 Allgemein | 22 |
| 1.3.2 Das angeborene Immunsystem | 24 |
| 1.3.3 Das adaptive Immunsystem | 26 |
| 1.3.4 Dendritische Zellen | 28 |
| 1.3.5 Toll-like Rezeptoren | 32 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 40 |
| 2 MATERIAL | 41 |
| 2.1 Lösungsmittel und Chemikalien | 41 |
| 2.1.1 Lösungsmittel p.a..... | 41 |
| 2.1.2 Chemikalien | 41 |
| 2.1.3 Zytokine | 42 |
| 2.1.4 TLR-Liganden und Inhibitoren, NFκB-Inhibitor | 43 |
| 2.2 Zelllinien | 43 |
| 2.3 Virusstamm | 44 |
| 2.4 Plasmide | 44 |
| 2.4.1 Restriktionsenzyme | 44 |
| 2.5 Primer..... | 44 |
| 2.6 Antikörper..... | 45 |
| 2.6.1 Primärantikörper | 45 |
| 2.6.2 Sekundärantikörper | 45 |
| 2.7 Größenstandards | 46 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.1 | DNA-Längenstandards | 46 |
| 2.7.2 | Protein-Molekulargewichtstandard | 46 |
| 2.8 | Medien, Puffer und Lösungen | 47 |
| 2.8.1 | Medien für Zellkultur | 47 |
| 2.8.2 | Puffer und Lösungen | 47 |
| 2.9 | Verbrauchsmaterialien | 49 |
| 2.10 | Geräte | 50 |
| 3 | METHODEN | 52 |
| 3.1 | Zellbiologische Methoden | 52 |
| 3.1.1 | Kultivierung von Zellen | 52 |
| 3.1.2 | Kryokonservierung | 52 |
| 3.1.3 | Auftauen von Zellen | 53 |
| 3.1.4 | Bestimmung der Zellzahl | 53 |
| 3.1.5 | Methoden zur Bestimmung zytotoxischer Effekte | 53 |
| 3.1.6 | Dendritische Zellen | 54 |
| 3.1.7 | Kokultur | 56 |
| 3.2 | Virologische Methoden | 56 |
| 3.2.1 | Infektion von adhärenenten Zellen | 56 |
| 3.2.2 | Stimulationsexperimente mit TLR-Liganden | 56 |
| 3.3 | Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden | 57 |
| 3.3.1 | Präparation, Analyse und Modifikation von DNA | 57 |
| 3.3.2 | Stabile Transfektion von Plasmid DNA nach der CaPO ₄ -Methode | 58 |
| 3.3.3 | Transiente Transfektion | 60 |
| 3.3.4 | Genreporterassay | 60 |
| 3.3.5 | Extraktion von RNA | 61 |
| 3.3.6 | DNA-Gelelektrophorese | 62 |
| 3.3.7 | Nachweis von Nukleinsäuren | 63 |
| 3.3.8 | Primersynthese | 63 |
| 3.3.9 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 63 |
| 3.3.10 | Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) | 65 |
| 3.4 | Biochemische Methoden | 66 |
| 3.4.1 | Präparation und Analyse von Proteinen | 66 |
| 3.4.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford | 67 |
| 3.4.3 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 68 |
| 3.4.4 | Protein Transfer (Western Blot) | 69 |
| 3.4.5 | Western Blot Analyse | 69 |
| 3.5 | Immunologische Methoden | 70 |
| 3.5.1 | FACS-Analyse | 70 |
| 3.5.2 | Bestimmung des Ausreifungsgrades von dendritischen Zellen | 72 |
| 3.5.3 | Bestimmung der TLR- und NFκB-Expression | 72 |
| 3.6 | Nachweis der Zytokinproduktion mittels ELISA | 72 |
| 4 | ERGEBNISSE | 74 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1 | Etablierung einer PCR mit humanen TLR-Primern zur Überprüfung der TLR-Expression | 74 |
| 4.2 | Generierung stabiler Zelllinien, die einzelne humane TLRs exprimieren | 77 |
| 4.2.1 | Stabile Transfektion einzelner humaner TLR-Plasmide in HEK293 Zellen | 77 |
| 4.2.2 | Überprüfung der TLR-Plasmid-DNA | 78 |
| 4.3 | Charakterisierung der TLR-transfizierten Zelllinie HEK293 unter Einfluss einer Infektion mit Parvovirus H-1 | 80 |
| 4.3.1 | Analyse der Viabilitätsrate transfizierter und nicht-transfizierter Zellen | 80 |
| 4.3.2 | Einfluss von TLR-Liganden und dem Parvovirus H-1 auf die Zellvitalität | 82 |
| 4.4 | A 84 | |
| 4.4.1 | Untersuchung der TLR-Expression auf RNA-Ebene | 84 |
| 4.4.2 | Überprüfung der TLR-Expression in HEK293 Zellen | 84 |
| 4.5 | Stimulationsexperimente mit TLR-Liganden und Infektion mit H-1PV | 87 |
| 4.5.1 | Untersuchung der TLR9- und TLR3-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten mittels PCR | 87 |
| 4.5.2 | Untersuchung der TLR-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten mittels FACS-Analyse | 89 |
| 4.6 | Untersuchung der Signaltransduktion | 92 |
| 4.6.1 | Nachweis der NFκB-Translokation in HEK293 Zellen nach Infektion mit Parvovirus H-1 mittels Western Blot | 92 |
| 4.6.2 | NFκB-Expressionsanalysen mittels FACS | 95 |
| 4.6.3 | Aktivität des NFκB-Luciferase-Reportergens in HEK293 Zellen nach Infektion mit Parvovirus H-1 mittels Luciferase-Assay | 97 |
| 4.7 | Untersuchung der IκB-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten | 99 |
| 4.8 | Analyse dendritischer Zellen | 100 |
| 4.8.1 | Analyse der Expression von Oberflächenproteinen auf DCs | 100 |
| 4.8.2 | Untersuchung der TLR9- und TLR3-Expression in DCs | 102 |
| 4.9 | Expressionsanalysen in DC nach Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel | 103 |
| 4.9.1 | Bestimmung der TLR-Expression in DC nach Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel | 103 |
| 4.9.2 | NFκB-Expression in DC-Kokulturversuchen | 105 |
| 4.9.3 | Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF-α in DC-Kokulturversuchen | 106 |
| 4.10 | Untersuchung der HMGB1-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten | 107 |
| 5 | DISKUSSION | 109 |
| 5.1 | Einfluss der H-1PV Infektion auf Toll-like Rezeptoren | 112 |
| 5.1.1 | TLR-Transfektion | 112 |
| 5.1.2 | Zytotoxizität des H-1PV in TLR-transfizierten Zellen | 112 |
| 5.1.3 | TLR-Expression in transfizierten Zellen nach H-1PV Infektion | 113 |
| 5.1.4 | Induktion und Translokation von NFκB nach der Infektion mit H-1PV | 114 |
| 5.1.5 | IκB-Expression nach H-1PV Infektion | 116 |
| 5.1.6 | Gesteigerte HMGB1-Expression nach H-1PV Infektion | 117 |
| 5.2 | Einfluss der H-1PV Infektion nach Kokulturversuchen mit Dendritischen Zellen | 119 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.1 | Gesteigerte Expression des Oberflächenmarkers CD86 auf DCs nach Stimulation mit TLR-Liganden | 119 |
| 5.2.2 | Gesteigerte TLR-Expression in DCs nach der Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel | 120 |
| 5.2.3 | H-1PV-infizierte SK29Mel Zellen induzieren Produktion proin-flammatorischer Zytokine in DCs | 123 |
| 5.3 | H-1PV als therapeutischer Ansatz in der Tumormedizin | 125 |
| 5.4 | Schlussfolgerung..... | 128 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 131 |
| | Danksagung | 140 |
| | Abbildungsverzeichnis | 141 |
| | Tabellenverzeichnis | 143 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 144 |
| | Veröffentlichungen..... | 146 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 148 |

EINLEITUNG

1.1 Autonome Parvoviren

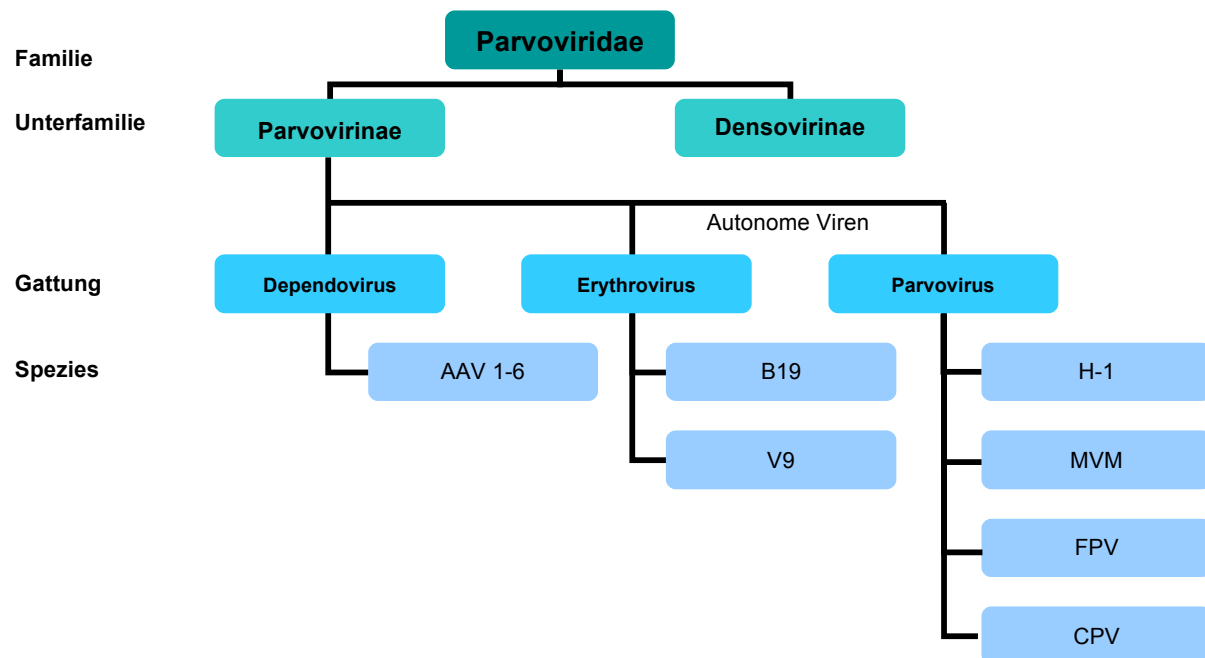


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Parvoviridaestammbaums

1.1.1 Taxonomie

Die Familie der Parvoviridae wird in zwei Unterfamilien gegliedert: *Parvovirinae*, die in der Lage sind Vertebraten zu infizieren und *Densovirinae*, die Insekten als Wirt nutzen. Im Folgenden wird auf die *Parvovirinae* näher eingegangen. *Parvovirinae* sind weit verbreitete Viren und kommen bei praktisch allen Tierarten und beim Menschen vor. Sie lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Parvovirus, Erythrovirus und Dependovirus.

Dependoviren benötigen für ihren Infektionszyklus sogenannte Helferviren, zum Beispiel Adenoviren oder Herpes Simplex Viren. Vertreter dieser helfervirusabhängigen Gruppe sind die in sechs Serotypen vorliegenden Adeno-assoziierten Viren (AAV). In Abwesenheit des Helfervirus können Dependoviren in das Wirtszellgenom integrieren und somit eine latente Infektion der Wirtszelle erzeugen [1].

Bei den Viren der Gattung Parvovirus und den Erythroviren handelt es sich um autonom replizierende Viren. Sie sind selbständig in der Lage Zellen zu infizieren und können sich ohne Helfervirus replizieren. Die Integration des Wirtszellgenoms von autonomen Parvoviren ist nicht bekannt [2].

Autonome Parvoviren sind stark auf das Vorhandensein von zellulären Faktoren angewiesen, deren Expression eng mit der Proliferation und Differenzierung der Zelle assoziiert ist [3]. Zur Produktion von Nachkommenviren werden Zellfunktionen benötigt, die während der S-Phase des Zellzyklus zur Verfügung stehen, wie z.B. die zelluläre DNA-

Polymerase δ [4]. Erythroviren charakterisieren sich durch ihren Tropismus für erythroide Vorläuferzellen [5]. Die zwei humanpathogenen Viren B19 und V9 verursachen verschiedene hämatologische Funktionsstörungen bei Immunsupprimierten, Kindern oder Schwangeren [6, 7], wie z.B. die durch B19 hervorgerufene Erythema infectiosum (Ringelröteln).

Autonome Parvoviren der Gattung Parvovirus lassen sich aufgrund ihrer Wirtsspezifität in mehrere Untergruppen unterteilen. Man unterscheidet zwischen dem Hundeparvovirus CPV (Canine Parvovirus), Katzenparvovirus FPV (Feline Parvovirus), Parvovirus des Schweins PPV (Porcine Parvovirus), Nerzparvovirus ADV (Aleutian Mink Disease Virus), Rinderparvovirus BPV (Bovine Parvovirus), die Rattenparvoviren KRV (Kilham Rat Parvovirus) und H-1 sowie die Mausparvoviren MPV (Mouse Parvovirus) und MVM (Minute Virus of Mice). Von großem Interesse sind die autonomen Nagerparvoviren MVM und H-1, da sie in der Lage sind nicht nur Zellen ihres natürlichen Wirtes den Nagern zu infizieren, sondern auch verschiedene humane Zellen. Darüber hinaus sind sie im Menschen kaum pathogen und bieten sich somit für eine potentielle Applikation zu therapeutischen Zwecken an.

Das Parvovirus H-1 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Klassifikationskriterien

Nukleinsäure

Kapsidsymmetrie

nicht umhüllt (naked) oder umhüllt (enveloped)

Genomarchitektur

Baltimoreklassifizierung

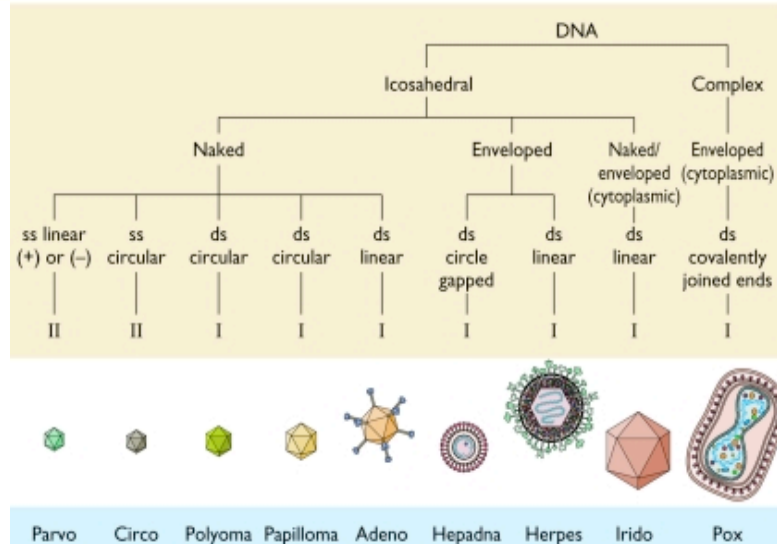


Abbildung 2: Klassifikationskriterien der Viren (verändert nach: <http://wenliang.myweb.uga.edu/mystudy/virology/ScienceOfVirology/virusclassificationandnomenclature.html>)

1.1.2 Parvovirus H-1

Die aus der Familie der Parvoviridae stammenden autonomen Parvoviren gehören zu den kleinsten Vertretern unter den Viren (*parvus*, lateinisch: klein) und sind ca. 20-25 nm groß. Das virale Genom liegt als einzelsträngige lineare DNA (ssDNA=single stranded DNA) mit

einer Länge von 5176 Nukleotiden vor und wird von einem nicht-umhüllten, ikosaedrischen Viruskapsid mit einem Durchmesser von 18-26 nm umschlossen.

Erstmals wurden Parvoviren, unter anderem das Parvovirus H-1, in den sechziger Jahren aus Tumorgewebe, Tumorzelllinien und mit Karzinogenen behandelten Versuchstieren isoliert [8]. Aus normalem Gewebe war eine Isolation nicht möglich. Deshalb wurde vermutet, dass Parvoviren onkogene Eigenschaften, wie sie z.B. bereits für Papillomviren beschrieben waren, besäßen [9]. Da eine Parvovirusinfektion von Versuchstieren nicht in einem erhöhten Risiko für eine Krebserkrankung resultiert, konnte die irrtümliche Interpretation der Viruspräsenz in Tumorgeweben bald widerlegt werden [10]. Es konnte sogar die Hemmung von Tumorentstehung und -wachstum in den infizierten Tieren beobachtet werden [11].

In serologische Studien konnte gezeigt werden, dass H-1PV Ratten infiziert und diese somit der natürliche Wirt sind [12]. Eine Infektion durch das Parvovirus H-1 verläuft in Nagetieren in der Regel subklinisch. Schwere durch das Parvovirus H-1 verursachte Krankheitsbilder werden lediglich in Feten und neugeborenen Tieren beobachtet (Enteritis, Hepatitis, zerebelläre Hypoxie und Ataxie, Wachstumsverzögerungen, Niereninfarkte, hämorrhagische Organinfarkte, Tod) [13]. Letale Infektionen verursacht durch H-1PV werden in neugeborenen Hamstern und Ratten [14] besonders nach intrauteriner oder neonataler Infektion beobachtet. Dies beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die Zellen sich in diesem Entwicklungsstadium oft teilen (ähnlich wie Tumorzellen) und so empfänglich für die zytopathische Wirkung des Virus sind.

H-1PV ist in der Lage sich zusätzlich zu seinen Nagetierwirtszellen auch in humanen transformierten Zellen oder Tumorzelllinien zu replizieren. Untersuchungen haben gezeigt, dass H-1PV nach einer i.m Injektion im Menschen proliferieren kann aber keine Krankheitssymptome auftraten und sie nicht direkt vernichtet wurden, da bei der Anwesenheit von Nagerviren keine Immunität besteht. Die Infektion beim Menschen kann bisher mit keinem Krankheitsbild in einen Zusammenhang gebracht werden und verläuft klinisch stumm [15]. Nach Infektion kommt es zur Virämie mit anschließender Serokonversion. Nur bei einem sehr geringen Teil der Bevölkerung kann ein positiver Antikörpertiter gegen das Parvovirus H-1 nachgewiesen werden [16]. Dabei bedingt die Antikörperbildung nicht immer ein Ende der Infektion [17, 18]. Aufgrund seiner Apathogenität im Menschen und den bereits erwähnten Vorzügen (Onkosuppression, Onkolyse) stellt es eine vielversprechende Basis für einen gentherapeutischen Vektor dar [17, 19].

Das Mausvirus MVMp und das Ratten H-1 Virus sind nah miteinander verwandt. MVMp, der fast apathogene Prototyp von MVM, ist das am besten charakterisierte Parvovirus. Es wird daher in präklinischen Studien, die in der Regel im Maus- und Rattenmodell stattfinden eingesetzt. Zudem konnten bereits Erfolge der H-1PV-Therapie in Rattenglioma-Modellen und humanen Glioma-Modellen erzielt werden, die in einem verbesserten Überleben

resultieren [20]. In 2011 wurde außerdem eine klinische Phase/IIa-Studie zur Behandlung von fortgeschrittenen primären oder rezidivierenden Glioblastomen mit H-1PV gestartet [21].

1.1.3 Genomorganisation

Der Aufbau der Viruspartikel der verschiedenen Subfamilien ist generell gleich. Das Kapsid ist ikosaedrisch und hat einen Durchmesser von 18-26 nm. Es besitzt keine Hülle [22]. Das parvovirale Genom ist von einem Proteinmantel umgeben. Die viralen Kapsidproteine (VP, viral proteins) gibt es je nach Virus-Spezies in zwei bis vier verschiedene Arten. Bei Parvovirus H-1 und im MVMp setzt sich das Kapsid aus 3 Kapsidproteinen zusammen (VP1 (83-86 kDa), VP2 (64-66 kDa), VP3 (60-62 kDa)) [23]. Das parvovirale Genom besteht aus zwei großen überlappenden offenen Leserastern (open reading frames (ORF)) mit jeweils einem Promotor. Die parvovirale Genexpression wird von den Promotoren P4 und P38 gesteuert. Die Aktivität des frühen Promotors P4, der die Transkription der regulatorischen Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 reguliert ist S-Phase abhängig [24, 25]. Zusätzlich kann P4 durch Onkogene stimuliert werden. So lassen sich teilweise erhöhten NS1 Proteinproduktionen in transformierten gegenüber nicht transformierten Zellen erklären [26]. Der späte Promotor P38 kontrolliert die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2 (VP: viral protein) und wird durch NS1 transaktiviert [27]. Bevor also die für die Virusproduktion benötigten Kapside produziert werden können, muss zunächst NS1 synthetisiert werden, was wiederum vom Zellzyklus des Wirts abhängt. Somit ist die Transkription gut kontrolliert. Die einzelsträngige DNA ist komplementär zu den Transkripten und meist negativer Polarität. Sie wird an beiden Seiten des DNA-Stranges von zwei Palindromen abgegrenzt, die für die Replikation als Primer zur Verfügung stehen und als ITR-Regionen (inverted terminal repeats) bezeichnet werden [28]. Die ITR-Regionen können stabile Y- (3'-Ende) bzw. T-förmige (5'-Ende) doppelsträngige Sekundärstrukturen, sogenannte Haarnadelschleifen (*hairpin*-Strukturen) bilden. Die terminalen Strukturen beinhalten cis-aktive Sequenzen, die zur Replikation und Verpackung der viralen DNA benötigt werden [29]. Das rechte Ende des DNA-Stranges beinhaltet Polyadenylierungs-Signale [30]. Mit der Adsorption des Viruspartikels an spezifische Oberflächenrezeptoren beginnt die parvovirale Infektion. Die genauen Rezeptoren von H-1PV sind nicht bekannt [31].

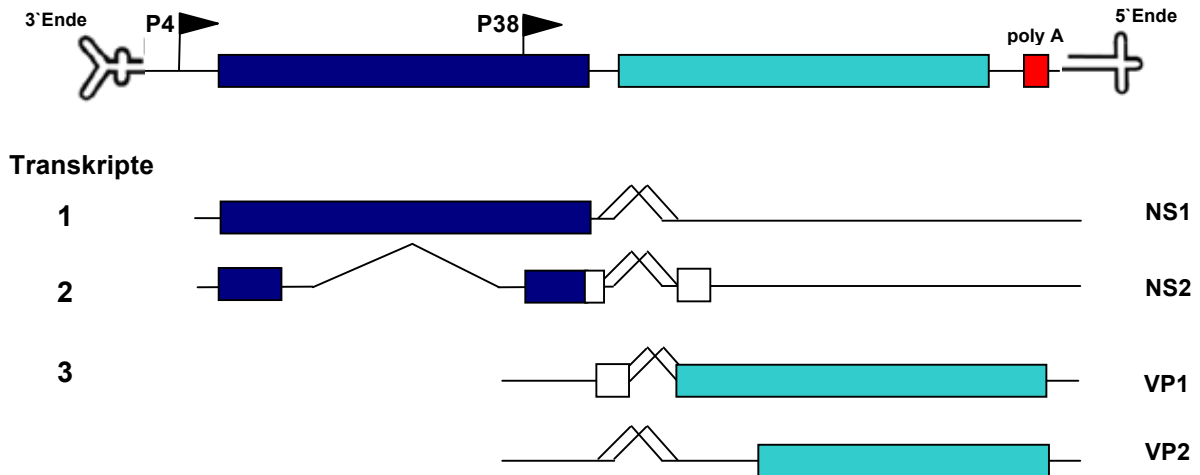


Abbildung 3: Das parvovirale Genom

An den Termini des 5,1 kB ss-linearen DNA-Genoms befinden sich ITR-Regionen, die Haarnadelstrukturen bilden. Zwei Leserahmen codieren für die Nichtstrukturellen Proteine (NS1+2) und die Kapsidproteine (VP1+2). Die Regulation der Transkription erfolgt über die Promotoren P4 und P38. Die Transkripte 1-3 sind unterhalb des Genomschemas dargestellt.

Für MVM wurde eine Bindung an Sialinsäurereste in der Membran beobachtet [18]. Weiterhin konnte der Transferrinrezeptor (CPV) sowie AAV2, ein Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor, als Parvo- bzw. Adenovirusbindungsstelle identifiziert werden [32].

Das H-1PV Genom benötigt für seine Replikation einen Replikationsapparat der Wirtszelle. Die Replikation findet im Zellkern statt, wobei die Virus-DNA nicht in das Wirtsgenom integriert wird. Nach dem Transport der Virionen in den Nukleus wird die ssDNA in doppelsträngige monomere Replikationsform (mRF) repliziert. Der Umbau ist S-Phase abhängig, so dass die Virusvermehrung allein in proliferierenden Zellen erfolgt [33]. Anschließend werden die Monomere NS1-abhängig in dimere Replikationsformen umgewandelt, aus der neue ssDNA-Ketten amplifiziert werden. Dazu werden zelluläre DNA-Polymerasen rekrutiert. Die an beiden Seiten des Genoms befindlichen *hairpin*-Strukturen (palindromische Sequenzen) dienen hierbei als Primer und so kann dann der ssDNA-Strang von 5` nach 3` vervollständigt werden. Die *hairpin*-Strukturen lagern sich zu komplementären ds (double stranded) DNA Bereich zusammen und dienen so als Primer für die DNA-Polymerase [34]. Die Virus-DNA lagert sich schließlich mit den Kapsidproteinen zusammen und bildet neue Viruspartikel, deren Freisetzung durch Lyse der Wirtszelle erfolgt [26, 27, 30]. Der Transkriptionsfaktor E2F initiiert die Transkription des für die Replikation notwendigen viralen Proteins NS1 [25]. Zusätzlich können zelluläre Onkogene wie *c-Ki-ras*, *c-myc*, *N-ras*, *Ha-ras* zu einer Aktivierung des P4 Promotors führen [35].

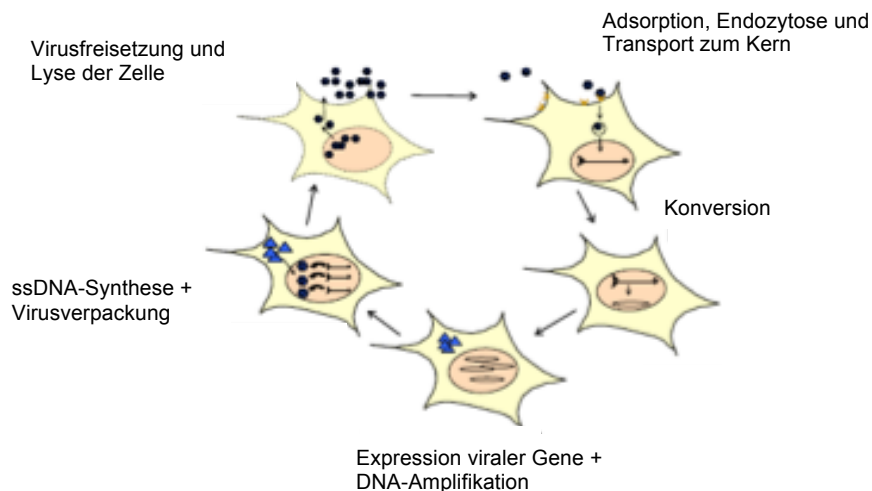


Abbildung 4: Parvoviraler Lebenszyklus

Die Viruspartikel werden über Endozytose in den zytoplasmatischen Raum aufgenommen und in den Kern transportiert. Hier erfolgt die Konversion, eine Umwandlung der einzelsträngigen Virus-DNA in eine doppelsträngige Form. Die DNA-Amplifikation und virale Genexpression erfolgt im Anschluss. Nach Synthese der einzelsträngigen viralen DNA und deren Verpackung werden durch Zelllyse die neu synthetisierten Viren freigesetzt.

1.1.4 Parvovirale Proteine

1.1.4.1 Die viralen Strukturproteine

VP2 ist das Hauptbestandteil des Kapsids, das Parvovirus-Kapsid besteht zu 90 % aus VP2 (68 kDa) und 10% aus VP1 (88 kDa) [23, 36]. VP1 und VP2 werden aufgrund einer Kernlokalisationssequenz im Nukleus zum Viruskapsid assoziiert. Die Kapsidierung neu entstandener Virus-DNA erfolgt durch VP2, VP1 hingegen ist für die Infektiosität verantwortlich [37]. Während der Infektion präsentieren permissive Zellen VP1-spezifische Epitope nach außen. Dies führt zur Initiierung des Transfers des viralen Genoms in den Zellkern. VP2 bestimmt unter anderem den Zelltropismus [38].

1.1.4.2 Die Nicht-Struktur-Proteine

Das Nicht-Struktur-Protein NS1 ist ein multifunktionelles Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 83 kDa, liegt sowohl in phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form vor [39] und besitzt eine Kernlokalisationssequenz die bei Infektion der Zelle zur Virusakkumulation im Zellkern führt [27]. NS1 ist für die parvovirale DNA-Replikation und Transkription in permissiven Zellen essentiell, da es die Replikation initiiert und den viralen Replikationszyklus über die Aktivierung der viralen Promotoren P4 und P38 steuert [24]. Durch die H-1PV Infektion und die folgende NS1-Expression werden Zytoskelettfilamente in Tumorzellen verändert was den Abbau von Aktinfasern zur Folge hat [40]. Zudem führt die NS1-Expression zu einem Anstieg von ROS, das mit DNA-Brüchen einhergeht und ist in der Lage sowohl Apoptose [41] als auch Nekrose [42] und einen Cathepsin B-abhängigen Zelltod auszulösen [43]. Demnach geht die zytotoxische Wirkung auf die Wirtszellen auf die

Auswirkungen der DNA-Spaltung, Suppression der Proteinphosphorylierung und Akkumulation von Zellen in der S-Phase mit nachfolgendem Wachstumsstopp und Apoptoseinduktion zurück.

Interessanterweise zeigen neoplastisch transformierte Zellkulturen eine größere Sensitivität gegenüber einer NS1-vermittelten Zytotoxizität als nicht-transformierte. Der Grund liegt möglicherweise in der erhöhten virale DNA-Replikation, NS1-Transkription und -Expression, was zu einer erhöhten NS1-Proteinanreicherung in Zellkultur führt [44]. In der S-Phase des Zellzyklus findet die Expression von NS1 statt. Sobald NS1 exprimiert wird, akkumulieren sich die infizierten Zellen in der S- und G2-Phase [45].

Das Nicht-Strukturprotein NS2 ist mit seinem 23-28 kDa Molekulargewicht das kleinere der Nichtstrukturproteine. Es ist wirtszellabhängig an einer effizienten Virusreplikation, Transkription, dem Aufbau neuer Kapside, der Aggregation infektiöser Viruspartikel und der Freisetzung neu produzierter Viren beteiligt. Für die Infektion humaner Zellen ist NS2 entbehrlich, hier ist NS1 ausreichend, um das Absterben sensibler Zellen zu induzieren [46].

1.1.5 Onkotropismus und Onkosuppression

Da das Parvovirus H-1 aus Tumorgewebe isoliert wurde und Isolationen aus normalem Gewebe nicht gelangen [47] wurde zunächst vermutet, dass es sich um Viren handelte die zur Tumorentstehung beitragen und onkogenes Potential besitzen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass das Gegenteil der Fall war und die Infektion der Parvoviren die Inzidenz spontaner, viraler oder chemisch induzierter sowie humaner Tumortransplantate in Versuchstieren reduzieren und hemmen können [11, 48].

Das Parvovirus H-1 ist demnach in der Lage einen als Onkosuppression bezeichneten Effekt zu vermitteln, der sich durch die onkotropen sowie onkolytischen Eigenschaften begründet und bei mehreren verschiedenen Tumorarten (Leukämien, Sarkomen, Karzinomen) bestätigt werden konnte [49, 50].

Als Onkolyse bezeichnet man die Tatsache, dass es nach parvoviraler Infektion präferentiell zur Lyse von transformierten Zellen kommt. Bei nicht-transformierten Zellen ist zwar eine Infektion mit dem Parvovirus H-1 möglich, allerdings zeigen die Zellen einen unvollständigen Replikationszyklus und es werden keine infektiösen Viruspartikel produziert [44].

Zur Analyse der Tumorsuppression eignen sich *in vitro* und *in vivo* transformierte Zellen. In transformierten Zellen verschiedener Zelllinien (Melanomzellen, Mammakarzinomzellen, Gliomzellen, Hepatomzellen) konnte gegenüber entsprechenden nicht-transformierten Zellen, eine erheblich höhere Parvovirus-Sensitivität beobachtet werden [51].

Eine Transformation durch virale bzw. zelluläre Onkogene (z.B. SV40 TAg, v-src, c-Ha-ras) macht Zellen permissiv für eine lytische Infektion und führt zu einer erhöhten Replikation des

parvoviralen Genoms sowie einer gesteigerten Expression der viralen Gene, gegenüber den nicht-transformierten Parentalzellen [52].

Der onkolytische Effekt ist zudem bei der Onkosuppression *in vivo* von großer Bedeutung [48]. Die Onkosuppression durch Parvoviren und das bevorzugte Auftreten in Tumoren bezeichnet man als Onkotropismus. Er definiert sich durch die vornehmliche Replikation in transformierten Zellen, Onkolyse hingegen bezeichnet die Zerstörung dieser Zellen.

Aufgrund ihrer geringen genetischen Komplexität sind Parvoviren für ihre Vermehrung und Genexpression von zellulären S-Phase-Proteinen abhängig [25, 33]. Sie sind im Gegensatz zu onkogenen DNA-Viren nicht in der Lage, die S-Phase in ruhenden Zellen zu induzieren [53]. Deshalb stellen transformierte Zellen ein günstiges Milieu für die Vermehrung von Parvoviren dar [11].

Ein große Anzahl verschiedener Studien belegen die onkosuppressiven Eigenschaften vieler autonomer Parvoviren, z.B. H-1PV, MVM, CPV, KRV [54].

Onkolytische Viren sind in der Lage kanzerös veränderte Zellen zu infizieren, sich in diesen Zellen zu replizieren und schließlich den Zelltod auszulösen [55]. Nichttransformierte Zellen hingegen werden nicht abgetötet. Für eine erfolgreiche Behandlung neoplastischer Zellen mit H-1PV ist auch die Empfänglichkeit der Zelle für den zytotoxischen Effekt von Bedeutung [54].

Der genaue Mechanismus des Onkotropismus konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Die Sensitivität für die Virusinfektion wird unter anderem durch den Transformationsstatus der Zelle beeinflusst. Außerdem ist die Induktion der viralen Promotoren durch bestimmte Faktoren des Zellzyklus und Onkogene von Bedeutung [44]. Ein weiterer Faktor, der den Onkotropismus beeinflusst, ist die Abhängigkeit von zellulären Faktoren, die für die virale Genexpression nötig sind, in normalen Zellen aber nicht vorhanden sind oder nicht in geeignetem Maße zur Verfügung stehen [54]. Hier sind vor allem die initialen Schritte der Virusreplikation von Faktoren der S-Phase des Zellzyklus in Tumorzellen abhängig [25, 33], somit geht der parvovirale Onkotropismus aus der S-Phasen-Abhängigkeit hervor.

Der onkotope Charakter der Parvoviren bietet die Möglichkeit durch den Einbau Zelltod-aktivierender Fremdgene noch verstärkt zu werden. Durch die Möglichkeit des gerichteten Gentransfers in transformierten Zellen zeichnen sich Parvoviren als Vektoren zur Genterapie von Krebs aus. Die bevorzugte Transgenproduktion in Krebszellen wird durch die Expression der parvoviralen Gene in transformierten Zellen ermöglicht.

Mithilfe therapeutischer Gene ist es möglich den durch NS1 ausgelösten zytotoxischen Effekt noch zu verstärken [56]. Zu einer gesteigerten Antitumoraktivität kommt es, wenn zusätzlich

gezielt zytotoxische Komponenten (z.B. Immunstimulantien, Toxine) über parvovirale Vektoren in humane Tumorzellkulturen eingebracht werden [57, 58]. In *ex vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Etablierung und das Wachstum von Tumoren gehemmt werden konnte, nachdem die Zellen mit einem entsprechenden Parvovirus infiziert wurden [57, 59, 60]. Die Verwendung solcher Vektoren kann also den zytotoxischen Effekt des Parvovirus noch verstärken.

Ein Beispiel dafür ist eine unter der Kontrolle des Promotors P38 stehende Expression des IL-2 Gens in transformierten humanen Fibroblasten zeigt die antitumorale Wirksamkeit rekombinanter Parvoviren [61]. Eine Sensibilisierung transformierter Fibroblasten und Melanozyten gegenüber Ganciclovir wurde durch den Einbau des HSV-tk-Gens in Parvoviren erreicht, so konnte eine Tumorsuppression *in vitro* erzielt werden [62]. Ebenso verstärkt der Einbau des tumorspezifischen apoptotischen Effektors Apoptin die zytotoxische Wirkung in transformierten Fibroblasten [58].

Der Mechanismus der induzierten Zytotoxizität durch das Parvovirus H-1 ist Gegenstand meiner Untersuchungen und wird in dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

1.2 Parvovirus und Immuntherapie

1.2.1 Rekombinante Viren zur Krebs-Gentherapie

Erste Untersuchungen mit onkolytischen Viren wurden in den 50er - 80er Jahren durchgeführt. Dabei wurden Viren (Mumps-, Masern-, Adenovirus, Newcastle Disease Virus, Semliki Virus, Vaccinia Virus, HSV-1, Reovirus) im Hinblick auf den sicheren und effizienten Einsatz im Menschen untersucht [55]. Viele Viren zeigten onkolytische Eigenschaften, allerdings gab es auch Neurotropismen [63]. Demnach war ein nächster Schritt die Entwicklung von Viren mit verbesserten onkoselektiven Eigenschaften, was durch gentechnische Veränderungen erreicht werden konnte. Die virale Gentherapie nutzt die Fähigkeit der Viren aus, Fremdgene in Zellen einzuschleusen und dort effizient zu exprimieren. Die Viren sind somit genetisch verändert und werden virale Vektoren genannt. Der Einsatz von viralen Vektoren kann für verschieden Ziele verwendet werden. Zum einen kann die Expression eines Gens dazu dienen ein defektes, körpereigenes Protein zu ersetzen oder zur Vakzinierung gegen Proteine von Pathogenen dienen. Eine weitere Methode ist das sogenannte „Gene targeting“, bei dem ein Gen durch Austausch der mutierten Sequenz gegen eine nicht-mutierte Sequenz korrigiert wird. Auch die Expression von Fremdgenen kann zur Behandlung von Krankheiten genutzt werden [64].

Bei der Entwicklung rekombinanter Viren gibt unterschiedliche Möglichkeiten, den viralen Vektor zu verändern. Dazu zählen die Deletion viraler Gene, z.B. Deletion der Thymidin-

Kinase (JX-594), so dass eine Infektion und Vermehrung in normalen Zellen nicht mehr möglich ist [65], die Insertion tumor- oder gewebspezifischer Promotoren wie dem tumorspezifischen E2F-Promotor (ONYX-411) oder Insertion von Suizidgenen [66].

1.2.2 Autonome Parvoviren in der onkolytischen Therapie

Das Parvovirus H-1 zieht Aufmerksamkeit als therapeutischer Vektor und Antikrebs-Agens auf sich, indem es für Menschen apathogen ist und sowohl onkotrope als auch onkosuppressive Eigenschaften hat. Zudem liefert die bevorzugte Expression parvoviraler Gene und der zytopathische Effekt in transformierten Zellen eine gute Möglichkeit für einen zielgerichteten Gentransfer in Krebszellen [44].

Klinische Phase I Studien an Patienten mit unterschiedlichen fortgeschrittenen Tumoren zeigten keine weiteren Befunde außer einer Virämie und einer Serokonversion [16]. Da autonome Parvoviren nicht in das Wirtszellgenom integrieren, kann das Risiko einer insertionellen Mutagenese ausgeschlossen werden. Somit zählen die rekombinante Parvoviren zu den sicheren Vektoren [67]. Demnach bietet das Parvovirus H-1 ein breites Wirtsspektrum und ermöglicht so eine große Bandbreite für Behandlungen.

1.2.3 Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Bereits im 19. Jahrhundert hat Paul Ehrlich den Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und Tumorerkrankungen erkannt. Er stellt die These auf, dass „die Zerstörung von spontan auftretenden Tumoren, die ständig und gehäuft auftreten, eine der Aufgaben des Immunsystems“ sei [68]. Auch Virchow hat die Verknüpfung zwischen Krebs und Entzündung, die Rolle des Immunsystems und der Tumorphathogenese untersucht. Später wurde von Burnet und Thomas [69, 70] die Hypothese aufgestellt, dass das Immunsystem an der Überwachung von Tumoren beteiligt ist und so eine Hauptrolle in der Abwehr von Krebserkrankungen einnimmt. Durch sie wurde der Begriff der Immunosurveillance geprägt. In der Immunosurveillance-Hypothese wird postuliert, dass das Immunsystem in der Lage ist maligne transformierte Zellen zu erkennen und abzutöten. Demnach spielt das Immunsystem bei der Kontrolle und Bekämpfung von Krebs eine bedeutende Rolle, was heute als gesichert gilt und in vielen *in vitro*- und *in vivo*- Untersuchungen verifiziert wurde [71].

Die Interaktion von Immunsystem und Tumoren ist auch durch das von Matzinger postulierte Danger-Modell beeinflusst. Hier gilt das Aussenden von so genannten Gefahrensignalen durch die transformierte Zelle (danger signals) als eine notwendige Voraussetzung für die Induktion einer Immunantwort [72].

Ein weiteres Modell [73] besagt, dass Zellen des angeborenen Immunsystems ausschlaggebend sind. Aufgrund der Tatsache dass Tumore aus gesunden proliferierenden

Zellen entstehen und normalerweise keine danger signals aussenden und mikrobielle Oberflächenstrukturen besitzen gelten sie diesen Theorien nach als nicht immunogen.

1.2.4 Tumor-Escape-Mechanismen

Tumorpatienten besitzen ein Immunsystem das Tumorzellen nicht effektiv erkennt und bekämpfen kann. Durch die Entwicklung verschiedener Überlebensstrategien haben Krebszellen eine Möglichkeit gefunden, der Immunantwort des Körpers zu entkommen.

Für die unzureichende Immunantwort gibt es mehrere Gründe. Dazu gehören sogenannte Immunescape-Mechanismen. Demnach ist ein progredientes Tumorwachstum das Ergebnis von den Kontrollmechanismen des Immunsystems entkommenden Tumorzellen. Tumorzellen können durch unterschiedliche Mechanismen einer antitumoralen Immunantwort ausweichen. Ein weiterer Mechanismus des Immune-Escapes ist die Sekretion von immunsupprimierenden Zytokinen wie z.B. IL-6, IL-10 und TGF- β durch die Tumorzelle und das Fehlen der Tumorantigensynthese [74] durch die eine Immunantwort blockiert werden kann (Abb. 5 A).

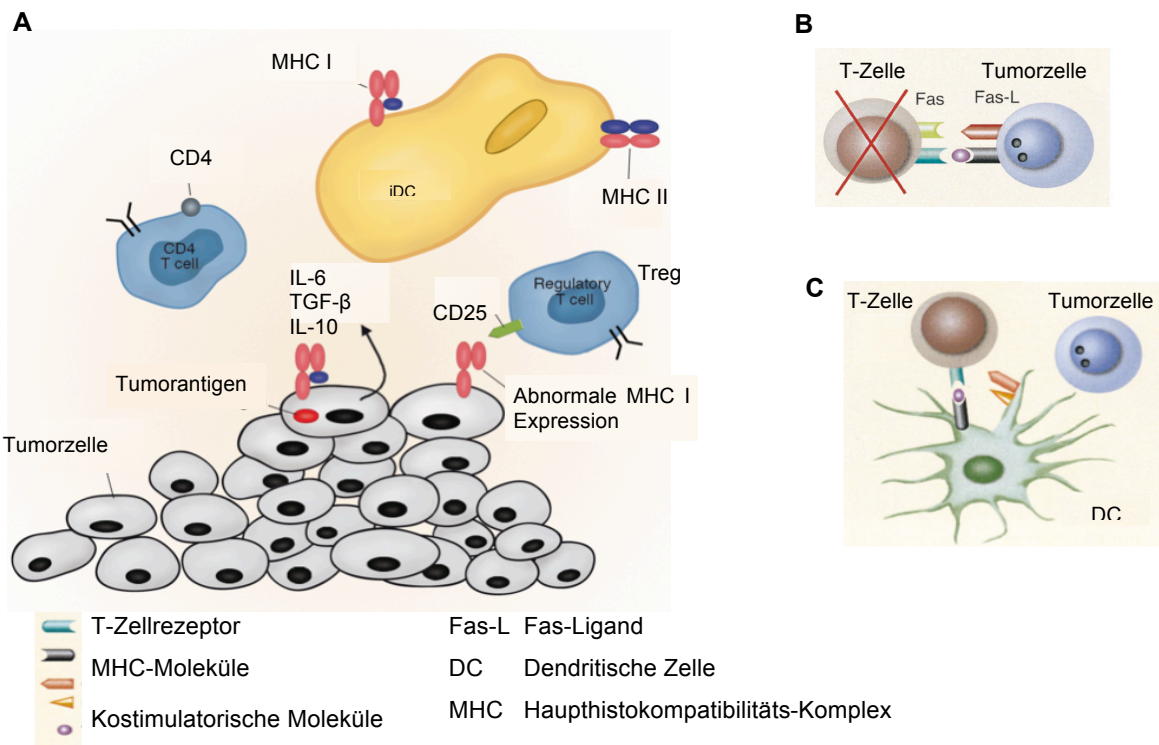


Abbildung 5: Tumor-Escape-Mechanismen (verändert nach: [74, 75])

Auch eine passive Umgehung der antitumoralen Abwehr kann von den Krebszellen erfolgen. Durch Modifikationen werden sie unkenntlich für Immunzellen gemacht und vermitteln so kein „danger“ Signal mehr. Dies geschieht auf verschiedene Weisen. Zum einen durch den Verlust tumoraler Antigene oder die Abnahme funktionstüchtiger MHC- (major histocompatibility complex) Moleküle zur Antigenpräsentation [76]. So verhindern die Krebszellen eine direkte Erkennung durch zytotoxische T-Zellen (CTLs). Auch eine verminderte Antigenprozessierung beeinträchtigt die tumorspezifische CTL-Aktivierung (Abb. 5 A). Wenn den

Immunzellen, in diesem Fall den tumorantigen-spezifischen CTLs, kein „danger“ Signal vermittelt wird, gehen sie durch ein autoreaktives Signal in einen anergen Zustand über. So entsteht eine Tumortoleranz [76] die auch durch die Entstehung der Tumorzellen aus gesunden Körperzellen begünstigt wird, da so den T-Zellen körpereigene „self“-Antigene präsentiert werden. Zusätzlich trägt das tumor-induzierte immunsuppressive Milieu dazu bei, dass die Tumorantigene vom körpereigenen Immunsystem nicht erkannt werden. Bei Tumorantigenen handelt es sich um Proteine, die nur oder vermehrt in Tumorzellen exprimiert werden. Sie sind in der Lage eine Immunantwort gegen den Tumor zu induzieren, die T-Zell oder auch Antikörper vermittelt sein kann [77].

Zudem kann die Tumorzelle die Cross-Präsentation nutzen um nicht-danger Signale zu vermitteln (Abb. 5 C). So werden T-Zellen die spezifisch für Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) sind blockiert. Eine Tumortoleranz ist die Folge. Die T-Zelle wird anerg und bleibt blockiert. Des Weiteren kann die Tumorzelle durch die Expression von FasL und dem Fehlen von Fas eine Eliminierung der Immuneffektorzellen induzieren. Durch die Expression des Zelltod induzierenden Liganden FasL wird deren Zelltod ausgelöst (Abb. 5 B) [75].

Tabelle 1: Tumor-Escape-Mechanismen: Mechanismen und Wirkung der einzelnen Zelltypen

| Zelltyp | Mechanismen | Wirkung |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DC | Keine Ausreifung der DCs Fehlende kostimulatorische Moleküle Cross-Präsentation von Tumorantigenen | nicht in der Lage Antigene zu präsentieren Tumorzellen werden von Effektorzellen nicht erkannt Unzureichende Antigenpräsentation Tumortoleranz: T-Zellen die spezifisch für TAAs sind blockiert |
| Tumorzelle | Sekretion immunsuppressiver Zytokine (VEGF, TGF-β, IL-10) → Fehlende/veränderte MHC I Expression Mangel an kostimulatorischen Molekülen Fehlen von Fas aber Expression von FasL | inhibiert normale Anti-Tumor-Reaktion von Effektorzellen und ermöglicht so ein Entkommen vor der eigentlichen Immunreaktion Unzureichende Antigenpräsentation Eliminierung der Immuneffektorzellen durch die Expression von Zelltod induzierenden Liganden (z.B. Fas-L) |
| CTL | Defekte T-Zell-Signalgebung Abweichende Zytokinsekretion | Verminderte Effektorfunktionen |
| CD4 T-Zelle | Umschalten auf Th2-Zytokine | CD4-Immunantwort verschoben in Richtung Th2 Inhibierung von Th1 Zellen und somit effektiver Immunabwehr |
| Treg | Aktivierung von immunsuppressiven Zellen Treg-Anhäufung in Tumorumgebung | Unterdrücken von tumorreaktiven T-Zellen |

Durch die beschriebenen verschiedenen Methoden erzeugen Tumorzellen eine Umgebung die keine effektive Tumormunität mehr zulässt.

Aufgrund bereits mehrere nachgewiesener Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) sollte eine Tumorerkennung generell möglich sein. Ein Grund für die ineffektive immunologische Krebsabwehr ist demnach die Toleranz gegenüber den „self“ oder „non-dangerous“

Tumorantigenen [78]. Die Immuntherapie soll nun diesen Immundefekt bekämpfen. Dazu gibt es verschiedene Ansätze:

- die unspezifische Aktivierung des Immunsystems,(A)
- die Steigerung der Tumorimmunogenität (B) sowie
- die Impfung mit TAAs, auch Tumorstimmung genannt (C)

1.2.5 Immuntherapie von malignen Erkrankungen

Das Immunsystem ist in der Lage mit Hilfe von unterschiedlichen Mechanismen Tumore zu erkennen und diese auch zu bekämpfen. Dies dient als Basis für die Entwicklung von immunologischen Therapien um Tumorerkrankungen zu behandeln. Das therapeutische Ziel der Immunstimulation besteht demnach darin, die gegen den Krebs gerichtete Immunantwort zu verstärken. Patienten bei denen durch Infektion oder Medikamente nach einer Organtransplantation eine Immunsuppression vorliegt haben ein 3-4fach höheres Risiko an Krebs zu erkranken. Die zeigt erneut deutlich die Verbindung zwischen Krebs und dem Immunsystem. Schon Ende des 19. Jahrhunderts wurden Versuche unternommen durch Injektion von autologen Tumorzellen in den Patienten eine antitumorale Immunantwort auszulösen [79]. Dies führte allerdings zu keinen Erfolgen. Erst durch die Zugabe von Adjuvanzen (z. B. *Corynebacterium parvum*) konnte die Immunantwort unspezifisch gesteigert werden, um so zu einer erhofften Verstärkung der tumorspezifischen Immunantwort zu gelangen [80].

Unspezifische Aktivierung des Immunsystems (A)

Das Immunsystem kann mit Zytokinen unspezifisch aktiviert werden. Sie werden von aktivierten T-Zellen oder anderen Zellen während der natürlichen oder spezifischen Immunantwort freigesetzt. Zytokine dienen während der Immunabwehr der Kommunikation zwischen den Zellen. Für die Immunologie bei Krebs spielen folgende Zytokine eine besondere Rolle: IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IFN- α , IFN- γ , GM-CSF und TNF- α [81]. Tabelle 2 listet deren Funktion und Freisetzung auf.

Tabelle 2: Zytokine und deren Entstehung und Funktion

| Zytokin | Sekretion durch | Funktion |
|---------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| IL-2 | akt. T-Zellen | Proliferation, Aktivierung von CTL, Th-, NK-Zellen |
| IL-4 | akt. Th-Zellen | Th2-Antwort, Differenzierung von APC |
| IL-6 | T-Zellen, Makrophagen | Inflammatorisch |
| IL-7 | Stromazellen | Differenzierung von B-/T-Zellen Proliferation von lymphoiden Stammzellen |
| IL-12 | APC | Aktivierung von NK, CTL, Th1 |
| IFN- α | Leukozyten | Proliferationshemmung (Tumor), Aktivierung von NK-Zellen |
| IFN- γ | T-Zellen | NK-Zellen, Makrophagen Aktivierung |
| GM-CSF | T-Zellen | APC-Reifung + Differenzierung |
| TNF- α | Makrophagen | Proliferation/Aktivierung von NK-Zellen, Makrophagen |

Steigerung der Tumorimmunogenität (B)

Durch eine gesteigerte Immunogenität des Tumors kann eine verbesserte Erkennung des Tumors durch CTLs erreicht werden. Dabei werden die Tumorzellen dazu gebracht verstärkt Zytokine oder Hitzeschockproteine (HSP) zu sezernieren, durch die dann eine lokale Inflammation hervorgerufen wird. Das direkte priming kann durch die Transduktion von kostimulatorischen Molekülen (B7, MHC) für die Antigenpräsentation gefördert werden und so die Tumorimmunogenität erhöhen. Der Therapieansatz zeigt in klinischen Versuchen effektive antitumorale Wirkungen [82].

Tumorvakzinierung (C)

Die direkte Stimulierung des Immunsystems gegen TAAs bezeichnet man als Tumorvakzinierung. Tumorzellen entstehen aus körpereigenen Zellen, daher besteht ein wichtiger Punkt darin, die immunologische Selbsttoleranz zu überwinden [83]. Als Vakzin, Impfstoff, werden zum Beispiel bestrahlte Tumorzellen, Tumorzelllysate, tumorspezifische Proteine und Peptide, Immunzellen, Tumorzell-mRNA oder cDNA von Tumorantigenen oder Viren eingesetzt, gegen die dann eine spezifische Immunantwort hervorgerufen werden soll. Für die Tumorzellvakzinierung werden modifizierte, autologe oder allogene Tumorzellen mit einer inaktivierenden Dosis bestrahlt bevor sie wieder reimplantiert werden. Zusätzlich können sie noch mit immunstimulierenden Adjuvantien versetzt werden. Bei autologen Tumorzellen besteht hier der Vorteil darin, dass alle relevanten Tumorantigene präsentiert werden können, ohne dass die Antigenstruktur bekannt sein muss [84].

1.3 Das humane Immunsystem

1.3.1 Allgemein

Der Mensch ist in seiner Umwelt ständig der Gefahr ausgesetzt in seiner Integrität angegriffen zu werden. Zu den möglichen Gefahren zählen exogene, pathogene Erreger und endogene krankhaft veränderte Körperzellen. Das Immunsystem dient dem Schutz vor körperfremden Eindringlingen und entarteten körpereigenen Zellen (z.B. Tumorzellen). Dies wird durch die Bildung von schützenden Zellen und Molekülen, die im Körper verteilt werden ermöglicht. Bestandteil der Aufgabe ist es, körperfremde Erreger und Substanzen zu erkennen und von körpereigenen zu unterscheiden und schließlich, wenn nötig, zu bekämpfen ohne den Körper dabei zu schädigen.

Im menschlichen Körper ist jedem Organ und jedem Zellsystem eine definierte Aufgabe zugeteilt, was ein funktionierendes System ergibt. Pathogene können, z.B. durch das Auslösen einer Krankheit eine Störung verursachen. Zum Schutz davor tragen viele verschiedene Gewebe, Zellen und Zellprodukte bei, die das Immunsystem bilden. Bei einer

Infektion durch Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten werden die natürlichen Barrieren des Körpers (Haut, Schleimhäute) überwunden, hierbei wird der Organismus durch das Immunsystem geschützt, indem die Krankheitserreger erkannt, bekämpft und eliminiert werden.

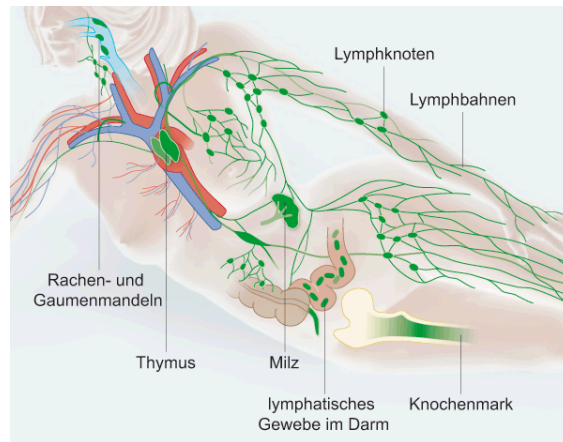


Abbildung 6: Organe des Immunsystems (Martina Ibelherr, Wort und Bild Verlag)

Das Immunsystem bildet einen anpassungsfähigen und hochdifferenzierten Abwehrapparat und kann bei höheren Vertebraten in zwei Anteile unterschieden werden [73]. Die angeborene (innate) Immunität und die erworbene (adaptive) Immunität [85]. Das adaptive Immunsystem ist nur bei Wirbeltieren zu finden [86].

Das erworbene, spezifische Immunsystem entstand vor ca. 450 Millionen Jahren und wird erst nach einem Erstkontakt aktiv. Durch die Ausbildung von Gedächtniszellen können Pathogene wieder erkannt und so effektiv eingegriffen werden und verschaffte den Organismen einen Selektionsvorteil. Das angeborene, unspezifische Immunsystem ist phylogenetisch älter und in allen mehrzelligen Organismen und Pflanzen vorhanden und erhalten. Es ermöglicht innerhalb der ersten Stunden nach einer Infektion eine Immunantwort und dient der ersten Abwehr des Körpers gegen Krankheitserreger [87]. Es wird durch Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) und Natural Killer (NK) Zellen gebildet. Beide Teile bilden ein komplexes System und sind eng miteinander verknüpft. Einige Zellen sind sowohl für die angeborene als auch die erworbene Immunität verantwortlich. Die wesentlichen Unterschiede liegen in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung. Charakteristika des angeborenen Immunsystems sind die keimbahn-kodierten Rezeptoren, die häufig vorkommende Strukturmerkmale von Pathogen erkennen, Effektor-Mechanismen wie Phagozytose, Antigenpräsentation, Aktivierung von proteo-lytischen Signalkaskaden und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren [88]. Wenn diese Mechanismen allerdings von pathogenen Mikroorganismen überwunden und die ersten Abwehrlinien durchbrochen werden, wird eine adaptive Immunantwort ausgelöst, wobei das angeborene Immunsystem ein wichtiger Faktor zur Aktivierung und Modulation des adaptiven Immunsystems darstellt [89].

Um das Immunsystem als therapeutisches Ziel der modernen Medizin zu nutzen, ist ein tiefgreifendes und umfassendes Verständnis der beiden Systeme und einzelnen Vorgänge erforderlich.

1.3.2 Das angeborene Immunsystem

Der Organismus ist einer ständigen Bedrohung durch verschiedenste Pathogene ausgesetzt. Durch den Kontakt mit dem Wirtorganismus können so lokale Infektionen auftreten, die sich auch im Körper ausbreiten können und Sepsen oder im schlimmsten Fall einen septischen Schock auslösen können. Der menschliche Körper besitzt allerdings verschiedene Barrieren, die eine Infektion verhindern können. Die epitheliale Oberfläche (z.B. Haut, Schleimhäute des Respirations-, Gastrointestinal- oder Urogenitaltrakt) ist die erste physikalische Barriere. Hier wird von Mukosazellen Schleim gebildet in den die Mikroorganismen eingebettet und so deren Adhäsion an das Epithel verhindert wird. Zusätzlich sorgt der Cilienschlag der auf den Epithelien liegenden Cilien, für eine ständige Bewegung des Mukussekretes. Im Gastrointestinaltrakt verhindert die Peristaltik die Ansiedelung von Pathogenen. Auch durch die Produktion von chemischen antimikrobiellen oder für Pathogene wachstumshemmenden Substanzen kann das Immunsystem reagieren. Zu den Substanzen zählen das in Speichel und Tränenflüssigkeit enthaltene antibakterielle Enzym Lysozym, Verdauungsenzyme des oberen Gastrointestinaltrakt, Defensine die in der Haut und in Zellen des unteren Gastrointestinaltraktes gebildet werden, sowie der saure pH-Wert des Magens. Auch die meist auf epithelialen Oberflächen zu findenden nichtpathogenen Bakterien spielen bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle. Durch deren Produktion antimikrobieller Substanzen sowie durch die Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum, können sich pathogene Eindringlinge nicht weiter ausbreiten. Wenn allerdings durch z.B. eine Antibiotikabehandlung diese Standortflora zerstört wird, kann es dort zu Erkrankungen durch Pathogene führen [90].

Sobald es Pathogenen gelingt eine der beschriebenen Barrieren zu überwinden und eine Entzündungsreaktion auszulösen, reagiert das angeborene Immunsystem innerhalb weniger Minuten bis wenigen Stunden mit Abwehrmechanismen. Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems werden durch eine Entzündungsreaktion aktiviert und reifen innerhalb von Minuten zu immunkompetenten Zellen. Oft kann eine Infektion ohne zusätzliche Aktivierung des adaptiven Immunsystems bekämpft werden [91].

1.3.2.1 PAMP und PRR

Die Zellen der angeborenen Immunantwort erkennen Pathogene (PAMPs, pathogen associated molecular pattern), über spezielle Rezeptoren, die sogenannten PRR (Pattern Recognition Receptors) auf der Oberfläche von immunkompetenten Zellen (z.B. DCs, Makrophagen, B-Zellen).

Mikrobielle Pathogene sind heterogen und weisen hohe Mutationsraten auf. Daher ist eine wichtige Aufgabe des angeborenen Immunsystems, die in der Evolution hoch konservierten Strukturen (z. B. Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle und virale ss ds RNA sowie DNA) zu erkennen [88]. Bei diesen unterschiedlichen chemischen Strukturen handelt es sich um Musterstrukturen des Stoffwechsels von Pathogenen, die nur von Mikroorganismen gebildet werden, essentiell für deren physiologische Vorgänge und somit deren Überleben sind und mit ihren immunstimulatorischen Fähigkeiten die angeborene Immunantwort induzieren.

Da PAMPs nicht vom Wirt sondern nur im Organismus des Pathogens synthetisiert werden, ist das angeborene Immunsystem in der Lage zwischen Pathogen und Nicht-Pathogen („Selbst“ und „Nichtselbst“) zu unterscheiden. Strukturen, die von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden dürfen keine Ähnlichkeit mit Selbstantigenen haben, da es sonst zu autoimmunen Reaktionen mit schweren Zell- und Gewebsschäden führen könnte [89]. So lässt sich auch erklären, dass es im Zusammenhang mit der angeborenen Immunantwort nicht zu autoreaktiven Prozessen kommen kann [92].

Die PRR werden funktionell in 3 Klassen unterteilt:

- 1 Sezernierende, lösliche PRRs (Mannan-bindendes Lektin)
- 2 Endozytierende PRRs (Mannose Rezeptor)
- 3 Zytoplasmatische, intrazelluläre PRRs (TLR)

Die erste Gruppe der sezernierten PRRs wirken als Opsonine, indem sie an mikrobiellen Zellwänden binden und sie so markieren. Nun können sie vom Komplementsystem und Phagozyten erkannt werden. Bei den endozytierenden PRRs handelt es sich um membrangebundene PRRs, die auf der Oberfläche von Phagozyten vorkommen. Sobald die Pathogene erkannt wurden, erfolgt deren Phagozytose und Zerstörung in Lysosomen. Die pathogenen Proteine werden dann von den Makrophagen auf MHC-Molekülen präsentiert, zudem erfolgt eine Zytokin- und Effektorsekretion [88].

Die zytoplasmatischen auf der Zelloberfläche oder intrazellulär exprimierten, PRRs leiten die Information der Pathogenerkennung über Signaltransduktionskaskaden in die Zelle weiter und lösen so die Expression bestimmter Gene der Immunantwort aus. Zu dieser Gruppe der signaltransferierenden Rezeptoren gehören die in dieser Arbeit untersuchten und in der Evolution eine wichtige Rolle spielenden TLRs. Sie werden in Kapitel 1.3.5 ausführlich beschrieben.

Tabelle 3: Unterschiede des angeborenen und des adaptiven Immunsystems
 Darstellung der wesentlichen Unterschiede des angeborenen und des adaptiven Immunsystems (nach [91] ergänzt)

| Charakteristika | Angeborenes Immunsystem | Adaptives Immunsystem |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Funktion | Entzündung/Abwehr | Antigen-Erkennung |
| Verfügbarkeit | Sofort, Effektoren direkt aktiviert | Verspätete Aktivierung der Effektoren |
| Erkennung | konservierte Molekülmuster verschiedener Pathogene | Details der pathogenen Molekülstrukturen |
| Vielfältigkeit | Begrenzt | Sehr groß |
| Erinnerungsfunktion | Nein | Ja |
| Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ | Ja | Ja, aber Fehler möglich |
| Immunantwort | Kostimulatorische Moleküle Zytokine, Chemokine | Klonale Ausbreitung oder Anergie, Effektor-Zytokine |
| Komponenten | | |
| Barrieren | Haut, Epithelien, antimikrobielle Substanzen | Lymphozyten, Sekretion von Anikörpern |
| Plasmaproteine | Komplement, Lektin, Zytokine | Komplement, Immunoglobuline Zytokine |
| Zellen | Myeloid Zellen: Eosinophile, Basophile, Neutrophile, Makrophagen/ Monozyten, Lymphozyten: NK-Zellen | Lymphozyten: B-Zellen, T-Zellen (CTL, T-Helfer-Zellen, Treg) |
| Rezeptoren | Keimbahnkodiert | Kodiert in Gensegmenten |
| Teilung | Nicht-klonal | klonal |

1.3.3 Das adaptive Immunsystem

Die hoch entwickelte adaptive Immunantwort ermöglicht mit Hilfe von antigenspezifischen Effektorzellen die gezielte Eliminierung von Pathogenen, die von der angeborenen Immunantwort nicht beseitigt werden konnten. Bei Antigenkontakt werden die Zellen aktiviert und proliferieren, so dass spezifisch gegen das jeweilige Antigen gerichtete Zellen entstehen [93].

Zusätzlich erfolgt eine Bildung von Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Mikroorganismus eine Infektion verhindern können. Die Zellsysteme gehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle hervor, die sich an verschiedenen Orten entwickelt. Im Knochenmark reifen B-Lymphozyten, T-Lymphozyten hingegen im Thymus. Nach ihrer Differenzierung und Aktivierung in antikörperbildende Plasmazellen, produzieren die B-Lymphozyten je einen speziellen Antikörper der zu dem jeweiligen Antigen passt. So bilden diese Zellen den humoralen Teil des adaptiven Immunsystems. Der zelluläre Teil wird von den T-Lymphozyten gebildet. Die gereiften Zellen treffen nach ihrer Wanderung in die lymphatischen Organe auf die Antigene. MHC-präsentierte Antigene aktivieren dort die T-Lymphozyten. Zur Aktivierung werden den T-Zellen prozessierte Antigene von APC (z.B. DC, Makrophagen, B-Zellen) präsentiert. Zusätzlich sind T-Zellen auf ein zweites Signal durch kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86) angewiesen.

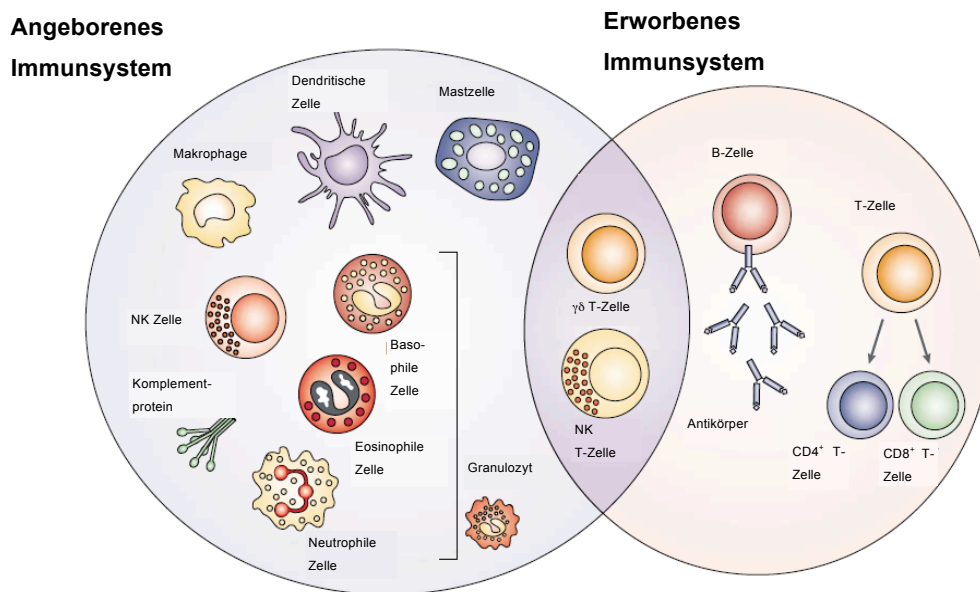


Abbildung 7: Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (verändert nach: [94])

Aufgrund der Vielzahl von T- und B-Zellen steht ein großes Angebot an Antigenrezeptoren zur Verfügung. Bei der somatischen Rekombination während der Entwicklungsphase werden Antigenrezeptoren für die erforderlichen Zellen ausgewählt und autoreaktive Lymphozyten eliminiert, so dass es zu keiner körpereigenen Gewebsschädigung kommt [92]. Sobald nun ein Antigen auftritt ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass bereits ein Lymphozyt mit passendem Rezeptor vorhanden ist, der dann klonal proliferiert. Wenn den APC ohne ein zusätzliches kostimulatorisches Signal Antigene präsentiert werden, bleiben die für das Antigen spezifische Lymphozyten inaktiv. Erst nach der Erkennung von PAMPs erfolgt die Induktion der kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD86), was deutlich macht, dass die angeborene Immunantwort bei der Vermeidung von Immunität gegen Selbstantigene und nichtpathogene Umweltantigene eine Rolle spielt [88]. Sind diese Mechanismen gestört, kann das zu Autoimmunerkrankungen und Allergien führen [92]. Zur Induktion der adaptiven Immunantwort sind Mechanismen der angeborenen Immunantwort erforderlich.

Der Mechanismus der adaptiven Immunantwort erklärt, dass es einige Tage nötig sind bis es in voller Stärke gegen ein Pathogen vorgehen kann. In jedem Organismus muss dieses Abwehrsystem erneut generiert werden, da es nicht genetisch weitergegeben wird.

Das adaptive Immunsystem ist außerdem für allergische Reaktionen, Autoimmunerkrankungen und Gewebeabstoßungsreaktionen verantwortlich. Seine Rezeptoren können nicht zwischen „Selbst“, oder „Nicht-Selbst“ entscheiden [95]. Um autoraktive, immunpathologische Reaktionen zu vermeiden und eine geeignete Immunantwort zu induzieren sind weitere Informationen über die Herkunft eines Antigens nötig. Die Gruppe der Toll-like Rezeptoren kann solche Signale liefern. Die dendritischen Zellen stellen hierbei

das zentrale Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar und werden im Abschnitt 1.3.4 näher beschrieben.

Die adaptive Immunantwort wird ausgelöst, indem die DCs in die Lymphknoten wandern wo T-Lymphozyten Antigene über MHC II präsentieren werden und so eine antigen-spezifische adaptive Immunantwort ausgelöst wird. Außer der T-Lymphozyten-Proliferation ist auch deren Differenzierung wichtig für eine effektive adaptive Immunantwort. CD4-Zellen können sich in zwei verschiedene Untergruppen differenzieren, die Th1- und Th2-Zellen [96]. Nachdem Pathogene erkannt wurden differenzieren CD4⁺T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen. Diese aktivieren abhängig vom jeweiligen Pathogen eine Immunantwort. So werden Phagozyten aktiviert und eine antikörperspezifische Zytotoxizität ausgelöst um die intrazellulären Pathogene zu beseitigen [97].

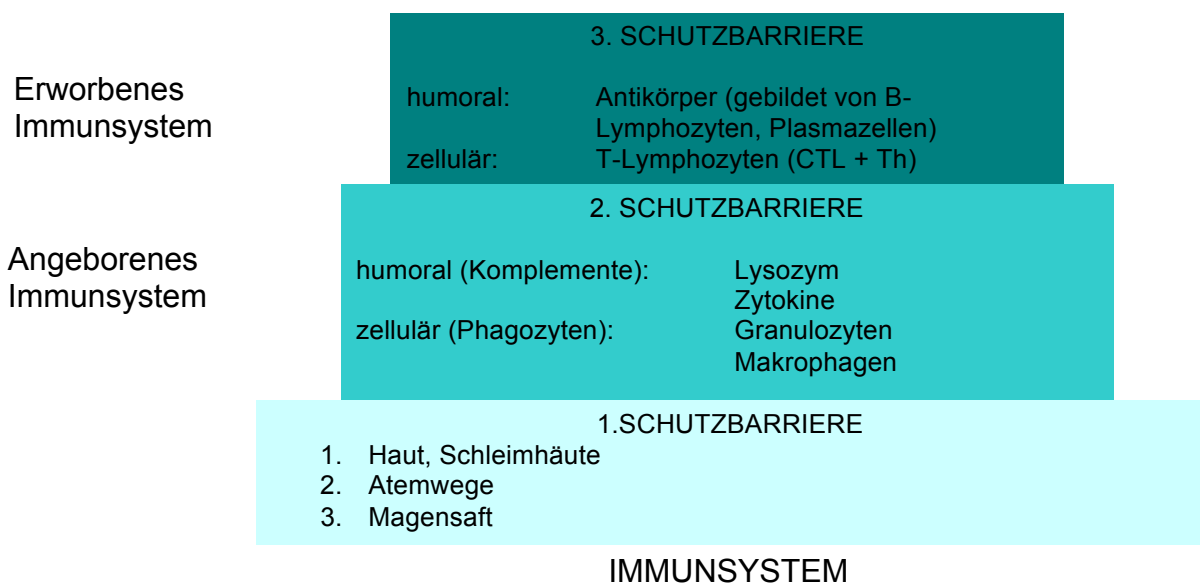


Abbildung 8: Die Säulen des Immunsystems

1.3.4 Dendritische Zellen

1.3.4.1 Entstehung

Paul Langerhans entdeckte 1968 die ersten nach ihm benannten Langerhans'schen Zellen und beschrieb sie als einen in der Epidermis liegenden Zelltyp. Er nahm aufgrund ihres morphologischen Aussehens an, dass es sich um Zellen des Nervensystems handelt [98].

1973 entdeckte Steinman bei Untersuchungen an sekundären Lymphorganen, in der Milz von Mäusen eine neue Zellgruppe die er aufgrund ihrer astförmigen Ausläufern, den verzweigten Zellfortsätzen, „Dendritische Zellen“ nannte (Dendron [griechisch] Baum) [99]. Der Name bezog sich allerdings nur auf die Morphologie und nicht die Funktion der Zellen. Erst 1985 entdeckte man, dass die Langerhans'schen und die dendritischen Zellen zu einem gemeinsamen Zellsystem gehören [100]. Getrennte Untersuchungen der Zellpopulationen zeigten, dass diese Zellen als Subpopulation von hochspezialisierten APCs zu bezeichnen

sind und eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunität spielen. Sie haben eine wesentliche Bedeutung für die Initiierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Sie gelten als effektivste antigenpräsentierende Zellen, werden als die „Wächter des Immunsystems“ bezeichnet und kontrollieren in ihrer Wächterfunktion die T- und B-Zell-Aktivitäten [101]. DC-Vorläuferzellen nehmen die Antigene in der Peripherie durch Phagozytose und Endozytose auf, prozessieren sie und wandern in lymphatische Organe, wo sie unter anderem kostimulatorische Moleküle exprimieren, Zytokine freisetzen und auf diese Weise die adaptive Immunantwort induzieren. Demnach greifen die DCs schon in der Initiierungsphase der spezifischen Immunkaskade ein und spielen so eine wesentliche Rolle für die Regulation immunologischer Prozesse.

Die Reifung von DCs beinhaltet eine Umgestaltung des Zytoskelettes, reduzierte Phagozytose, zelluläre Bewegung, Wanderung zu lymphatisches Gewebe, erhöhtes Potential zur T-Zell-Aktivierung sowie die Bildung der charakteristischen zytoplasmischen Fortsätze, die Dendriten [102]. Die unterschiedlichen Reifegrade erlauben eine Einteilung in unreife (iDC) und reife (mDC) DCs (siehe Tab.4). Aufgrund der unterschiedlichen Rezeptor- und Integrinprofile der Zellmembran unterscheiden sie sich in Migration und Antigenpräsentation [103]. Die aus den Vorläuferzellen entstehenden iDC besitzen eine hohe phagozytotische Aktivität, ihre MHC II-Expression hingegen ist so wie die Expression für die T-Zell-Aktivierung benötigten Korezeptoren (CD40, CD80/86) gering. Allerdings weisen sie eine hohe Anzahl an PRRs, die es ermöglichen mikrobiologische Strukturen zu erkennen und so differentielle Immunreaktionen einzuleiten [88]. Bei der Interaktion zwischen DC und T-Zellen spielen die Oberflächen-moleküle eine wesentliche Rolle [104] und werden für die Induktion einer effektiven T-Zell Antwort benötigt.

Tabelle 4: Charakteristika von unreifen und reifen dendritischen Zellen

| Charakteristika | iDC | mDC |
|------------------------|------------------|-----------------------|
| MHC II | Intrazellulär ++ | auf Zelloberfläche ++ |
| Phagozytose | ja | kaum |
| CD80 (B 7.1) | - | ++ |
| CD83 | - | ++ |
| CD86 (B 7.2) | - | ++ |
| CD14 | / | / |
| CD40 | ++ | ++ |
| CD54 (ICAM-1) | - | ++ |

-: niedrig; +: hoch

DCs werden von Viren und Bakterien oder deren Bestandteile (LPS, CpG) und durch Zytokine (IL-1 β , TNF- α) aktiviert [105]. Je nach Art ihres Stimulus sind DCs in der Lage eine Th1- oder Th2-Antwort auszulösen. Eine weitere Aufgabe der DCs besteht darin NK- und NKT-Zellen zu aktivieren, die die Vernichtung virus-infizierter Zellen übernehmen und

wichtige Zytokine (IFN- γ) produzieren [105]. Zudem liegt eine weitere Aufgabe der DCs darin, durch die Elimination autoreaktiver T-Zellen durch Apoptose, immunologische Toleranz zu vermitteln [103].

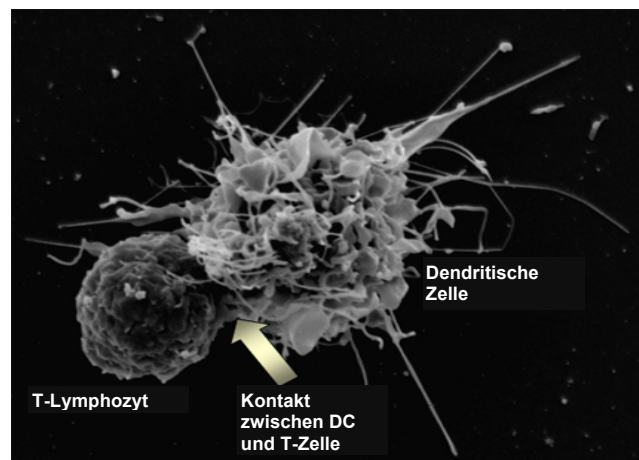


Abbildung 9: Aufnahme einer dendritischen Zelle bei Kontaktaufnahme mit einer T-Zelle (<http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/hiv7.htm>)

Dendritische Zellen sind in der Lage aufgrund ihrer strukturellen Voraussetzungen Antigene zu erkennen, sie aufzunehmen und schließlich gebunden an MHC I oder MHC II-Moleküle T-Zellen zu präsentieren. Die Erkennung pathogener Strukturen ist der initiale Schritt, der mit Hilfe von Rezeptoren wie z.B. den hoch konservierten TLRs oder Scavenger-Rezeptoren bewerkstelligt wird [88]. Die Antigenpräsentation wird durch die verstärkte Anzahl an MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche erhöht. Außerdem steigt die Expression der zur T-Zell-Aktivierung benötigten kostimulatorischen Moleküle (z.B. CD80, CD83, CD86) [105].

Zusammen mit der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, -8, -12, TNF- α) wird so die primäre Immunantwort ausgelöst [105]. Zusätzlich zu Induktion der adaptiven Immunantwort können DCs durch Zytokin- und Chemokinausschüttung Effektorzellen der angeborenen Immunität zum Infektionsort locken und so diese auslösen [105].

Werden Antigene über MHC I-Peptid-Komplexe präsentiert spricht man von Cross-Präsentation. Dieser Fall tritt bei Phagozytose virusinfizierter oder Tumorzellen auf, hier werden die viralen bzw. Tumor-assoziierten Antigene auf MHC I cross-präsentiert [106]. CD8⁺T-Zellen sind in der Lage MHC I-gebundene Antigene zu erkennen und können so körpereigene von körperfremden Zellen unterscheiden. Außerdem ist so die Erkennung von virusinfizierten und entarteten Zellen möglich. MHC II-Moleküle binden Antigene phagozytierter fremder Zellen, die von CD4⁺T-Zellen erkannt werden und diese aktivieren [85]. Die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen geschieht zum einen mithilfe von Botenstoffen (sezernierte Zytokine), zum anderen durch direkten physikalischen Kontakt über Zellmembranmoleküle. Dies ist in der folgenden Abbildung dargestellt [107].

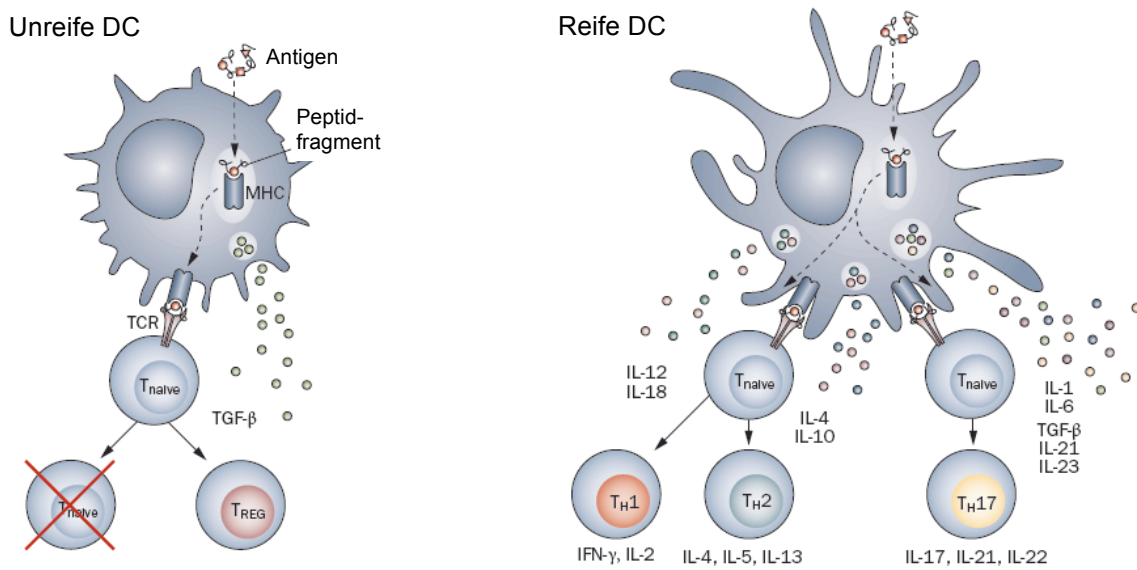


Abbildung 10: Interaktion dendritischer Zellen mit T-Zellen

1.3.4.2 Melanommodell

Die Tumorzelllinie SK29Mel-1 wurde aus dem männlichen Patienten SK29 mit metastasiertem malignen Melanom etabliert. Dieser hat den HLA-A2 Phänotyp, demnach ist die Zelllinie HLA-A2 positiv. Der HLA-A2 negative Subklon der Zelllinie SK29Mel-1.22 wurde durch Immunselektion mit autologen zytotoxischen T-Lymphozyten in Zellkultur selektioniert [108]. Zur Analyse der tumorspezifischen CTL-Stimulation nach H-1PV-induzierter Tumorzelllyse stehen zwei autologe HLA-A2-beschränkte CTL-Linien zur Verfügung, die aus einer MLTC-Kultur (mixed lymphoid tumor cell culture) im Modell SK29 (AV) gewonnen wurden. Sie erkennen in Assoziation mit HLA-A2 verschiedene Antigene der Melanomzelllinie SK29Mel-1 [109], von denen bisher 3 beschrieben wurden: CTL 2/9 erkennt Melan A/MART1 Peptid 26-35 [110] und CTL IVSB Tyrosinasepeptid 368-377 [111]. Die autologen zytotoxische T-Lymphozyten wurden aus den Patienten isoliert und in eine etablierte Zellkultur gebracht.

Die CTLs sind in der Lage die Melanomzellen SK29Mel-1 zu erkennen und können diese auch zu lysieren [108]. Da die Cross-Präsentation von tumorspezifischen Antigenen durch DCs HLA-A2 abhängig ist, kann ein Nachweis mit Hilfe von Zellen aus Spenderblut erfolgen. Die durch Phagozytose aufgenommenen viralen bzw. Tumor-assoziierten Antigene virus-infizierter Zellen oder Tumorzellen werden bei der Cross-Präsentation auf MHC I präsentiert. Demnach können H-1PV-infizierte Tumorzellen von Antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert werden und eine Reifung und Cross-Präsentation von dendritischen Zellen sowie deren Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen induzieren.

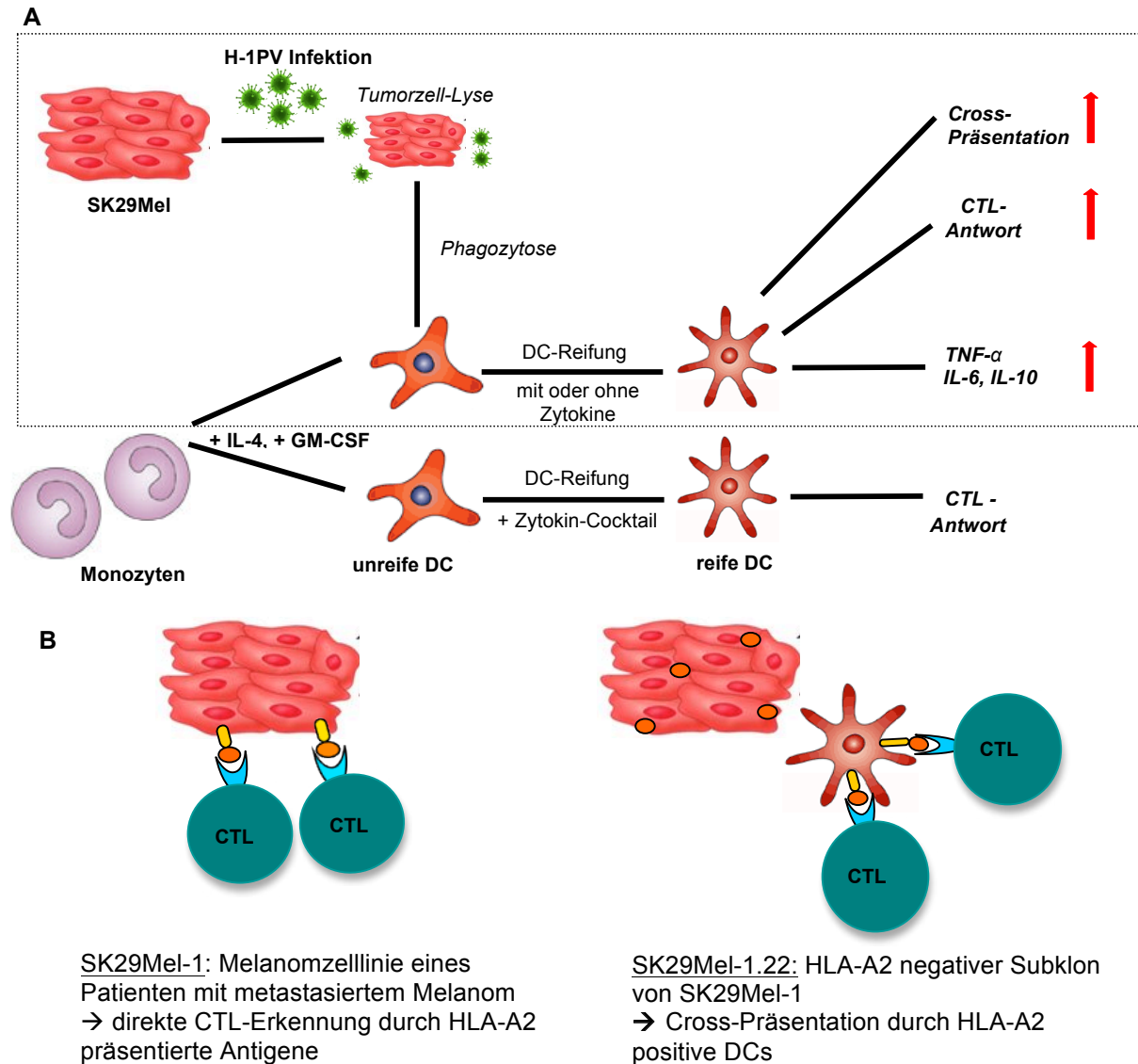


Abbildung 11: Melanommodell
 Schematische Übersicht des Einflusses von H-1PV auf die tumorspezifische Immunantwort (A) und Komponenten des Melanommodells (B)

1.3.5 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle bei der mikrobiellen Erkennung, der Induktion von antimikrobiellen Genen und der Kontrolle der adaptiven Immunantwort. Studien zeigen, dass TLRs bei einer Infektion an der Erkennung von Molekülstrukturen, beim Anschalten verschiedener Signalwege und bei der Kontrolle der DC-Reifung und T-Helfer-Zell-Differenzierung von Bedeutung sind [112]. Sie gehören zu einer Gruppe der stark konservierten PRRs die die Informationen der eindringenden Pathogene mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden in die Zelle weiterleiten. Dort wird die Expression verschiedener Gene der Immunantwort induziert.

Die TLRs gehören zu der am besten charakterisierten Gruppe von Muster-Erkennungsrezeptoren und zählen wahrscheinlich zu dem entwicklungsbiologisch ältesten

Bestandteil des Immunsystems [112]. Erstmals 1997 beschrieben, sind sie seither ein gefragter Gegenstand der Forschung.

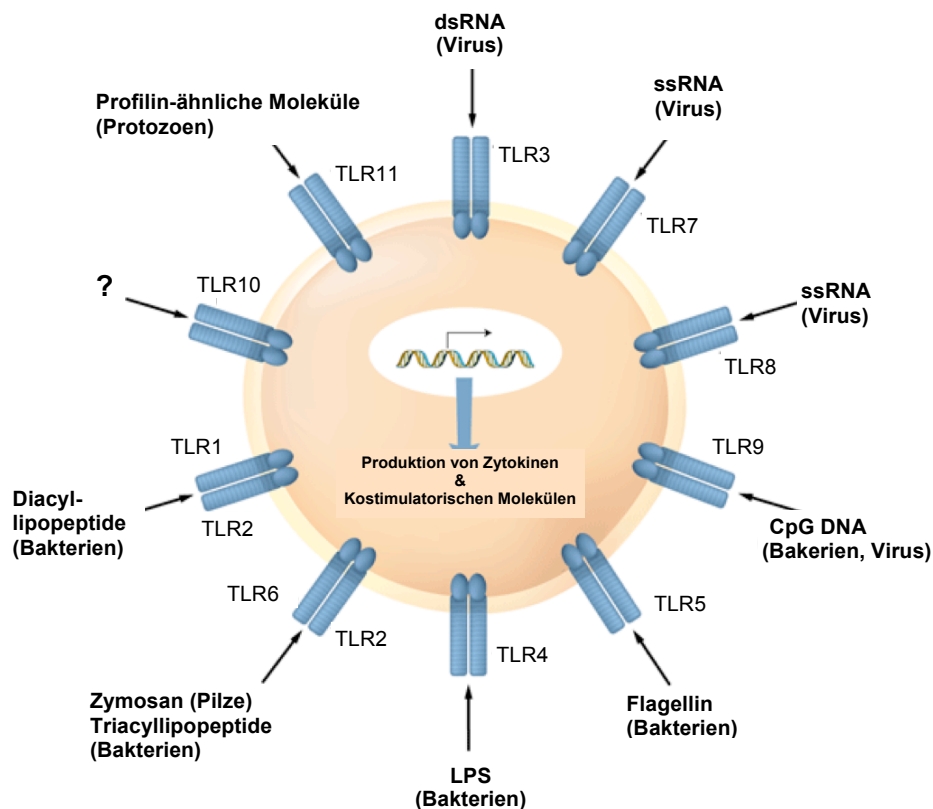


Abbildung 12: TLRs und ihre Liganden
 (verändert nach: <http://research4.dfci.harvard.edu/innate/images/innate/tlrs.gif>)

1.3.5.1 Drosophila Toll

In den 80er Jahren wurde das Toll-Protein in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erstmals identifiziert [113]. Dort ist es ein wichtiger Bestandteil der Embryonalentwicklung [86]. Da auch Pflanzen und Invertebraten, wie z.B. Insekten, über das System der Pathogenerkennung verfügen stellte sich heraus, dass die TLRs für die angeborene Immunantwort von Säugern eine essentielle Bedeutung haben [112].

Das Toll Protein ist ein Typ I Transmembran Rezeptor, dessen extrazelluläre Domäne aus leucin-reichen „Repeats“ (LRR leucine-rich repeats) besteht. Die zytoplasmatische Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)- Domäne besitzt Sequenzhomologien zu Mitgliedern der Interleukin (IL)-1 Rezeptorfamilie [114]. Nicht nur durch Toll in *Drosophila* (dToll) sondern auch durch den humanen IL-1-Rezeptor werden Signaltransduktionswege aktiviert, die wiederum die Expression von Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie induzieren [115]. In Säugetieren spielen diese eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Immunantworten [116].

1.3.5.2 Toll Proteine der Wirbeltiere

1997 wurde das erste humane Toll-Homolog entdeckt und wurde aufgrund der Homologie als Toll-like Rezeptor (TLR) bezeichnet. Später konnte die Bedeutung des als TLR4 identifizierten humane Homolog des Toll-Rezeptors für das angeborene Immunsystem

bewiesen werden. In humanen Zelllinien konnte durch Transfektionsexperimenten von konstitutiv aktiven TLR4-Mutanten gezeigt werden, dass es zu einer NF κ B-Aktivierung und anschließender Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-8) sowie kostimulatorischen Molekülen kam [89].

Im Vertebraten-System konnten bis heute 11 verschiedene TLRs identifiziert werden, von denen auch spezifische Liganden beschrieben sind [117].

TLRs können abhängig von ihrer Lokalisation in 2 Gruppen unterteilt werden. Dabei korrelieren die molekularen Strukturen der jeweiligen Liganden in gewisser Weise mit der TLR-Lokalisation. Die erste Gruppe beinhaltet TLRs, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und in erster Linie mikrobielle Membrankomponenten, wie Lipide, Lipoproteine erkennen. Dazu gehören TLR1, 2, 4, 5, 6 und 11. Die zweite Gruppe der TLRs, TLR3, 7 und 9, befindet sich in intrazellulären Vesikeln (ER, Endosom, Lysosom, Endolysosom) wo sie Nukleinsäure-Motive erkennen [118]. Diese TLRs werden über den Golgi-Apparat in Endosomen gebracht werden, wo sie PAMPS aufnehmen und erkennen.

Die endosomal lokalisierten TLRs richten ihre ligandenbindende Domäne zum Lumen der Vesikel hin aus und sind für die Abwehr intrazellulärer Erreger zuständig. Sie erkennen Nukleinsäuren, die allerdings auch im Wirt vorkommen können. Um pathogen-assoziierte Muster zu erkennen, nutzen TLRs den Unterschied, dass in Bakterien- oder Viren-DNA eine besondere DNA-Sequenz, die sogenannte CpG-Sequenz wesentlich häufiger vorkommt als im menschlichen Genom [119]. Zudem ist diese Sequenz methyliert, was im Menschen nicht der Fall ist [120].

Liganden wurden inzwischen für fast alle TLRs identifiziert. Sie sind meist mikrobiellen Ursprungs wie z.B. konservierte Strukturen LPS, Peptidoglycan, Lipoteichonsäure und andere Zellwandkomponenten [121, 122]. Allerdings konnten auch endogene Liganden, die bei Zellschädigung und Zellstress freigesetzt werden gezeigt werden. Einen Überblick über die TLRs mit ihren jeweiligen Liganden bietet Tabelle 5.

Eine TLR-Aktivierung induziert die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokinen, Chemokinen und Rezeptoren, und leitet die DC-Migration zu den Lymphorganen ein. Dabei hängt die Sekretion des Zytokinprofils vom jeweiligen TLR ab [123]. Eine TLR2 Aktivierung z.B. führt zur DC-Reifung und bewirkt eine erhöhte Expression von zellulären Oberflächenproteinen wie CD40, CD83, CD86 und HLA-DR [118]. TLRs gehören zur Rezeptorfamilie die PAMPs erkennen. Zu ihren Aufgaben gehört nicht nur das Erkennen mikrobieller Strukturen (Viren, Bakterien, Parasiten), auch in der Pathophysiologie infektiöser Krankheiten, bei entzündlichen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen spielen sie eine Rolle [124].

Tabelle 5: Überblick über TLRs mit jeweiligen Liganden, Lokalisation und Vorkommen

| TLR | PAMP | Pathogen | Lokalisation | Besonderheit Vorkommen |
|-------|------------------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| TLR1 | Lipoproteine [125] | gram ⁻ Bakterien | Zelloberfläche | Komplexbildung mit TLR2 oder TLR6 Monozyten/Makrophagen B-Lymphozyten |
| TLR2 | Lipoproteine, LPS-Strukturen [121] | gram ⁻ Bakterien | Zelloberfläche | Komplexbildung mit TLR2 oder TLR6 Monozyten/Makrophagen mDC, Mastzellen |
| | Peptidoglykan [125] | gram ⁺ Bakterien | | |
| | Zymosan [126] | Pilze | | |
| | LTA, Lipoarabino-mannan [127, 128] | Mykoplasmen | | |
| | Virusbestandteile [129] | Viren | | |
| TLR3 | dsRNA [117] | Viren | Zellkompartiment | DC, B-Lymphozyten |
| TLR4 | LPS [130] | gram ⁻ Bakterien | Zelloberfläche | Monozyten/Makrophagen mDC, Mastzellen Intestinales Epithelium |
| | LTA [130] | Mykoplasmen | | |
| | Mannan [130] | Pilze | | |
| TLR5 | Flagellin [131] | Bakterien | Zelloberfläche | Monozyten/Makrophagen Intestinales Epithelium |
| TLR6 | MALP-2 [132] | Mykoplasmen | Zelloberfläche | Monozyten/Makrophagen Mastzellen, B-Lymphozyten |
| TLR7 | Uridin-reiche ssRNA [133] | Viren | Zellkompartiment | Monozyten/Makrophagen pDC, B-Lymphozyten |
| TLR8 | Uridin-reicher ssRNA [133] | Bakterien, Viren | Zellkompartiment | Monozyten/Makrophagen Mastzellen |
| TLR9 | CpG-DNA-Motive [134] | Bakterien, Viren | Zellkompartiment | Monozyten/Makrophagen pDC, B-Lymphozyten |
| TLR10 | unbekannt | | Zelloberfläche | Monozyten/Makrophagen B-Lymphozyten |

1.3.5.3 Toll-Like Rezeptoren und ihre Liganden

Als PRRs des angeborenen Immunsystems besitzen die TLRs ein breites Spektrum in der Erkennung von mikrobiellen oder auch synthetischen Komponenten. Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit relevanten TLR3 und TLR9 näher beschrieben.

TLR3

Als TLR3-Ligand wurde doppelsträngige (ds) RNA identifiziert [117]. dsRNA zählt zu einem bekanntem viralen Motiv, das von vielen Viren während ihres Vermehrungszykluses gebildet wird. Zu den TLR3 Liganden zählt außerdem noch genomische RNA die von dsRNA Viren (z.B Reoviren) produziert wird, sowie dsRNA die während der Replikation von ssRNA Viren (z.B. IAV, EMCV, WNV) und dsDNA Viren (z.B. HSV-a, MCVM) gebildet wird [135].

Durch das synthetische Analogon von dsRNA Polyinosin-Polycytidyl-Säure (Poly(I:C)), wird eine virale Infektion nachgeahmt und durch NFκB-Aktivierung nachfolgend die Produktion von Typ1 IFN und inflammatorischen Zytokinen, die antivirale Immunantwort induziert. Die

Erkennungsmechanismen erklären sich durch die strukturelle Analyse der Ektodomäne, die die dsRNA bindet [136]. Demnach spielt TLR3 eine wichtige Rolle beim Unterbinden von Virusinfektionen. TLR3 wird unter anderem in $CD8\alpha^+$ DCs, die eine hohe phagozytotische Aktivität für apoptotische und virusinfizierte Zellen aufweisen exprimiert [137].

TLR9

TLR9 erkennt unmethylierte CpG-DNA-Motive, die oft in Bakterien und Viren und weniger in Säugetierzellen vorkommen [134, 138]. Erstmals konnte in TLR9-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) zu keiner Erkennung kam [138]. Mithilfe synthetischer CpGs kann TLR9 aktiviert werden und eine DC-Ausreifung, die Produktion inflammatorischer Zytokine ausgelöst werden. TLR9 agiert demnach als Sensor für eine DNA-Virus Infektion. TLR9 ist intrazellulär lokalisiert, so dass auch die Erkennung der CpG-DNA intrazellulär erfolgt [139].

1.3.5.4 Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden durch TLRs

Wenn TLRs mit ihren jeweiligen Liganden stimuliert werden, führt dies zu einer Aktivierung des Signaltransduktionsweges. Sie besitzen eine mit leucin-reichen Sequenzen ausgestattete Ektodomäne, sowie eine zytoplasmatische TIR-Domäne. Über die TIR-Domänen (TIR=Toll/IL-1-Rezeptor) in IL-1R, dToll bzw. TLRs werden hoch konservierte Signal-kaskaden ausgelöst die ausschlaggebend für die Signalübertragung sind [114]. So werden Informationen mit intrazellulären biochemischen Abläufen weitergeleitet. Durch Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen durch Protein-kinasen werden Transkriptionsfaktoren aktiviert und die Expression verschiedener Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind, induziert. Welche Genmuster das sind, hängt davon ab welcher Rezeptor aktiviert wurde [140].

Nach einer TLR-Aktivierung werden Signalkaskaden ausgelöst die unter anderem zu einer NF κ B-Translokation führen und in der Transkription verschiedener Gene wie TNF- α resultieren [141]. Bei dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, welches als Antwort auf Infektionen mit verschiedenen Pathogenen freigesetzt wird [142].

Verschiedene Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Genexpression, je nach Ligand induzieren die TLRs unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. So wird die Produktion wichtiger Mediatoren der angeborenen Immunantwort, wie proinflammatorische Zytokine und Chemokine, antimikrobielle Peptide ausgelöst um so die Abwehr des Wirtsorganismus gegen Pathogene zu gewährleisten.

Die inflammatorische Reizantwort wird über MyD88 und die anschließende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Kinasen (NF κ B, MAP-Kinase) eingeleitet. MyD88 (myeloid-

differentiation-primary-response-gene 88) ist ein Adaptorprotein, das nicht nur vom IL-1 Rezeptor genutzt wird. Es ist über seine TIR-Domäne mit verschiedenen TLRs assoziiert [116] und wird von allen TLR, mit Ausnahme von TLR3, genutzt.

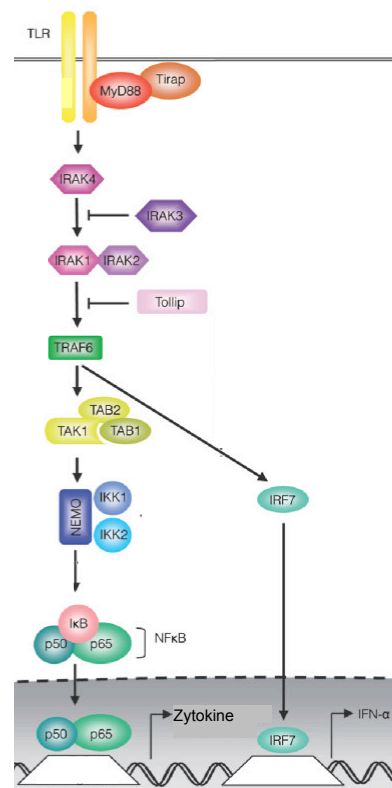


Abbildung 13: TLR-Signalkaskade (verändert nach: [143])

Das Einsetzen weiterer oder alternativer Adaptormoleküle ermöglicht den TLRs im gleichen Zelltyp eine unterschiedliche Genexpression auszulösen. Inzwischen sind drei weitere Adaptormoleküle mit TIR-Domäne bekannt, TIR domain-containing adapter protein (TIRAP), TIR domain-containing adapter inducing IFN-β (TRIF) und TRIF-related adaptor molecule (TRAM) [118]. Der TRIF-Signalweg endet in der IRF3 und NFκB-Aktivierung. Die NFκB-Aktivierung ist im nächsten Kapitel näher beschrieben. TRIF rekrutiert TRAF6 und TRADD, welche über NEMO zur NFκB- und MAPK-Aktivierung und so zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Typ1 IFN führt. TRAM und TIRAP fungieren als sortierende Adaptorproteine, die TRIF für TLR4 und MyD88 für TLR2 und 4 rekrutieren [144].

Welche Immunantwort letztendlich von einem TLR-Ligand ausgelöst wird hängt zum einen von der Verwendung des Adaptormoleküls und der differentiellen Rezeptorexpression auf unterschiedlichen Zellen ab. Zudem spielt es auch eine Rolle welches zelluläre Kompartiment erreicht werden muss um schließlich ein Signal auszulösen. TLRs reagieren auch auf endogene Wirtsmoleküle und lösen eine inflammatorische Immunantwort aus. Meist werden sie von sterbenden Zellen oder von Tumorzellen produziert (z.B. HSP, HMGB1). HMGB1 wird z.B. von nekrotischen Zellen oder während einer Entzündung abgegeben und von TLR9 (und TLR4) erkannt [144].

Das von allen eukaryotischen Zellen exprimierte HMGB1 ist ein in der Evolution hochkonserviertes Kernprotein, das mit DNA interagiert [145]. HMGB Proteine wurden vor über 40 Jahren entdeckt und nach ihrer hohen Mobilität in Polyacrylamidgelen erstmal als HMG1 benannt [146]. Im Kern reguliert HMGB1 die Chromatinstruktur und Transkription, ist aber auch im Zytosol und extrazellulärer Flüssigkeit zu finden [147]. HMGB1 wird in erster Linie von nekrotischen Zellen abgegeben, während der Apoptose wird es nur in geringem Maß freigesetzt [148]. Im Gegensatz zu dieser passiven Abgabe, kann eine HMGB1-Translokation auch aktiv erfolgen und von stimulierten Zellen abgegeben werden [147].

Werden pDCs und mDCs mit CpG-ODNs stimuliert kommt es zu einer HMGB1-Abgabe die die autokrine IFN- α Produktion reguliert. Bildet HMGB1 mit DNA einen Komplex resultiert das in einer Assoziation von RAGE mit TLR9 und führt zu einer effizienteren Übergabe von DNA zu TLR9. Also kann man davon ausgehen, dass durch den HMGB1-DNA-Komplex außer nukleärer DNA auch extrazelluläre DNA gebunden werden kann und so immunregulatorische Effekte auslöst. So ist eine Verbindung zwischen Transmembranrezeptoren auf der Oberfläche und endosomlokalisierten TLRs hergestellt wird [149]. Außer als Transkriptionsfaktor wirkt HMGB1 auf vielfache Weise. Es wirkt unter anderem als proinflammatorisches Zytokin [150], und ist beteiligt an der Transkription, DNA-Reparatur, Zelldifferenzierung und -entwicklung sowie extrazellulären Signalwegen [151].

1.3.5.5 NF κ B und I κ B

Der hochkonservierte Transkriptionsfaktor NF κ B wird unter anderem als zentraler Mediator der menschlichen Immunantwort bezeichnet [152]. Es handelt sich um einen ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor. Signale die eine NF κ B-Aktivierung auslösen werden über TLRs, TNF- α -Rezeptoren oder IL-Rezeptoren erkannt. Zu den Aktivierungssignalen gehören infektiöse Agenzien wie Viren, Parasiten, Bakterien und deren Produkte sowie zelluläre Botenstoffe (z.B Zytokine). Auch biochemische Reize und physikalischer Stress wie ionisierende oder UV-Strahlung, können eine NF κ B-Aktivierung auslösen [153]. Somit handelt es sich bei NF κ B um einen pluripotenten Aktivierungsfaktor der die Regulation der Transkription von vielen Genen, insbesondere solcher, die für die Entzündung sowie die angeborene und erworbene Immunantwort von Bedeutung sind übernimmt [154]. Der Name NF κ B beinhaltet heute verschiedene Transkriptionsfaktoren, die strukturell als Dimere bezeichnet werden, also aus zwei Untereinheiten bestehen, die homo- oder heterodimerisieren können. Die Familie von Signalproteinen wird auch als Rel-Familie bezeichnet. In Säugetieren wurden bisher 5 Untereinheiten der NF κ B/Rel-Proteine identifiziert: p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p50/p105 (NF κ B1) und p52/p100 (NF κ B2). Das klassische Dimer besteht dabei aus p65/p50 (RelA und NF κ B1) [155].

Durch Bindung an Inhibitor-Proteine der IκB-Familie (Inhibitor of KappaB) liegen die NFκB-Proteine im Zytosol in inaktiver Form vor. Im Zytosol befindet sich die aktivierte Form, die in den Zellkern wandern kann [156]. Spezielle Domänen der IκB-Isoformen (z.B. IκBα) maskieren die NFκB-Kern-Lokalisations-Sequenzen und sind wesentlich an der NFκB-Regulation beteiligt [155]. Nach Aktivierung durch einen Stimulus erfolgt eine proteolytische Degradation verschiedener IκB-Mitglieder. Über TRAF6 und weitere Zwischenschritte kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes (IκK-Kinase-Komplex), der aus den Kinasen IKKα und IKKβ sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO (NFκB essential modulator) besteht. Der Abbau von IκBα führt zu einer Demaskierung des Kernlokalisierungssignals von NFκB und ermöglicht so eine Translokation von NFκB in den Kern. Dort bindet es in Promotorregionen bestimmter Gene an die DNA und aktiviert die Transkription und Induktion verschiedener Zytokine, Akute-Phase-Proteinen und Zell-Adhäsions-Molekülen [155] und ist so ein wichtiger Regulator der Expression proinflammatorischer Gene.

Der hier beschriebene klassische Signalweg hängt in erster Linie vom IκB-Komplex ab und es werden hauptsächlich p65-haltige Dimere, besonders das p65/p50-Dimer, aktiviert [157].

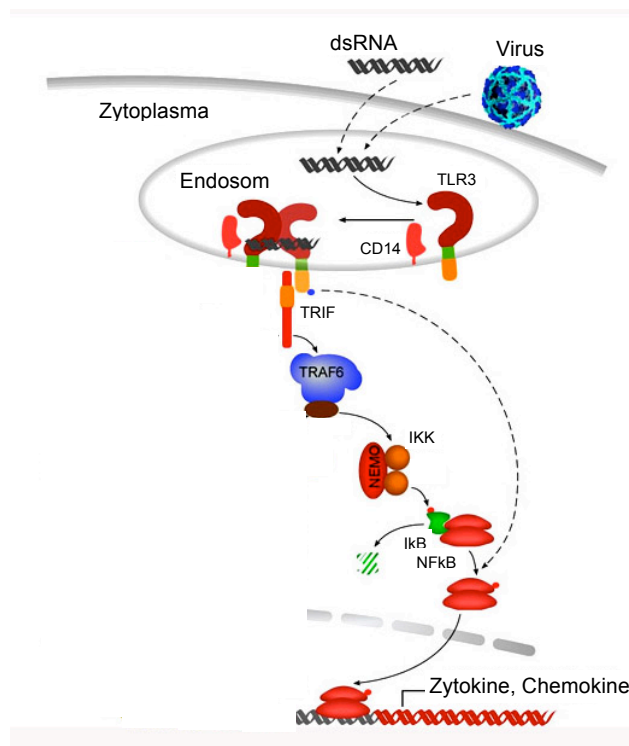


Abbildung 14: TLR-Signalweg mit anschließender NFκB-Aktivierung (verändert nach: <http://labs.mmg.pitt.edu/sarkar/Signaling.htm>)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die funktionelle Rolle der Toll-like Rezeptoren (TLRs) und ihrer Signalwege bei der Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) durch H-1PV-induzierte Tumorzelllysate (TCL) untersucht werden. Im Vordergrund der Untersuchungen steht hier der Einsatz von onkolytischen Viren die bei Patienten mit malignen Erkrankungen (Virotherapie) ein vielversprechendes Gebiet der Forschung darstellen. Das autonome Parvovirus H-1 ist in der Lage einen onkosuppressiven Effekt auszulösen, der bei unterschiedlichen Tumorarten greift [17] und u.a. zu einer Aktivierung dendritischer Zellen führt. Hierbei sind TLRs von großer Bedeutung [112].

Um der Frage nachzugehen, welche TLRs an der Erkennung von H-1PV beteiligt sind, wird ein System gewählt, indem die Analyse einzelner TLRs möglich ist. Dazu sollen Zelllinien erzeugt werden, die jeweils einen humanen TLR stabil exprimieren. Da HEK293 Zellen keine TLRs exprimieren [158] aber die Signalwegkomponenten besitzen, eignen sie sich besonders für eine Transfektion mit humanen TLRs. Mit Hilfe des TLR-Transfektionssystems soll die TLR-Expression nach H-1PV Infektion analysiert werden. Der TLR-Aktivierung folgt eine Reihe von Signalkaskaden, von denen die Translokation von NFκB aus dem Zytoplasma in den Zellkern ein wesentliches Merkmal ist. Demnach soll analysiert werden ob einer Erkennung von H-1PV an der TLRs beteiligt sind, eine Aktivierung oder Änderungen der NFκB-Expression und Aktivität auslöst. Da die NFκB-Aktivierung *in vivo* eine direkte Reaktion auf eine Aktivierung der TLRs darstellt und über eine Reportergenaktivität gemessen werden kann, stellt dies eine gute Untersuchungsmöglichkeit dar.

Zusätzlich sollen diese Analysen in einem geeigneten humanen System erfolgen. Das humane Melanommodell stellt ein System dar, welches der *in vivo* Situation viel eher entspricht. So soll spezifisch der Frage nachgegangen werden, ob und in welcher Form die DC-Aktivierung durch das Parvovirus H-1 über TLRs abläuft.

Um die Interaktion der H-1PV-induzierten Tumorzelllysaten mit DCs zu analysieren, soll hier die Expression von Toll-like Rezeptoren und des DC-Reifungsmarkers CD86 analysiert werden. Wie bereits bekannt, führt die TLR-Aktivierung und deren gesteigerte Expression zu einer erhöhten Anzahl von Aktivierungsmarkern auf den dendritischen Zellen [159].

Diese Analysen sollen nach einer Kokultur der DCs mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen erfolgen. Außerdem soll der Signalweg in den DCs anhand einer Analyse der Involvierung des TLR-Zieltranskriptionsfaktors NFκB analysiert werden. Schließlich soll die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF-α, das als ein zusätzliches Zeichen der DC-Aktivierung dient untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 Lösungsmittel und Chemikalien

2.1.1 Lösungsmittel p.a.

| | |
|-------------|-----------------------------|
| DMSO | Roth, Karlsruhe |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Riedel de Haën, Seelze |
| Isopropanol | Fisher Scientific, Schwerte |
| Methanol | Fisher Scientific, Schwerte |

2.1.2 Chemikalien

| | |
|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Lipopolysaccharid | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Nonidet P-40 | ICN, Eschwege |
| Gibco®RPMI 1640 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Acrylamid-Bis-Fertiglösung | Roth, Karlsruhe |
| APS | ICN, Eschwege |
| Agar | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Blasticidin S HCl | Invivogen, San Diego, California |
| Bradford-Reagenz | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Bromphenolblau | Roth, Karlsruhe |
| BSA | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| CaCl ₂ | ICN, Eschwege |
| Deoxynucleoside Triphosphate (dNTP) set | Bioline, Luckenwalde |
| DMEM | Invitrogen, Karlsruhe |
| DTT | Roth, Karlsruhe |
| ECL Western Blotting detection reagent | Amersham Biosciences, Buckinghamshire |
| EDTA | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid (10 mg/mL) | Roth, Karlsruhe |
| Fetales Kälberserum | Invitrogen, Karlsruhe |
| FuGENE 6 Transfection Reagent | Roche, Mannheim |
| GeneRuler | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| HCl | Roth, Karlsruhe |
| KCl | Merck, Darmstadt |
| Luciferase Assay Reagent | Promega, Mannheim |
| 2-Mercaptoethanol (2-ME) | Invitrogen (Gibco), Karlsruhe |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe |
| MgCl ₂ | Roth, Karlsruhe |
| M-MLV Reverse Transcriptase | Promega, Mannheim |
| MTT | Sigma, München |
| NaCl | Roth, Karlsruhe |
| Na ₂ CO ₃ | Roth, Karlsruhe |
| NaOH | Merck, Darmstadt |
| Na-Pyrophosphat | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Neutralrotlösung | Life Technologies, Karlsruhe |
| Non-essential Amino Acids; MEM 100x | Invitrogen (Gibco), Karlsruhe |
| 6x Orange G dye | ICN Biomedicals, Eschwege |
| Phenolrot | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| PMSF | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| PBS | Invitrogen (Gibco), Karlsruhe |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Random Primer | Promega, Mannheim |
| RNasin, Ribonuclease Inhibitor | Promega, Mannheim |
| SDS | Roth, Karlsruhe |
| Taq DNA Polymerase | Invitrogen (Gibco), Karlsruhe |
| TCA | Merck, Darmstadt |
| TEMED | Roth, Karlsruhe |
| TMB | Sigma, München |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Trypanblau | ICN, Eschwege |
| Trypsin/EDTA 1x | PAA, Pasching, Austria |
| Tween 20 % | Sigma, München |

2.1.3 Zytokine

| | |
|--------------|-------------------------------|
| GM-CSF | Sandoz, Nürnberg |
| IL-1 β | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| IL-4 | Miltenyi Biotec |
| IL-6 | Strathmann, Hannover |

| | |
|------------------|-------------------------------|
| PGE ₂ | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| TNF- α | Strathmann, Hannover |

2.1.4 TLR-Liganden und Inhibitoren, NF κ B-Inhibitor

| | |
|-------------|----------------------------------|
| Poly(I:C) | InvivoGen, San Diego, California |
| CpG | InvivoGen, San Diego, California |
| Zymosan | InvivoGen, San Diego, California |
| Celastrol | InvivoGen, San Diego, California |
| Chloroquine | InvivoGen, San Diego, California |

2.2 Zelllinien

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Referenz | Quelle |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| HEK293 | Humane embryonale Nierenzellen | Use of Toll-Like Receptor Assays To Detect and Identify Microbial Contaminants in Biological Products [160] | DKFZ |
| U937 | Monoz. Lymphomzellen | Lipopolysaccharide Activates Distinct Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cell Lines Expressing Toll-Like Receptors [161] | DKFZ |
| HT29 | Kolonkarzinomzellen | Lipopolysaccharide Activates Distinct Signaling Pathways in Intestinal Epithelial Cell Lines Expressing Toll-Like Receptors [161] | DKFZ |
| Jurkat | Leukämie-T-Zelllinie | Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- Production by Memory CD4-T Cells [131] | DKFZ |
| SK29-Mel | humane Melanomzellen | Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic t lymphocytes (CTL) [162] | Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. T. Wölfel zur Verfügung gestellt. |

HEK293

Bei den HEK293 Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells, HEK), die adhären wachsen. Die Zelllinie gibt es seit dem Anfang der 70er Jahre und sie ist ein Transformationsprodukt. In das Erbgut der humanen embryonalen Nierenzelle wurden Teile des viralen Genoms des Adenovirus 5 eingebaut [163]. HEK293 Zellen sind besonders für Transfektionsversuche geeignet, da sie Plasmid-DNA mit hoher Effizienz aufnehmen.

Durch den Einbau von Fremd-DNA (Transformation) wurde den Zellen die künstliche Charaktereigenschaft einer Krebszelle gegeben. HEK293 Zellen zählen zu den etablierten humanen Zelllinien, die zwar DNA-Teile eines Virus enthalten, aber keine infektiösen Partikel abgeben.

SK29Mel

Die Tumorzelllinie SK29Mel-1 wurde aus dem männlichen Patienten SK29 mit metastasiertem malignen Melanom etabliert. Dieser hat den HLA-A2 Phänotyp, demnach ist die Zelllinie HLA-A2 positiv [108].

2.3 Virusstamm

wt Parvovirus H-1

DKFZ, Heidelberg

Prof.J. Rommelaere

2.4 Plasmide

pUNO-hTLR3

InvivoGen, San Diego, California

pUNO-hTLR9-HA

InvivoGen, San Diego, California

pUNO-hTLR2/CD14

InvivoGen, San Diego, California

pUNO-hTLR4/CD14

InvivoGen, San Diego, California

pUNO-hTLR2/6

InvivoGen, San Diego, California

pNiFty-Luc

InvivoGen, San Diego, California

2.4.1 Restriktionsenzyme

Age I

NEB, Frankfurt

Nhe I

NEB, Frankfurt

SmaI

NEB, Frankfurt

XhoI

NEB, Frankfurt

2.5 Primer

Folgende Primer wurden für den PCR-Nachweis der TLR-Expression verwendet [164]:

Primersequenzen: [5' → 3']

TLR1: 5' CTG GTA TCTCAG GAT GGT GTG C
3' TTG GAG TTC TTC TAA GGG TAT GTT CC

TLR2: 5' GGC CAG CAA ATT ACC TGT GTG
3' AGG CGG ACA TCC TGA ACC T

TLR3: 5' TCC CAA GCC TTC AAC GAC TG
3' TGG TGA AGG AGA GCT ATC CAC A

TLR4: 5' CTG CAA TGG ATC AAG GAC CA
3' TTA TCT GAA GGT GTT GCA CAT TCC

TLR5: 5' TCG AGC CCC TAC AAG GGA A
3' CAC TGA GAC TCT GCT ATA CAA GCT A

TLR6: 5' CTA TTG TTA AAA GCT TCC ATT TTG T

3' ACC TGA AGC TCA GCG ATG TAG TTC
TLR7: 5' TTA CCT GGA TGG AAA CCA GCT AC
 3' TCA AGG CTG AGA AGC TGT AAG CTA
TLR8: 5' GAG AGC CGA GAC AAA AAC GTT C
 3' TGT CGA TGA TGG CCA ATC C
TLR9: 5' TGG TGT TGA AGG ACA GTT CTC TC
 3' CAC TCG GAG GTT TCC CAG C
TLR10: 5' GAA AGG TTC CCG CAG ACT TG
 3' TGG AGT TGA AAA AGG AGG TTA TAG

Desweitern wurden GAPDH-Primer zur Kontrolle verwendet.

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| Anti-Aktin, Kaninchen-IgG | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Anti-Tubulin, Maus-IgG | Sigma-Aldrich Chemie, München |
| Anti-IkB α , Maus-IgG | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-NF κ B p65, Ziege-IgG | Santa Cruz, Biotechnology Inc., Heidelberg |
| Anti-CD86, PE-konjugiert | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-NF κ B, PE-konjugiert | Santa Cruz, Biotechnology Inc., Heidelberg |
| Anti-HMGB1, Kaninchen-IgG | abcam, Cambridge, UK |
| Anti-TLR2, Maus-IgG | Santa Cruz, Biotechnology Inc., Heidelberg |
| Anti-TLR4, Maus-IgG | Santa Cruz, Biotechnology Inc., Heidelberg |
| Anti-TLR2, Biotin-konjugiert | InvivoGen, San Diego, California |
| Anti-TLR3, PE-konjugiert | InvivoGen, San Diego, California |
| Anti-TLR4, PE-konjugiert | InvivoGen, San Diego, California |
| Anti-TLR9, PE-konjugiert | InvivoGen, San Diego, California |

2.6.2 Sekundärantikörper

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------------|
| Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert | Bio-Rad Laboratories, München |
| Anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert | Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg |
| Anti-Ziege-IgG, HRP-konjugiert | Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg |
| Anti-Avidin, HRP-konjugiert | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |

2.7 Größenstandards

2.7.1 DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandard wurden verschiedene Marker verwendet. Die Marker enthalten DNA-Fragmente von genau definierter Größe und dienen somit zur Quantifizierung der DNA-Fragmente in Agarosegelen.

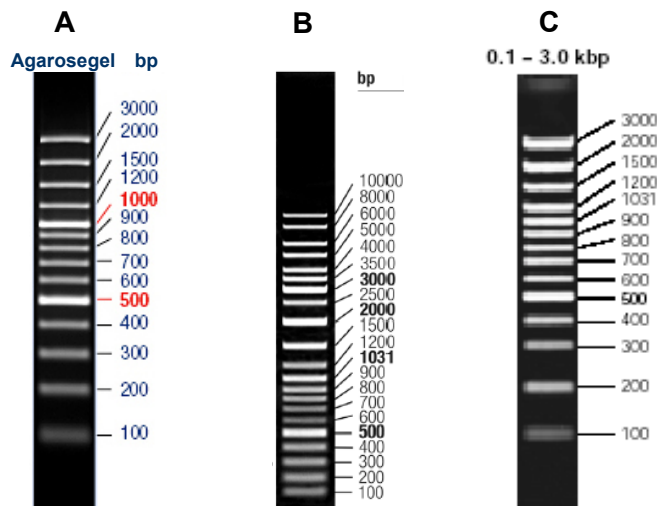


Abbildung 15: DNA-Leiter A: GeneRuler™ 100 bp Plus, B: GeneRuler DNA Ladder Mix, C: PeqGold 100bp DNA-Leiter Plus

2.7.2 Protein-Molekulargewichtstandard

Der peqGOLD Prestained Protein-Marker IV besteht aus einer Mischung von zehn rekombinanten Proteinen. Diese wurden in *E.coli* hergestellt und hochaufgereinigt. Der Größenbereich der Proteine liegt zwischen ca. 10 kDa bis 170 kDa. Der Protein-Marker ist in Ladepuffer aufgenommen und kann direkt auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen werden. Zudem wurde der BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder von Invitrogen verwendet.

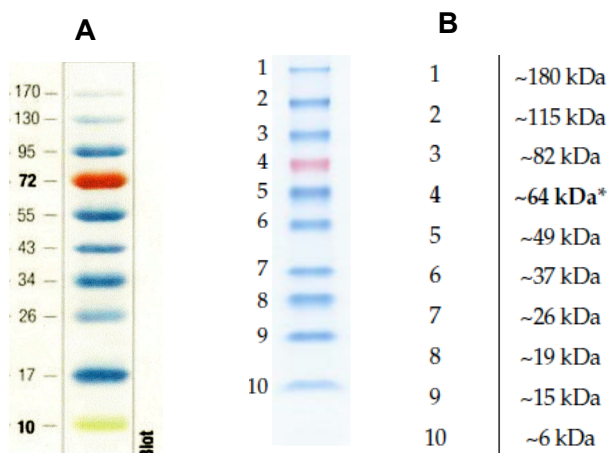


Abbildung 16: Protein-Leiter A: peqGOLD Prestained Protein-Marker IV B: BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder von Invitrogen

2.8 Medien, Puffer und Lösungen

2.8.1 Medien für Zellkultur

Das Kälberserum wurde vor der Verwendung bei 56 °C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Die Medien wurden bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

RPMI

| | | |
|--------------|-----|-------|
| RPMI 1640 | 500 | ml |
| FCS | 10 | % |
| Penicillin | 100 | U/ml |
| Streptomycin | 100 | µg/ml |

DMEM

| | | |
|--------------|-----|-------|
| DMEM | 500 | ml |
| FCS | 10 | % |
| Penicillin | 100 | U/ml |
| Streptomycin | 100 | µg/ml |

DMEM

| | | |
|----------------------------------|-----|-------|
| DMEM | 500 | ml |
| FCS | 10 | % |
| Hepes [1 M] | 25 | mM |
| Mercaptoethanol [50 mM] | 100 | µg/ml |
| Glutamin [200 mM] | 1 | % |
| Non-Essential-Amino-Acids [100x] | 1 | % |

Einfriermedium für Zellen

| | | |
|------|----|---|
| FCS | 90 | % |
| DMSO | 10 | % |

Einfriermedium für Monozyten

| | | |
|-------------------|----|-------|
| humanes AB-Plasma | 90 | % |
| DMSO | 10 | % |
| Heparin | 1 | IE/ml |

DC-Medium

| | | |
|--------|---|---|
| X-VIVO | 1 | L |
|--------|---|---|

Hepes: 1 M, pH 7, steril filtrieren
(0,2 µm Filter)

2.8.2 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben jeweils auf 1 Liter deionisiertes Wasser.

Zellyse (RIPA)-Puffer (Western Blot)

| | | |
|----------------|-----|----|
| Tris-HCl, (1M) | 50 | mM |
| NaCl (1M) | 120 | mM |
| NP-40 | 1 | % |
| SDS | 1 | % |

| | | |
|----------------------------------------------------------|-------|---------|
| Kurz vor Gebrauch zugeben: | 10 | µl/ml |
| PMSF (100 mM) | 10 | µl/ml |
| DTT (1 M) | 1 | µl/ml |
| Protease Inhibitor | 10 | µl/ml |
| EDTA | | |
| 10x Lämmli-Puffer (Western Blot) | 2 | M |
| Glycin | 250 | mM |
| Tris | | |
| SDS Lauf-Puffer (Western Blot) | | |
| 10x Lämmli-Puffer | 100 | ml |
| SDS (10%) | 10 | ml |
| Probenauftragspuffer (5x) (Western Blot) (-20 °C) | | |
| Tris (pH 6,8) | 50 | mM |
| SDS | 10 | % |
| Glycerin | 50 | % (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,25 | mg/ml |
| β-Mercaptoethanol | 25 | % |
| Blotpuffer (Western Blot) | | |
| Methanol | 20 | % |
| konz. Lämmli-Puffer | 0,5 | % |
| SDS | 0,1 | % |
| pH 8,3 | | |
| Waschpuffer (Western Blot) | | |
| TBS-Puffer (10x) | 100 | ml |
| Tween 20 | 600 | µl |
| dH ₂ O | 900 | ml |
| TBS-Puffer (10x) (Western Blot) | | |
| Tris | 60,5 | g/l |
| NaCl | 82,0 | g/l |
| pH | 7,2 | |
| TBST-Puffer (Western Blot) | | |
| Tween 20 | 600,0 | µl/l |
| in 1x TBS-Puffer | | |
| Blocking-Puffer (Western Blot) 4 ° C | | |
| Milchpulver | 5,0 | % (w/v) |
| Tween | 0,05 | % |
| in 1x PBS-Puffer | | |
| Strip-Puffer (Western Blot) | | |
| Glycin | 200 | mM |
| SDS | 100 | mM |
| pH 3,0 | | |
| Ponceaurot-Lösung (Western Blot) | | |
| Essigsäure | 3 | % (v/v) |
| Ponceau S | 0,1 | % (w/v) |

| | | |
|-----------------------------------------|------|-------|
| TBE-Puffer (10x) (PCR) | 89 | mM |
| Tris | 89 | mM |
| Borsäure | 2 | mM |
| EDTA-Disodium | | |
| pH 8,3 | | |
| 2x HBSS (Transfektion) | | |
| NaCl | 280 | mM |
| Hepes | 50 | mM |
| Glucose | 12 | mM |
| KCl | 10 | mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,5 | mM |
| pH 7,05 | | |
| 10x Beladungspuffer (PCR) | | |
| Glycerin | 10 | % |
| Bromphenolblau | 0,4 | % |
| Xylencyanol | 0,4 | % |
| Ethidiumbromid-Stammlösung (PCR) | 10 | mg/ml |
| Coating-Puffer (ELISA) | | |
| Carbonat/Bicarbonate | 100 | mM |
| pH 9,6 | | |
| Blockpuffer (ELISA) | | |
| BSA | 1 | % |
| in 1x PBS | | |
| Waschpuffer (ELISA) | | |
| TWEEN-20 | 0,01 | % |
| in 1x PBS | | |
| Dilution-Puffer (ELISA) | | |
| TWEEN-20 | 0,05 | % |
| BSA | 1 | % |
| in 1x PBS | | |

2.9 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------|------------------------------------------|
| Braunülen | Braun, Melsungen |
| ECL-Hyperfilm | Amersham Biosciences, Buckinghamshire |
| FACS-Röhrchen | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Filtereinheiten | Fisher Scientific, Schwerte |
| Filter Units | NALGENE NUNC, Wiesbaden |
| Glaspasteurpipetten | VWR, Darmstadt |
| Gel-Blotting-Papier | Schleicher und Schüll, Dassel |
| Kanüle | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Kryoröhrchen | Nalge Company, New York |

| | |
|-----------------------------------|------------------------------------------|
| Nitrozellulosemembran | Amersham Biosciences, Buckinghamshire |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| Sterile Plastikpipetten | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Sterile Plastikröhrchen (Falcons) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Sterilfilter | Nalge Company, New York |
| 10-/15- cm Schalen | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Whatman-Papier | Schleicher und Schüll, Dassel |
| 6-, 12-, 24-, 96-well Platten | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturflaschen | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellschaber | Sigma-Aldrich Chemie, München |

2.10 Geräte

| | |
|----------------------------|--------------------------------------------|
| Binokular | Zeiss, Jena |
| CO ₂ -Inkubator | Heraeus, München |
| Destillationsanlage | Millipore, USA |
| Durchflusszytometer | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Elektrophoresekammer | Biorad, München |
| ELISA-Reader X-Fluor | Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall |
| Entwicklermaschine | Fuji, Düsseldorf |
| Gefrier- und Kühlschränke | |
| 4 °C/-20 °C | Bosch, Stuttgart |
| -80 °C | Forma Scientific, Marietta/USA |
| Gelgießkammer | Biorad, München |
| Gene Amp PCR System 9700 | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Heizblock | Eppendorf, Hamburg |
| Kolbenhubpipette | Eppendorf, Hamburg |
| Luminometer | Pharmingen, San Diego, USA |
| Magnetrührer | Heidolph, Schwabach |
| Mehrkanalpipette | Eppendorf, Hamburg |
| | Socorex, Ecublens, Schweiz |
| Neubauer-Zählkammer | Labotec, Wiesbaden |
| Pipetten 0-1000 µl | Eppendorf, Hamburg |
| | VWR, Darmstadt |

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Pipettierhilfe | Müller, Dreieich-Buchsschlag |
| pH-Meter | WTW Inolab, Weilheim |
| Röntgenfilmkassette | Dr. Goos-Suprema, Heidelberg |
| Rollschüttler | Neolab, Heidelberg |
| Semidryblotter | Bio-Rad, München |
| Spannungsgerät | Consort, Turnhout |
| Sterilwerkbank | Clean Air, Deutschland |
| Stickstoffbehälter Arpego 40 | Air Liquide, Marne-la-Vallée |
| Thermal Cycler MJ Research PTC 200 | Biorad, München |
| Vakuum-Absauganlage | Neolab, Heidelberg |
| Vortexer | IKA, Staufen |
| Waage | Scaltec, Heiligenstadt |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Wiegeschüttler | Neolab, Heidelberg |
| Zentrifugen | Sigma 3-18K Fisher Bioblock Scientific, Heraeus, München |

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Zur Kultivierung dienten Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 - 150 cm². Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage nach Medientfernung passagiert und in frischem Medium weiter kultiviert. Die Zellkulturflaschen wurden bis zu dreimal verwendet bevor die Zellen in neue Flaschen überführt wurden. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt.

3.1.1.1 Adhärente Zellen

Sobald adhärente Zellen ein konfluentes Wachstum aufweisen sowie zu deren Vermehrung wurden sie passagiert. Durch Behandlung mit PBS/EDTA oder Trypsin wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden je nach Bedarf und Wachstumsgeschwindigkeit in gewünschter Verdünnung in frischem Medium neu ausgesät.

3.1.1.2 Suspensionzellen

Zellen, die sich in Suspension befinden wurden unter den gleichen beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Zellkulturflaschen wurden allerdings stehend im Brutschrank aufbewahrt. Zum Passagieren wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt, in frischem Medium resuspendiert und ein definierter Teil je nach Bedarf und Zelltyp in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.2 Kryokonservierung

Durch Gefrierkonservierung können Zellen über einen langen Zeitraum gelagert werden. Da es beim Einfrieren der Zellen durch Eiskristallbildung zu Zellschädigungen kommen kann, wird für das Einfrieren humaner Tumorzellen ein Einfriermedium aus 90 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxyd (DMSO) gewählt. DMSO verhindert als kryoprotektive Substanz die Ausbildung von Eiskristallen. Nach vorheriger Auszählung wurden 3-5x10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Um ein langsames Abkühlen zu erreichen, wurden die Kryoröhrchen zunächst in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierkammer zunächst für mindestens 24 Stunden bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der in den Kryoröhrchen enthaltenen Zellsuspension erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Da DMSO bei einer Raumtemperatur (RT) von 23 °C einen zytotoxischen Effekt entfaltet, muss der Auftauprozess kurz vor dem kompletten Auftauen der gesamten Zellsuspension beendet werden. Die Zellsuspension wurde anschließend mit dem jeweiligen Kulturmedium verdünnt und bei 1.500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät. 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die mit Hilfe von Trypsin oder PBS/EDTA gelösten und abzentrifugierten Zellen wurden in 5 ml frischem Medium aufgenommen. Nach Anfärben von 10 µl dieser Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung wurden 10 µl der trypanblau-verdünnten Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die vier Großquadrante unter dem Binokular ausgezählt. Beschädigte Zellen werden durch den Farbstoff Trypanblau angefärbt, das durch verletzte Zellwände permeiert. Diese Kontrastierung ermöglicht es die lebenden von den abgestorbenen Zellen zu unterscheiden und somit die Auszählung zu erleichtern.

Die Zellkonzentrationsbestimmung geschieht nach folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = (\text{Zellzahl der Großquadrante}/4) * \text{Verdünnung} * 10^4$$

3.1.5 Methoden zur Bestimmung zytotoxischer Effekte

3.1.5.1 Färbung mit Kristallviolett nach McCoy

Der Farbstoff Kristallviolett färbt nur vitale Zellen an und eignet sich somit zur Zytotoxizitätsbestimmung. Zur Bestimmung der Zytotoxizität des Parvovirus H-1 wurden 5×10^4 Zellen/well in 24-well Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit drei verschiedenen MOIs (0,2, 2 und 20) wie unter 3.2 beschrieben infiziert. Um eine Zeitkinetik zu erstellen, wurde nach 0, 48, 96, 144, 192 und 240 Stunden jeweils das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol : Eisessig im Verhältnis 3:1 bei 4 °C für 20 Minuten fixiert. Danach erfolgte ein 20-minütiger Waschschrift mit 70 %igem Ethanol. Das Ethanol wurde daraufhin verworfen und die Platten an der Luft getrocknet. Die getrockneten Zellen wurden für eine Stunde bei RT mit 200 µl Kristallviolett gefärbt, anschließend mit Wasser gewaschen und getrocknet. Vitale Zellen waren nun angefärbt. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der Absorption bei 560 nm.

3.1.5.2 MTT-Assay

Um subtoxischen und toxischen Bereiche einer Substanz zu bestimmen, kann die Vitalität von Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration dieser Substanz mittels MTT-Assay untersucht werden. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) ist ein gelbes wasserlösliches Tetrazoliumsalz, welches in lebenden Zellen durch membrangebundene, mitochondriale Dehydrogenasen am Tetrazolring enzymatisch gespalten wird. So entstehen wasserunlösliche blau-violette Formazankristalle. Das gelöste Formazan besitzt eine optische Dichte (OD), die direkt proportional zur Anzahl der Zellen und deren Stoffwechselaktivität ist [165].

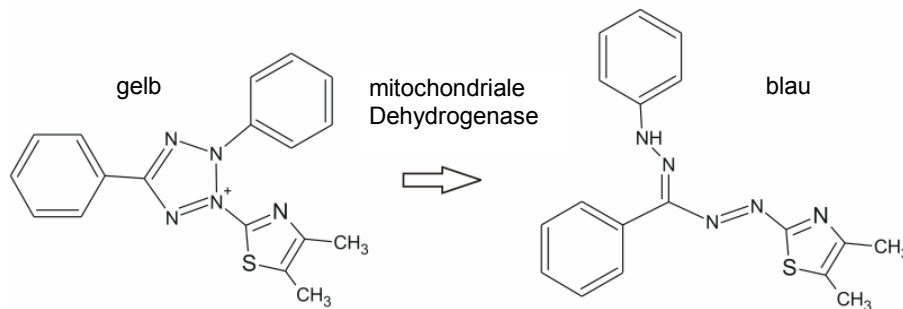


Abbildung 17: Prinzip des MTT-Assays

Durch mitochondriale Dehydrogenasen wird das wasserlösliche Tetrazoliumsalzes MTT am Tetrazolring gespalten und wasserunlösliches, blau-violettes Formazan gebildet

Lösungen:

MTT-Lösung: 5 mg/ml

Stopplösung: 10 % SDS in 0,01 M HCL

Die Zellen wurden am Tag 1 mit 9000 Zellen/well in einer 96-well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und die unterschiedlichen Konzentrationen der zu testenden Substanz zugegeben. Am Tag x erfolgte die MTT-Zugabe (10 µl/well) und eine Inkubation für 4 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂. Anschließend wurden 100 µl Stopplösung je well zugegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Messung und Auswertung bei 562 nm.

3.1.6 Dendritische Zellen

3.1.6.1 Gewinn mononukleärer Zellen

Die peripheren mononukleären Zellen wurden mit Hilfe von Leucosep®-Röhrchen der Fa. Greiner (Frickenhäuser) separiert. Dazu wurde zunächst der vollständige Inhalt des Buffy Coats in eine Zellkulturflasche entleert und mit PBS auf 100-120 ml aufgefüllt. Die Leucosep®-Röhrchen wurden mit 15 ml Biocoll Separationslösung (RT) gefüllt und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde das Blut vorsichtig in das Röhrchen gegossen. Es folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 x g ohne Bremse. Die Lymphozytenfraktion

wurde abgenommen, in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden erneut für 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und danach mit PBS ein zweites Mal gewaschen.

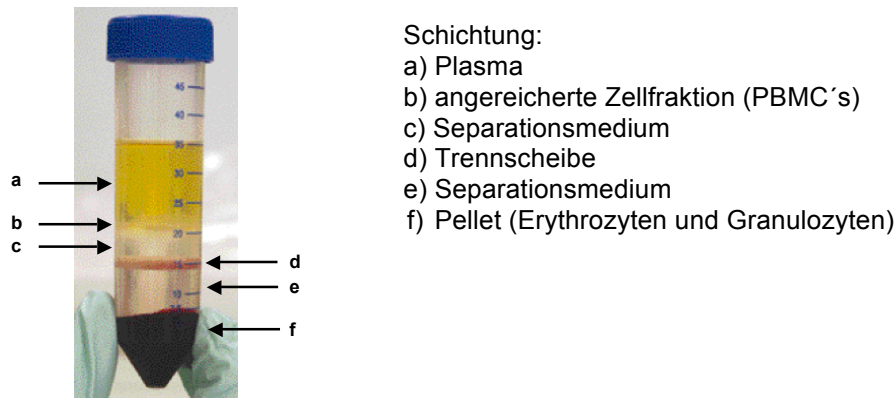


Abbildung 18: Kennzeichnung der Fraktionsschichten nach Zentrifugation

3.1.6.2 Lagerung

Zur Lagerung der PBMCs wurden die Zellen nach der Isolation in PBMC-Einfriermedium (10 % DMSO = 1,5 ml; 25.000 E Heparin = 0,66 µl in 15 ml humanen AB-Serum aus -20 °C) resuspendiert. Die Zellen eines Buffy-Coats wurden daraufhin auf fünf Cryoröhrchen verteilt und in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierkammer zunächst für mindestens 24 Stunden bei -80 °C eingefroren. Eine längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.1.6.3 Magnetassoziierte Zellsortierung (MACS)

Zur Selektion der primären Monozyten wurde das MACS-Separation System der Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach) verwendet. Die Separation erfolgte mit CD14-Microbeads nach den Angaben des Herstellers.

Die PBMCs werden im Wasserbad aufgetaut und in Puffer (PBS + 2 mM EDTA + 0,5 % BSA; steril), für 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Nach Aufnahme der Zellen in 1 ml Puffer und Zugabe von 40 µl CD14-MagneticBeads, werden sie für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden 4-5 ml Puffer zugeben und 10 Minuten zentrifugieren. Anschließend werden die Zellen in 4-5 ml Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Während der Zentrifugation wird die Säule in den Magnetblock eingespannt und mit Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wird nun auf die Säule gegeben und zwei- bis dreimal mit 3 ml Puffer gewaschen. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetblock genommen, auf ein sauberes Falcon gestellt und mit 1 ml Puffer der Stopfen langsam durchgedrückt. In der Lösung befinden sich nun die isolierten Monozyten.

3.1.6.4 Ausreifung dendritischer Zellen

Nach der Isolation der Monozyten wurden diese gezählt und die gewünschte Anzahl in Zellkulturschalen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in X-Vivo Medium mit 1000 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 für zwei Tage [166].

Um die DCs auszureifen wurde nach zwei Tagen der folgende Zytokincocktail zugegeben:

| | | | |
|--------|-----------|------------------|--------------|
| GM-CSF | 1000 U/ml | TNF- α | 10 ng/ml |
| IL-4 | 500 U/ml | IL-1 β | 10 ng/ml |
| IL-6 | 1000 U/ml | PGE ₂ | 1 μ g/ml |

Alternativ erfolgte die Ausreifung mit 1 μ g/ml LPS.

3.1.7 Kokultur

Die Kokultur wurde je nach Zellzahl in 6-well Platten oder 10 cm-Schalen durchgeführt. Die Zugabe der Tumorzellen erfolgte am zweiten Tag nach der Stimulation der isolierten Monozyten mit GM-CSF und IL-4. Die Tumorzellen wurden vor der Kokultur geerntet, abzentrifugiert und gewaschen. Die Zugabe zu den DCs erfolgte in X-Vivo Medium, um eine FCS-Kontamination zu vermeiden.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Infektion von adhärenenten Zellen

Zur Infektion von adhärenenten Zellen wurden diese am Tag zuvor ausgesät. Vor der Infektion wurde das Medium abgenommen. Danach erfolgte die Zugabe der Viruspartikel in einem möglichst kleinen Volumen an Medium. Die Zellen wurden für eine Stunde im Brutschrank inkubiert und etwa alle fünf Minuten geschwenkt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut Medium zugegeben ohne die Virussuspension vorher zu entfernen. Die Zellen wurden bis zum jeweiligen Erntezeitpunkt weiter im Brutschrank kultiviert.

3.2.2 Stimulationsexperimente mit TLR-Liganden

Zur Stimulation der jeweiligen TLRs wurden die Zellen mit den entsprechenden TLR-Liganden behandelt. Den Zellen wurden der jeweilige Ligand in der entsprechenden Konzentration zum Medium hinzugefügt.

| | | |
|---------|-----------|------------------|
| TLR3: | Poly(I:C) | → 10 μ g/ml |
| TLR9: | CpG | → 2,5 μ g/ml |
| TLR2: | Zymosan | → 10 μ g/ml |
| TLR4: | Zymosan | → 10 μ g/ml |
| TLR2/6: | Zymosan | → 10 μ g/ml |

Die stimulierten Zellen wurden nach den entsprechenden Zeitpunkten für die jeweiligen Versuche verwendet.

TLR-Blockade

Um die Beteiligung des jeweiligen TLRs zu untersuchen, wurden Inhibitionsversuche von TLR durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit dem Inhibitor Chloroquine behandelt. Chloroquine wirkt als lysosomtrophische Substanz einer endosomalen Ansäuerung entgegen. Dieser Prozess spielt allerdings bei den TLR-Signalwegen eine Rolle, so dass dieser bei Chloroquinegabe unterbrochen wird.

Chloroquine-Konzentration: 100 µM

Inhibition von NFκB

Die Inhibitionsversuche ermöglichen es einen Nachweis zu erbringen der bestätigt, dass die NFκB-Translokation nach H-1PV Infektion über TLRs erfolgt. Eine Inhibition von NFκB wurde durch Behandlung mit Celastrol erreicht. Celastrol ist ein aus der chinesischen Pflanze *Tripterygium wilfordii* isoliertes Triterpen und führt zu einer Inhibition des Transkriptionsfaktors NFκB.

Celastrol-Konzentration: 10 µM

3.3 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

3.3.1 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA

3.3.1.1 Plasmidamplifikation

Die lyophilisierten *E.coli* Bakterien werden in 1 ml LB-Medium resuspendiert und 5 Minuten inkubiert. 100 ml dieser Lösung werden auf einer Blasticidin-LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Alle verwendeten Plasmide besitzen eine Blasticidin-resistenz, so dass transformierte Klone über LB-Blas-Medium selektioniert werden können. 5 ml Blas-TB-Medium werden mit einer Kolonie transformierter *E.coli* beimpft und für 8 Stunden unter kontinuierlichem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 200 ml Blas-TB mit 200 µl der Bakteriensuspension beimpft in einem Erlenmeyerkolben angesetzt und auf einem Rüttler bei 37 °C über Nacht kultiviert. Zusätzlich werden Glycerolstocks angelegt, dazu wird die Bakteriensuspension in 1/10 Volumen Glycerol bei -80 °C gelagert.

3.3.1.2 Maxipräparationen zur Gewinnung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Maxiprep Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Die Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 6000 g bei 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2 und mehrmaligem Invertieren wird die Lösung für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml kalter P3 dazugegeben, invertiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten 30-minütigem Zentrifugationsschritt bei 20.000 g, 4 °C

wurde der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand nochmal in einem neuen Zentrifugenröhrchen für 15 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert, um so die zellulären Bestandteilreste vollständig zu entfernen.

Die Plasmidpräparation erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolles (Qiagen). Hierbei wurde die Plasmid-DNA über eine Adsorptionssäule, die spezifische DNA-bindende Eigenschaften besitzt, gebunden, gewaschen und weitgehend frei von Verunreinigungen von der Säule eluiert. Nach Fällung der DNA in Ethanol konnte die Konzentration und Ausbeute der präparierten DNA durch Messung der Absorption einer verdünnten Lösung bei 260 nm (A260) bestimmt werden. Die Reinheit der DNA-Lösung wurde anhand des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A260/A280) ermittelt.

3.3.1.3 DNA-Restriktionsverdau

Die isolierten Plasmid-DNAs wurden mittels Restriktionsverdau auf ihre Identität geprüft. Dazu wird das Plasmid mit Hilfe an den für die jeweiligen Restriktionsenzyme sequenzspezifischen Stellen gespalten. Bei den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme handelt es sich meistens um Palindrome aus vier bis acht Nucleotiden. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen. Für den Verdau wurden 500 ng Plasmid-DNA in 10 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Der Ansatz wird mit dem zugehörigen Inkubationspuffer sowie dem Plasmid entsprechenden Restriktionsenzymen versetzt und mit H₂O aufgefüllt. Der Restriktionsverdau erfolgte für ein bis zwei Stunden bei 37 °C. Das Ergebnis des Verdau wurde durch eine anschließende Gelelektrophorese (siehe 3.3.6) überprüft.

3.3.2 Stabile Transfektion von Plasmid DNA nach der CaPO₄-Methode

Um humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wurde das am häufigsten verwendete Transfektionsverfahren, die Kalzium-Phosphat(CaPO₄)-Präzipitation [167], verwendet. Das Prinzip basiert darauf, dass sich die zu übertragende DNA in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat an ausfallendes Calcium-Phosphat bindet. Der feinkörnige Niederschlag aus Calcium-Phosphat und DNA ist am Mikroskop als schwarze Körner oder durch leichte Trübung der Lösung zu erkennen. Das Präzipitat wird der Zellkultur zugegeben, die ausgefallenen Kristalle werden dann per Endozytose von den Zellen aufgenommen. Da DNA auch Phosphatgruppen hat, fällt sie bei dieser Methode mit aus und wird mit dem Calcium-Phosphat über Endozytose in die Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert wird. Dort wird die DNA transkribiert, wobei eine komplementäre mRNA (messenger Ribonucleic Acid) entsteht. Diese wird aus dem Nucleus zu den Ribosomen im Zytoplasma transportiert und dort translatiert.

Am Vorabend der Transfektion werden die Zellen in einer Dichte von 2x10⁶/10 cm-Schale ausgesät. Pro Kulturschale wird die zu transfizierende DNA (5 µg) in einer CaCl₂-Lösung

(250 mM in H₂O) auf ein Volumen von 500 µl eingestellt. Anschließend werden 500 µl 2x HBSS zugegeben, der Ansatz kontinuierlich gemischt, mit einer 2 ml Pipette 20 sec Blasen gebildet und 5 sec gevortext. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei RT wird das DNA-Präzipitat tropfenweise über die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken gleichmäßig im Medium verteilt. Nach Zugabe von 9 ml Medium wird bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird mit HBSS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

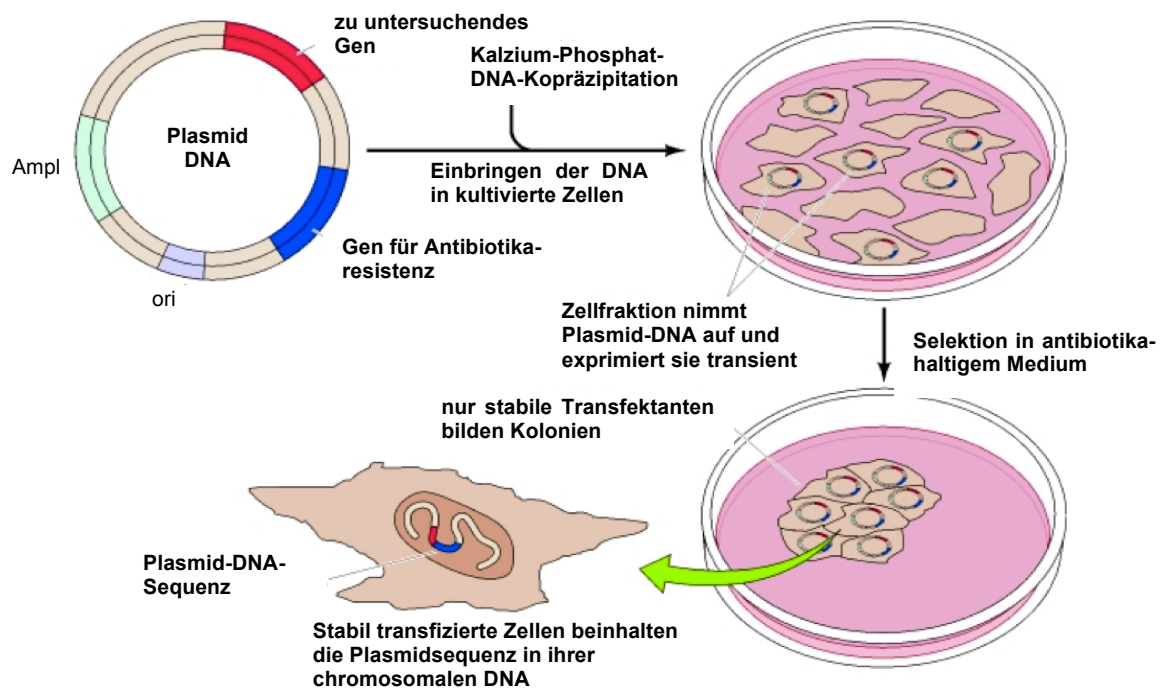


Abbildung 19: Calcium-Phosphat-Präzipitation
Schematische Darstellung einer Transfektion mittels der Calcium-Phosphat-Methode (verändert nach [168])

Zur Herstellung stabiler HEK293 Transfektanten wurden HEK293 Zellen mit dem Expressionsplasmid, welches ein Antibiotikaresistenzgen enthielt, transfiziert. So können die transfizierten Zellen mit einem Antibiotikum selektiert werden. Hier enthielt das Plasmid eine Blasticidin-Resistenz. Die Zellen sind nach der Transfektion durch Inkubation mit dem Antibiotikum Blasticidin einem Selektionsdruck ausgesetzt. Unter regelmäßiger Erneuerung des Selektionsmediums (alle vier bis fünf Tage), konnten nur die Zellen mit stabil integriertem Plasmid überleben. Die Zellen wurden über vier Wochen in Medium mit 25 mg/ml Blasticidin kultiviert. Nach der Selektionsphase wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl expandiert, stimuliert und z.B. die Proteinexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

3.3.3 Transiente Transfektion

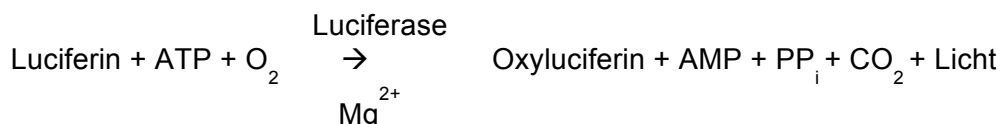
Um einen quantitativen Nachweis der NFκB-Translokation zu erbringen, wurde in der vorliegenden Arbeit die transiente Transfektion der HEK293 Zellen mit einem NFκB-Luciferase-Reporter-Plasmid (pNiFTy-Luc Plasmides) durchgeführt.

0,5x10⁶ Zellen werden in 6-well Platten ausgesät. Die Transfektion erfolgt am selben Tag in 100 µl Medium (ohne Zusätze), 3 µl Fugene Transfection Reagent sowie 1 µl DNA. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wird der Ansatz auf die Zellen gegeben. Am folgenden Tag werden die Zellen behandelt und somit auch ein Mediumwechsel durchgeführt.

Transfizierte Zellen wurden entweder mit Luciferase-Reporter-Gen-Analysen (siehe Kapitel 3.3.4) untersucht oder es wurde ein Gesamtproteinextrakt (siehe Kapitel 3.4.1) bzw. RNA (siehe Kapitel 3.3.5) hergestellt.

3.3.4 Genreporterassay

Der Reporter-Gen-Assay dient dazu die Expression von Genen und deren Regulation zu untersuchen. Der zu untersuchende Promotor wird vor ein so genanntes „Reporter-Gen“ (z.B. Firefly-Luciferase), dessen Proteinaktivität leicht nachzuweisen ist, kloniert. Luciferase, ein Enzym des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*), ist ein ideales Reporterprotein für die Analyse der Promotoraktivität, wenn ihre Expression unter die Kontrolle eines zu untersuchenden Promotors gestellt wird [169]. Die Firefly-Luciferase oxidiert als Oxygenase in Gegenwart der Cofaktoren ATP, molekularem Sauerstoff und Magnesium-Ionen das Substrat Luciferin. Die Biolumineszenzreaktion beruht hierbei auf dem Energietransfer von ATP zum Substrat Luciferin unter Bildung von Oxyluciferin, AMP, CO₂ und Licht der Wellenlänge 560 nm. Mithilfe eines Luminometers erfolgt der quantitative Nachweis der Aktivität über die Messung von Lichtemissionsreaktionen in RLU („relative light units“). Die lichtemittierende Reaktion ist bei einer Zugabe des Substrats im Überschuss über einen bestimmten Zeitraum proportional zur Luciferaseaktivität der Probe. Die „Reporter-Gen“-Konstrukte (in diesem Fall NFκB-Promotor + Luciferase-Gen als Reporter-Gen) werden zunächst durch Transfektion in die Zellen gebracht.



Nach 24-stündiger Inkubation der transfizierten und stimulierten Zellen werden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein Eppendorf Tube überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wird in PBS resuspendiert und Lysepuffer dazugeben. Die Aufbereitung der Zellen und die Messung erfolgte mit dem Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) und einem Luminometer (Pharmingen). Die Lösungen sind Bestandteile des Luciferase™ Reporter Assay Systems (Promega) und wurden entsprechend dem technischen Handbuch hergestellt.

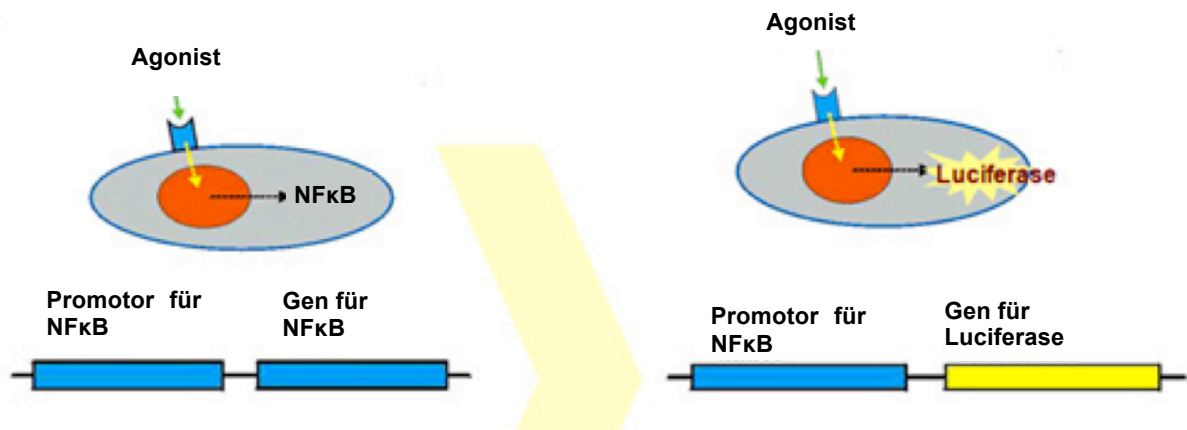


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Luciferase-Assays

(verändert nach <http://biospectrum.co.kr/xs/files/attach/images/147/715/004/a-14.jpg>)

3.3.5 Extraktion von RNA

3.3.5.1 Trizol/ Phenom-Chloroform-Extraktion

Zur Isolierung von RNA wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in Trizol, welches Phenol Guanidinisothiocyanat enthält, resuspendiert und 5 Minuten bei RT inkubiert um die Kernproteinkomplexe aufzuspalten. Nach Zugabe von Chloroform, zur Trennung der RNA von den übrigen Zellbestandteilen, und kurzer Inkubation bei RT wurden die Proben bei 14.000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend war eine Phasenbildung zu beobachten, die aus der Phenol-Chloroform-Phase, einer Interphase sowie einer wässrigen Phase, welche die RNA beinhaltet, besteht. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Phenol sowie 1/10 Chloroform gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, um Verunreinigungen zu entfernen. Erneut wurde die wässrige Phase in ein neues Tube überführt, mit Chloroform gemischt und abzentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 14.000 rpm). Zum Präzipitieren der RNA wurde die abgenommene wässrige Phase mit demselben Volumen Propanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm erhielt man das Pellet mit der RNA. Nach einem Waschschrift mit kaltem 80 % EtOH wurde das Pellet getrocknet und schließlich in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Nun konnte die RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt werden. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80 °C und die Verarbeitung erfolgte immer auf Eis.

3.3.5.2 Kit

Die RNA-Isolation erfolgte gemäß den Angaben mit Hilfe des Nucleo-Spin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, D). Die Zellen wurden abgeschabt und 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Um die Zellpellets zu lysieren, wurde jeweils 350 µl Lysispuffer RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol zugefügt und gründlich gemischt. Die lysierten Zellen wurden in die

NucleoSpin Filter Units überführt und anschließend für eine Minute bei 13.000 U/Minute zentrifugiert. Zum Filtrat wurde 350 µl 70 %iger Ethanol gegeben und gevortext. Zum Binden der in den Proben enthaltenen RNA, wurde das Homogenat in NucleoSpin Säulen pipettiert und 30 Sekunden bei 10.000 U/Minute zentrifugiert. Zur Entsalzung der Membran für den anschließenden Schritt der DNA-Verdauung wurden 350 µl Membrane Desalting Buffer (MDB)-Puffer zugegeben und die Isolationssäulchen eine Minute bei 13.000 U/Minute zentrifugiert. Für den DNA-Verdau wurden 95 µl einer DNase-Mischung (10 µl DNase I + 90 µl Reaktionspuffer) auf die Säulenmembran gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei RT, folgte ein dreifacher Waschschrift. Zum Eluieren der gebundenen RNA wurde 40-60 µl RNase-freies Wasser auf die Säulen aufgetragen und bei 13.000 U/Minute für eine Minute zentrifugiert. Anschließend konnte die RNA-Konzentration und -Reinheit mittels einer photometrischen Extinktionsmessung bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt werden.

3.3.6 DNA-Gelelektrophorese

Benötigte Lösungen: - Agarose-Gel: 2,5 µl Etbr (Stocklösung 10 mg/ml)

50 ml 1x TBE

1 g Agarose

- PCR-Puffer

- Beladungspuffer

Bei diesem Verfahren können DNA-Fragmente ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden [170]. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die DNA aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ein negativ geladenes Molekül ist und im elektrischen Feld zur Anode wandert. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit hängt hierbei von ihrer Molekülgröße ab. Zur Auftrennung wird eine Gelmatrix aus Agarose verwendet, die wie ein Molekularsieb wirkt. Aufgrund ihrer Porenstruktur werden große Moleküle in ihrer Wanderung zurückgehalten, während niedermolekulare Substanzen ungehindert die Matrix passieren können. Die Größe der Poren hängt von der Konzentration der Agarose ab und diese wird je nach gewünschtem Auftrennungsbereich bestimmt.

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen wurden 0,5 %ige - 2 %ige horizontale Agarosegele verwendet. Die von der jeweiligen Prozentigkeit des gewünschten Gels abhängige Menge Agarose wurde in 1x TBE durch Aufkochen gelöst und dann mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt. Die mit Auftragspuffer (Endkonzentration 1x) versetzten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm² Gel aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Marker aufgetragen. Ein Vergleich der Bandenlaufweiten von Marker und Probe ermöglichte es Rückschlüsse auf die Fragmentgröße zu ziehen.

3.3.7 Nachweis von Nukleinsäuren

Die Sichtbarmachung der in den Gelen enthaltenen DNA-Fragmente erfolgte durch UV-Licht (UVTransilluminator der Wellenlänge 366 nm und 254 nm, Bachofer, Reutlingen). Da Ethidiumbromid ein fluoreszierendes, DNA-interkalierendes Molekül ist wird die DNA im UV-Licht sichtbar. Aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaften ist Ethidiumbromid eine stark mutagene und cancerogene Chemikalie. Die aufgetrennten fluoreszierenden Fragmente wurden mittels einer CCD-Kamera fotografiert und dokumentiert.

3.3.8 Primersynthese

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die hier verwendeten sequenzspezifischen Primer binden nur in bestimmten Sequenzen und Oligo(dT)-Primer (Linker) binden im Poly-A-Schwanz. Bei der Auswahl der Primer sollten bestimmte Eigenschaften erfüllt werden. Es ist darauf zu achten, dass keine Selbst-Komplementarität vorliegt und es somit zu keiner Dimer- oder Haarnadelstrukturbildung kommt. Die Länge der Primer sollte 17-30 Nucleotiden nicht über- oder unterschreiten und ihr GC-Gehalt sollte etwa 50-60 % betragen. Die „Annealing“-Temperaturen von zwei miteinander eingesetzten Primern („upstream“ und „downstream“) müssen so ausgewählt werden, dass sie möglichst nahe beieinander liegen. Lyophilisierte Primer wurden in bidestilliertem Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst und bei -20°C gelagert. Zur Ermittlung geeigneter Primer und zur Überprüfung der Primer-Eigenschaften wurden im Internet frei zugängliche Primerkalkulationsprogramm herangezogen.

Tabelle 7: TLR-Primer mit jeweiliger Bandengröße

| Primer für TLR | Bandengröße (bp) |
|----------------|------------------|
| 3 | 319 |
| 9 | 331 |
| 2 | 614 |
| 4 | 623 |
| 1 | 890 |
| 6 | 1107 |
| 10 | 800 |

3.3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) ermöglicht es, DNA-Abschnitte von bestimmter Länge und Sequenz zu vervielfältigen [171]. Spezifische Primer, bei denen es sich um kurze einzelsträngige DNA-Moleküle handelt, liefern den Startpunkt für die DNA-Polymerase. Sie binden komplementär an eine definierte Sequenz der „Template“-DNA und legen so den Bereich fest, an dem die DNA-Polymerase startet. Sie verlängert in Gegenwart von einem Gemisch aus allen vier Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs: Adenin (dATP), Guanin (dGTP), Cytosin (dCTP) und Thymin (dTTP)) die Primer entlang

der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue doppelsträngige DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur „Template“-DNA ist. Eine PCR lässt sich in folgende drei Abschnitte untergliedern:

- Denaturierung: Durch Erhitzen auf 94 °C wird die doppelsträngige „Template“-DNA in Einzelstränge gespalten.
- Annealing: Die Primer hybridisieren an die jeweiligen komplementären Sequenzen des Einzelstranges. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer.
- Elongation: Die DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers und in Gegenwart von dNTPs komplementäre Stränge zur „Template“-DNA. Zwei doppelsträngige DNA-Moleküle entstehen.

Anschließend folgt eine erneute Denaturierung der entstandenen Doppelstränge und der nächste Reaktionszyklus beginnt. Die Synthesezyklen können ca. 30-40-mal wiederholt werden, hierbei ist die Anzahl der Wiederholungen abhängig von Template. Der gewünschte DNA-Abschnitt wird demnach $2^n \times$ amplifiziert.

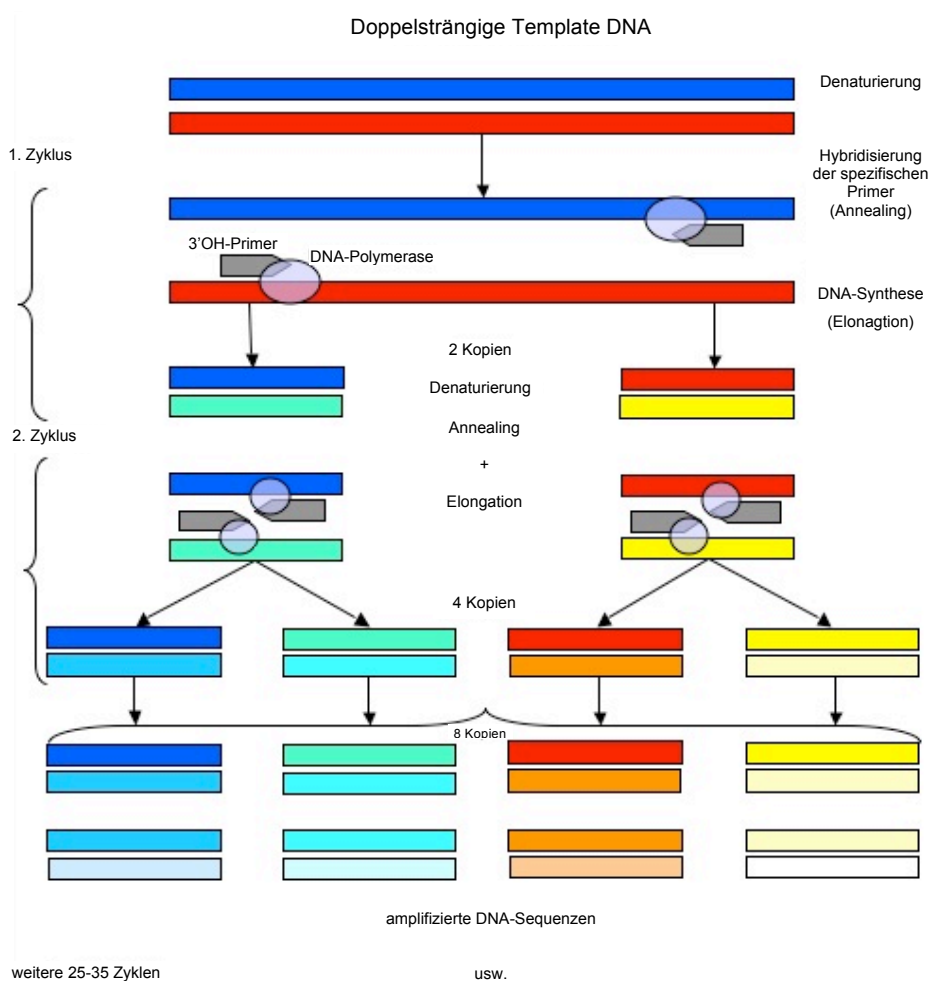


Abbildung 21: Schematische Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als DNA-Polymerasen werden temperaturstabile Enzyme verwendet, da sie den wiederholten DNA-Synthese- und Denaturierungszyklen standhalten [172]. Die Taq-DNA-Polymerase wird aus dem extrem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen und hat ihr Temperaturoptimum bei 68 °C bis 72 °C. Nach dem Zusammenpipettieren der Proben wurden sie gemischt und nach kurzem Abzentrifugieren auf Eis gehalten. Sobald am PCR-Gerät das Programm, das je nach gewünschter Fragmentlänge und Annealingtemperatur der Primer variierte, eingestellt wurde und es die gewünscht Betriebstemperatur erreicht hatte, konnten die Proben in das Gerät gestellt werden. Für jede PCR wurde individuell ein geeignetes Programm erstellt.

Zur Überprüfung der extrahierten RNA und synthetisierten cDNA wurde eine GAPDH-PCR mit den jeweiligen Proben durchgeführt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse und in allen Zellen vorhanden. Dieses sogenannte Housekeeping-Gen ermöglicht eine Überprüfung der gewonnen cDNA.

Tabelle 8: Pipettier-Ansatz für eine TLR-PCR (beispielhaft für TLR3 und TLR9)

| TLR-PCR | | |
|----------------------------------------------|------------|-------------------|
| Reagenzien: Invitrogen Taq Polymerase | | |
| | (μ l) | 94 °C 2 Minuten |
| 10x Taq puffer (15 mM MgCl ₂) | 2,5 | 94 °C 30 Sekunden |
| 10x dNTP 2 mM | 2,5 | 55 °C 30 Sekunden |
| 50 uM hTLR sense 5' (100x) | 0,25 | 72 °C 30 Sekunden |
| 50 uM hTLR antisense 3' (100x) | 0,25 | 30 Zyklen |
| 5 U/uL Taq Polymerase (Invitrogen) | 0,2 | 72 °C 10 Minuten |
| cDNA (2 μ L pro Tube) | 2 | 4 °C Pause |
| steriles dH ₂ O | 17,3 | |
| Endvolumen | 25 | |

Tabelle 9: Pipettier-Ansatz für eine GAPDH-PCR

| GAPDH-PCR | | |
|----------------------------------------------|------------|-------------------|
| Reagenzien: Invitrogen Taq Polymerase | | |
| | (μ l) | 95 °C 2 Minuten |
| 10x Taq Puffer | 2 | 95 °C 30 Sekunden |
| MgCl ₂ | 0,5 | 60 °C 40 Sekunden |
| 10x dNTP 2 mM | 0,4 | 72 °C 40 Sekunden |
| 10 μ M Primer downstream | 0,5 | 38 Zyklen |
| 10 μ M Primer upstream | 0,5 | 72 °C 10 Minuten |
| 5 U/ μ l Taq Polymerase Invitrogen | 0,1 | 4 °C Pause |
| cDNA (4 μ l pro Probe) | 4 | |
| steriles dH ₂ O | 12 | |
| Gesamtvolumen je Ansatz | 20 | |

3.3.10 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription dient RNA als Ausgangsmaterial für die Amplifikation. Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert in einem der PCR vorgeschalteten Reaktionsschritt, aus der RNA die einzelsträngige cDNA (complementary DNA) [173]. Die RT beginnt mit einem Denaturierungsschritt bei 65 °C, bei dem die Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst werden. Als Ausgangspunkt für die Synthese der einzelsträngigen cDNA

benötigt die Reverse Transkriptase ein freies 3'OH-Ende, welches von einem Primer geliefert wird. Die komplementäre cDNA wird durch den Einbau der vier dNTPs von der Reversen Transkriptase synthetisiert. Um den Abbau von RNA durch eventuell vorhandene RNase zu verhindern, erfolgt eine Zugabe von RNase Inhibitor. Die synthetisierte ss cDNA kann anschließend für die Durchführung einer PCR verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene RT-PCR-Systeme verwendet. Die Reaktionen wurden jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

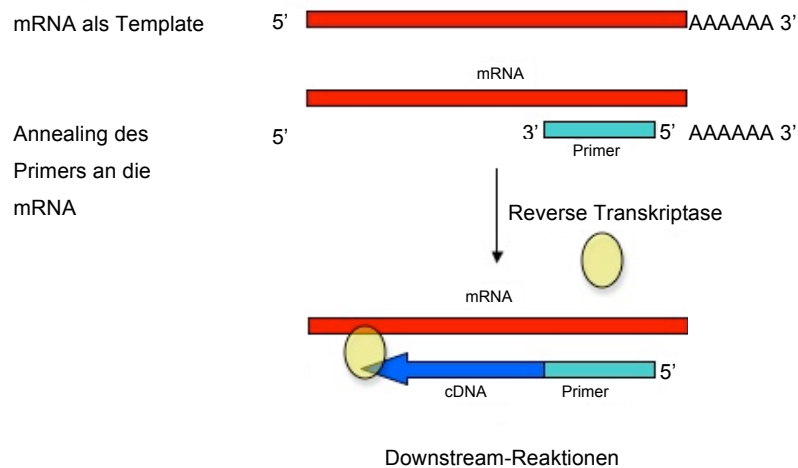


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Reaktion einer reversen Transkriptase

Tabelle 10: Pipettier-Ansatz für eine RT-PCR

| RT-PCR | | | |
|--------------------------------|--|------------|------------------|
| Reagenzien: Promega-RT | | | |
| | | (μ l) | |
| Random Primer (500 μ g/ml) | | 1 | 70 °C 10 Minuten |
| RNA (5 μ g pro Tube) | | x | 25 °C 10 Minuten |
| steriles dH ₂ O | | x | |
| Endvolumen | | 12 | |
| 10x dNTP 5 mM | | 2 | 42 °C 50 Minuten |
| 5x M-MLV RT Puffer | | 4 | 70 °C 10 Minuten |
| RNAsin (40 U/ μ l) | | 1 | 4 °C Pause |
| M-MLV RT (200 U/ μ l) | | 1 | |
| Endvolumen | | 8 | |

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Präparation und Analyse von Proteinen

3.4.1.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zum Proteinnachweis werden die Zellen mit Hilfe des radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer lysiert, um Proteinextrakte zu erhalten.

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden $1,5-4 \times 10^6$ Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. Die Zellen wurden nach der spezifischen Behandlung (z.B. Infektion, Stimulation) geerntet, in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl eiskaltem Zellysepuffer resuspendiert und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten auf Eis, dabei wurden die Proben gelegentlich gevortext. Anschließend wurden die Lysate für 25 Minuten bei 13.000 U/Minute und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, in dem die Proteine enthalten sind, in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C, für einen längeren Zeitraum bei -80 °C.

3.4.1.2 Proteinfractionierung nach zellulären Kompartimenten

Die Kernproteinextraktion erfolgt mit dem NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents von Pierce, Rockford, USA. Darin enthalten sind folgende Reagenzien:

Cytoplasma Extraktions Reagenz I (CER I)

Cytoplasma Extraktions Reagenz II (CER II)

Nuklear Extraktions Reagenz (NER)

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden $1,5-4 \times 10^6$ Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. Nach der spezifischen Behandlung (z.B. Infektion, Stimulation) wurden die Zellen geerntet, in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert.

Nach dem vollständigen Entfernen des Mediums wurde das Pellet auf Eis gestellt. Bei einem Zellvolumen von ca. 2×10^6 wurde das Pellet in 200 µl eiskaltem CER I resuspendiert und 15 sec lang gevortext. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde 11 µl eiskaltes CER II hinzugefügt. Nach einer weiteren Minute Inkubation auf Eis wurde das Extrakt bei 13.000 U/Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Cytoplasmaextrakte wurden sofort in ein Reaktionsgefäß überführt und eingefroren. Das Pellet mit den verbliebenen Kernproteinextrakten wurde in 100 µl NER resuspendiert. Anschließend wurde das Extrakt alle 10 Minuten 15 Sekunden lang, über einen Zeitraum von 40 Minuten gevortext. Nachdem noch einmal bei 13000 U/Minute 10 Minuten lang zentrifugiert wurde konnte der Überstand, der die Kernproteine enthielt, in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei -80 °C eingefroren werden.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 2 µl des Proteinextraktes eingesetzt, gleichzeitig wurde ein Proteinstandard mitgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proteinextrakte nach Bradford beruht auf der Bindung von Coomassie-Brillant-Blau G-250 an die Aminogruppe der Proteine. Dadurch ändert sich das Absorptionsmaximum der ungebundenen (kationischen) Form von 465 nm (rotgefärbt) nach 595 nm (blaugefärbt). Der Farbstoff bildet in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen und nichtpolaren

3.4.3.1 Coomassie-Färbung

Mit der Coomassie-Färbung können alle im SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennten Proteine detektiert werden. So können die Proteine nach einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese visualisiert werden. Der Farbstoff Roti-Blue (Roth) bindet durch seine kolloidalen Eigenschaften mit hoher Spezifität an Proteine. Das Gel wurde 30 Minuten bei RT in Färbelösung (20 % Roti-Blue, 20 % Methanol in H₂O) geschwenkt und anschließend zweimal für 10 Minuten in Entfärbelösung inkubiert.

3.4.4 Protein Transfer (Western Blot)

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe eines Semi-Dry-Blotters bei 10 V für 60 Minuten auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Zusammenbau erfolgt nach folgendem Schema: auf drei mit Blotpuffer angefeuchtete Gel-Blotting-Papiere wird die angefeuchtete Nitrozellulosemembran und anschließend das Gel, auf dem sich die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine befanden, gelegt. Darauf werden wieder zwei Blatt Gel-Blotting-Papiere gelegt. Der Transfer wurde unter Verwendung des Blotpuffers durchgeführt.

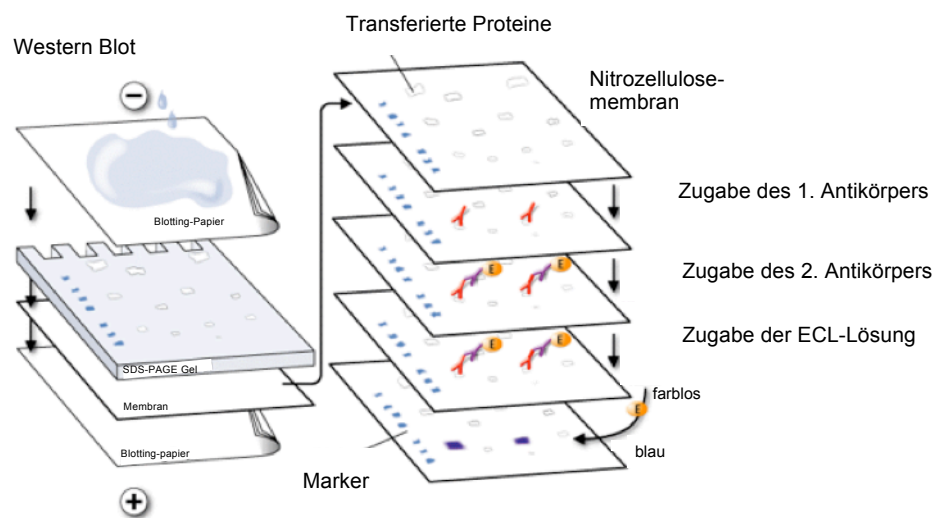


Abbildung 23: Schematische Darstellung eines Western Blot nach dem Semi-Dry Verfahren (verändert nach: <http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/immunodetection/wbProtocol.html>)

3.4.4.1 Ponceau-Färbung

Nach Abschluss des Blottings wird der Proteintransfer durch einen Ponceau-Nachweis überprüft. Dazu wird die Nitrozellulosemembran kurz in Ponceau S-Lösung gewaschen. Diese färbt alle auf der Nitrozellulosemembran vorhandenen Proteine rot an, wodurch eine Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Proteinverteilung möglich ist.

3.4.5 Western Blot Analyse

Nach einem einstündigem Blockschrift der Membran in Blockpuffer, um die nicht mit Proteinen besetzten Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran abzusättigen, erfolgt die

Inkubation mit dem primären, einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper in der im Datenblatt angegebenen Konzentration in Blockpuffer oder PBS verdünnt über Nacht bei 4 °C. Die Nitrocellulosemembran wird anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre, HRP-gekoppelte Antikörper wird ebenfalls in der jeweiligen Verdünnung zugegeben und die Nitrocellulosemembran für eine Stunde darin inkubiert. Es folgen drei fünf-minütige Waschschrte. Die Detektion der Proteine erfolgt durch Chemilumineszenz (ECL Western Blotting detection reagent). Dazu werden die Membranen in ECL-Reagenz inkubiert. Bei der anschließenden Reaktion kommt es durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase zur Lichtemission. Diese kann durch Auflegen eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht werden, hierbei werden die durch die Antikörper markierten Proteinbanden auf den Röntgenfilm übertragen und in einer Entwicklungsmaschine entwickelt und fixiert.

Zur Überprüfung einer gleichmäßigen Auftragung wurde die Membran nach der Detektion kurz gewaschen und eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit einem Anti-Aktin- oder Anti-Tubulin-Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen wurde der entsprechende sekundäre Antikörper wie oben beschrieben zugegeben. Die einzelnen Waschschrte sowie die Detektion erfolgten wie oben bereits erläutert. Zum Nachweis der Bandengröße wird ein Proteinstandard mit aufgetragen, der Banden bekannter Größe anzeigt. Anhand dieser können nun die detektierten Banden einer Größe zugeordnet werden.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 FACS-Analyse

3.5.1.1 Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich einzelne Zellen zu zählen und sie im Hinblick auf ihre physikalischen und molekularen Eigenschaften zu analysieren. Die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) geschieht in einem Flüssigkeitsstrom, in dem bestimmte Eigenschaften oder Zellpopulationen auf Einzellebene untersucht werden können, da sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Die Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion ermöglicht eine quantitative Bestimmung von beispielsweise bestimmten Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Die Zellsuspension wird mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert, der entweder von einem Oberflächenprotein oder einem Molekül (z.B. DNA) gebunden wird. Die Hüllstromflüssigkeit des Durchflusszytometers verdünnt die Zellsuspension und leitet sie an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbei. Das Flüssigkeitssystem und eine konisch geformte Küvette ermöglichen im Durchflusszytometer die Trennung einzelner

Zellen. An einem definiertem Messpunkt wird eine hydrodynamische Fokussierung der Zelle erreicht und durch einen Laser werden die fluoreszenzmarkierten Zellen zur Emission von Licht einer bestimmter Wellenlänge angeregt. Mit Photomultipliern wird das Licht elektronisch verstärkt und mit spezifischen Detektoren erfasst. Eine spezielle Software kann dann die digitalisierten Messwerte auswerten. Die erfassten Fluoreszenzintensitäten korrelieren mit der Menge des untersuchten Oberflächenproteins bzw. Moleküls pro Zelle und verhalten sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper/Zelle.

Die bei der Messung entstehende Lichtbeugung und -streuung ermöglicht es Aussagen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) zu machen. Zudem ist es möglich mit einem Durchflusszytometer mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu messen, da die Farbstoffe sich bei einer Wellenlänge anregen lassen, jedoch Emmissionsspektren besitzen, die spezifisch für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff sind.

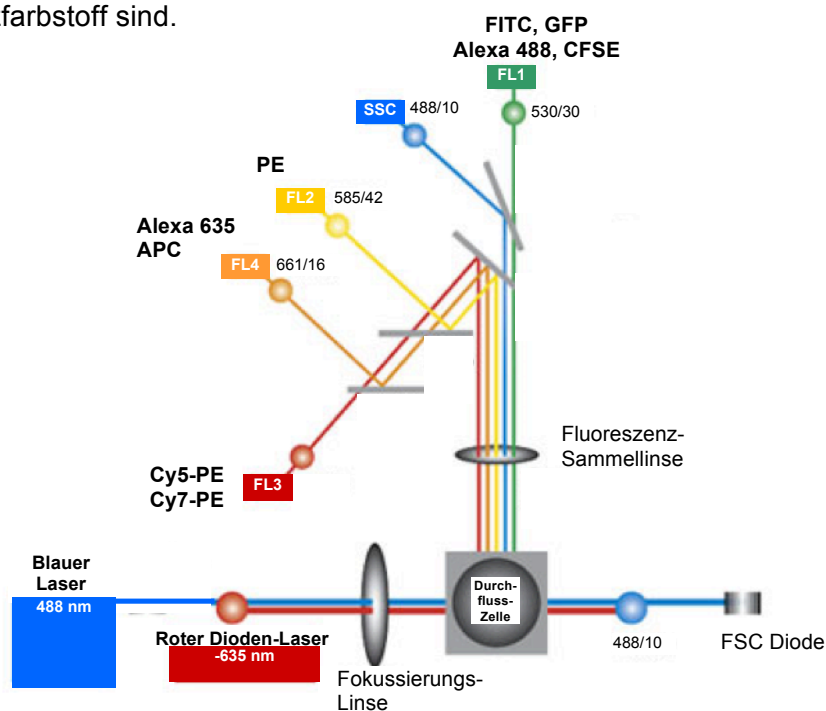


Abbildung 24: Prinzip der FACS-Analyse

(verändert nach: http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/facscalibur_features_opticalpath.jpg)

Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffmarkierten monoklonalen Antikörpern kann die Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen auf Einzelzellebene analysiert werden. Anhand von RNA/DNA-Farbstoffen können Zellzyklus-Analysen und Apoptoseassays durchgeführt werden. Auch der intrazelluläre pH-Wert sowie der Ionenfluss an Zellmembranen kann anhand von Fluoreszenzfarbstoffen untersucht werden.

FSC (Forward Scatter) Größe der Zellen

SSC (Side Scatter) Granularität der Zellen

FL1 (Fluoreszenz 1)

FL2 (Fluoreszenz 2)

3.5.2 Bestimmung des Ausreifungsgrades von dendritischen Zellen

Für die Ausreifung der DCs wurde die Expression des Oberflächenmoleküls CD86 quantifiziert. Dazu wurden mindestens $0,6 \times 10^6$ iDCs mit den Tumorzellen im Verhältnis 1:3 kokultiviert. Gleichzeitig wurden sowohl iDCs als auch mDCs als Kontrolle mitgeführt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und in 100 μ l PBS resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern (30 Minuten im Dunkeln bei 4 °C).

3.5.2.1 Nachweis exprimierter Oberflächenantigene (DC-Ausreifung)

Zum Färben von Oberflächenantigenen werden die dendritischen Zellen mit dem Zellschaber gelöst und mit FACS-Puffer (PBS + 5 % FCS) zweimal gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation in 10 μ l Antikörper (CD86) für 15 Minuten im Kühlschrank. Nach einem weiteren Waschschrift werden die Zellen in 400 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die FITC- oder PE-konjugierten Antikörper können nun durchflusszytometrisch gemessen werden.

3.5.3 Bestimmung der TLR- und NF κ B-Expression

Zum Nachweis der TLR-Expression wurde ebenfalls die FACS-Analyse angewandt. 1×10^6 Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät, behandelt und zu den jeweiligen Zeitpunkten durch abschaben geerntet. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 % PFA/PBS resuspendiert und 20 Minuten bei RT fixiert. Nach einer Minute auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und anschließend in 90 % Methanol resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis konnte hier der Versuch unterbrochen und die Zellen bei -20 °C gelagert werden, oder man färbte die Zellen direkt in 100 μ l Antikörperlösung für 45 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden sie durch Zugabe von FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und schließlich in 400 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Fluoreszenz der PE-konjugierten TLR- oder NF κ B-Antikörper konnte nun in einer FACS-Analyse detektiert werden. Zur Durchführung der Messungen mit dem Durchflusszytometer FACSort (Becton Dickinson) wurde das Computerprogramm Cell QuestTM (Becton Dickinson) verwendet.

3.6 Nachweis der Zytokinproduktion mittels ELISA

Die Konzentrationsbestimmung des Zytokins TNF- α , die nach der Kokultur von DCs mit unterschiedlich behandelten Tumorzellen freigesetzt wurden, erfolgte mittels ELISA. Dazu wurden Kokulturen im Verhältnis 1:3 angesetzt und der Mediumüberstand nach 48 Stunden abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Zum Nachweis von TNF- α wurde der Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt. Dazu wurde das TNF- α high sensitivity human ELISA Set (Immunotools, Friesoythe) verwendet. Die Sandwich-ELISA Methode zeichnet sich durch eine spezifische

Antikörper-Antigen-Bindung aus. Zunächst wurde der Boden einer 96-well Platte mit einem spezifischen Antikörper für das zu untersuchende Zytokin beladen. Dazu wurde der Antikörper in Coating-Puffer 1:100 verdünnt und jeweils 100 µl dieser Lösung pro well aufgetragen. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten 5-mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 µl Block-Puffer für eine Stunde bei RT geblockt um freie Stellen abzusättigen. Anschließend wurde der Block-Puffer verworfen und die Platten auf einem Papiertuch ausgeklopft und erneut 5-mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl der jeweiligen zu analysierenden Proben in einem doppelten Ansatz aufgetragen. Die Standard-Reihe wurde in Dilution-Puffer angesetzt und ebenfalls doppelt aufgetragen. Das in der Probe enthaltene Zytokin (hier TNF-α) bindet jetzt spezifisch an den Antikörper. Nach Beendigung einer Inkubationszeit von mindestens einer Stunde bei RT (oder 4 °C über Nacht) wurden die Platten erneut 5-mal mit Wasch-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe eines spezifischen Biotin-gekoppelten Antikörpers gegen das jeweilige Zytokin. Dazu wurde der Antikörper 1:100 in Dilution-Puffer verdünnt, jeweils 100 µl pro well zugegeben und die Platte eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut 5-mal gewaschen und der sekundäre Antikörper zugegeben. Dabei handelte es sich um einen HRP-konjugierten Streptavidin-Antikörper, von dem 100 µl/well bei einer Verdünnung von 1:5000 in Dilution-Puffer zugegeben wurden. Dieser detektiert den Biotin-gekoppelten Antikörper. Nach 30 Minuten erfolgte ein weiterer Waschschrift. Im Anschluss wurden pro well 100 µl Substratlösung (TMB) zugegeben. Die Substratreaktion ermöglicht es nun, den TNF-α-Gehalt zu visualisieren. Dabei nimmt die Intensität der Farbreaktion mit steigender Zytokinkonzentration zu. Mit Hilfe des aufgetragenen TNF-α-Standards ist es möglich die jeweiligen Proben zu quantifizieren. Je nach Farbentwicklung wurde die Reaktion nach etwa 20 min mit 50 µl Abstopplösung (1M H₂SO₄) beendet. Die Messung erfolgte mit einem ELISA-Reader bei 450 nm.

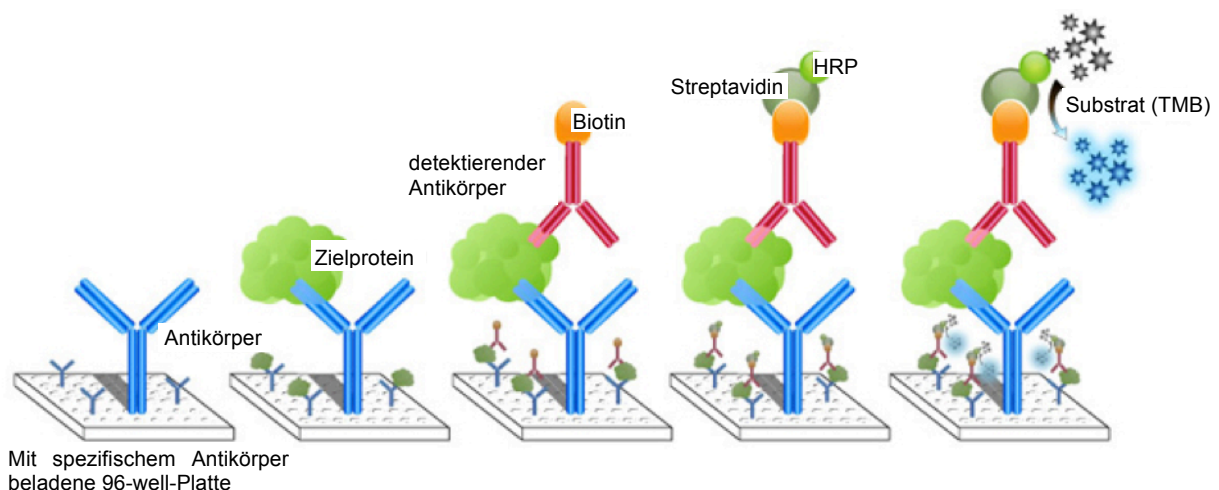


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Methode (verändert nach: <http://www.epitomics.com/images/products/sandwich.jpg>)

4 ERGEBNISSE

Der zentrale Teil meiner Dissertation beschäftigt sich mit der Interaktion von H-1PV im Hinblick auf die Aktivierung von TLRs und NFκB.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen sollen die Hypothese unterstützen, dass H-1PV-infizierte Tumorzellen in der Lage sind eine spezifische Immunantwort und so eine Vernichtung des Tumors zu induzieren. Und das dies unter der Beteiligung von Toll-like Rezeptoren geschieht.

Zur genauen Untersuchung der einzelnen TLRs wurden Zelllinien erzeugt, die jeweils einen humanen TLR stabil exprimieren. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB wurde die TLR-Aktivierung gemessen. Da die NFκB-Aktivierung *in vivo* eine direkte Reaktion auf eine Aktivierung der TLRs darstellt und über eine Reporterogenaktivität gemessen werden kann, stellt dies eine gute Untersuchungsmöglichkeit dar.

Um die Interaktion der H-1PV-induzierten Tumorzelllysaten mit DCs zu analysieren, wurde die Expression von Toll-like Rezeptoren und des DC-Reifungsmarkers CD86 analysiert. Zur Generierung der DC wird das bereits im Labor etablierte Protokoll [174] eingesetzt.

Um spezifisch der Frage nachzugehen, ob und in welcher Form die DC-Aktivierung durch das Parvovirus H-1 über TLRs abläuft, sollten die folgenden Experimente in primären DC Kulturen durchgeführt werden. Zunächst erfolgte dies durch die Analyse der TLR-Expression. Dann erfolgte die Kartierung der Signalwege in den DCs anhand einer Analyse der Involvierung der TLR-Zieltranskriptionsfaktoren (NFκB). Hierzu wurde die Aktivierung und Translokation von NFκB in Folge der Signaltransduktion untersucht. Schließlich wurde die Produktion des proinflammatorischer Zytokins TNF-α, das als ein zusätzliches Zeichen der DC-Aktivierung dient analysiert.

4.1 Etablierung einer PCR mit humanen TLR-Primern zur Überprüfung der TLR-Expression

Um die TLR-Expression zu Überprüfen wurde eine TLR-PCR etabliert. Hierfür wurden Zelllinien recherchiert die eine TLR-Expression aufweisen und als Positivkontrollen verwendet werden können. Außerdem wurden die entsprechen Primersequenzen für TLR1-10 recherchiert und entsprechende Primer bestellt.

Zur Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen gewählt. Die Pufferkonzentrationen variierten von 12,5 – 25 mM. Für TLR1 konnte die Zelllinie HT29 (HT) mit der Pufferkonzentration von 17,5 mM als geeignete Positivkontrolle für die Durchführung der TLR-PCR ermittelt werden (Abb.

26 A). Die weiteren Auswertungen der PCR-Gele ergaben, dass die Zelllinie U937 (U) bei einer Pufferkonzentration von 17,5 mM eine gut nachweisbare Bande für die TLR2-Größe bei 614 bp vorwies (Abb. 26 B). HT29 hingegen eignete sich mit einer Puffer-Konzentration von 15 mM als Positivkontrolle für die TLR3-Expression (319 bp) (Abb. 26 C). Zudem zeigte sie für TLR4 (623 bp) und TLR6 (1107 bp) bei einer Pufferkonzentration von jeweils 20 und 17,5 mM eine geeignete TLR-Expression (Abb. 26 D+E). Die Zelllinie U937 zeigte für TLR4 (Abb. 26 D) und TLR9 (Abb. 26 F) mit einer Pufferkonzentration von 20 und 15 mM die deutlichsten TLR-Banden im PCR-Gel. Hier betrug die Bandengröße von TLR4 623 bp und die von TLR9 331 bp. Die Zelllinie HT29 konnte zudem als Positivkontrolle für die TLR10-PCR verwendet werden (Abb. 26 G). Bei einer Pufferkonzentration von 25 mM zeigte sie die entsprechende Bande des TLR10 mit einer Größe von 800 bp. Demnach wurden diese aufgeführten Zelllinien als Kontrolle der jeweiligen TLR-PCR verwendet und bei jedem PCR-Ansatz mitaufgetragen.

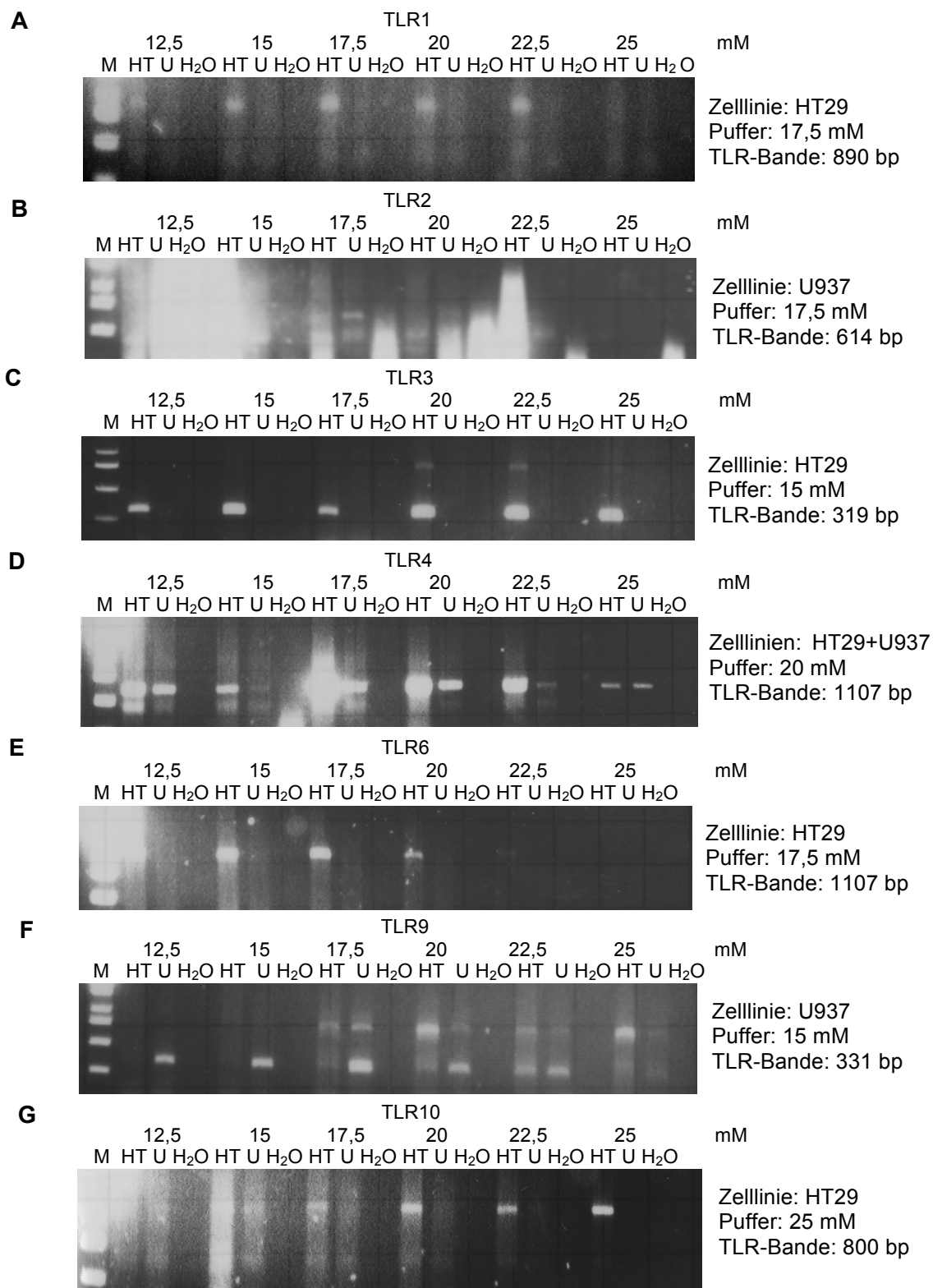


Abbildung 26: Agarosegelbilder nach Durchführung der unterschiedlichen TLR-PCRs
 Aufgetragen sind die Kontrollzelllinien HT29 (HT), U937 (U) sowie die Negativ-Kontrolle (die anstelle von DNA nur Wasser (H₂O) enthält) mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen von 12,5 - 25 mM. M bezeichnet die Spur des Markers. Zu sehen sind die jeweiligen TLR-Banden (Abb. 26 A-G, TLR1-10).

Tabelle 12 zeigt für die entsprechende TLR-PCR die zu verwendenden Zelllinien und Pufferkonzentration sowie die TLR-Bandengröße und die extension-time der PCR.

Tabelle 12: Komponenten der TLR-PCR

Auflistung der jeweiligen Kontrollzelllinie für die Durchführung der TLR-PCR mit dazugehöriger Pufferkonzentration, Basanpaargröße und extension-time.

| TLR | Positivkontrolle: Zelllinien | Pufferkonz. [mM] | bp | extension-time (PCR) |
|-----|---------------------------------|---------------------|------|-------------------------|
| 3 | HT29 | 15 | 319 | 30 s |
| 9 | U937 | 15 | 331 | 30 s |
| 2 | U937 | 17,5 | 614 | 45 s |
| 4 | HT29 / U937 | 20 | 623 | 45 s |
| 8 | HT29 | 22,5 | 629 | 45 s |
| 1 | HT29 | 17,5 | 890 | 1 min |
| 6 | HT29 | 17,5 | 1107 | 1 min |
| 10 | HT29 | 25 | 800 | 1 min |

4.2 Generierung stabiler Zelllinien, die einzelne humane TLRs exprimieren

4.2.1 Stabile Transfektion einzelner humaner TLR-Plasmide in HEK293 Zellen

Um die Beteiligung einzelner TLRs zu untersuchen wurde die Funktion und Expression von stabil transfizierten Zelllinien untersucht, die einzelne TLRs exprimieren.

Dendritische Zellen exprimieren TLRs, da aber *in vitro* eine Analyse einzelner TLRs schwierig ist, wurden HEK293 Zellen verwendet. Durch stabile Transfektion einzelner humaner TLRs konnten DC-ähnliche Versuchsbedingungen geschaffen werden. Die einzelnen humanen TLR-Plasmide wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode in HEK293 Zellen transfiziert. Die stabile Transfektion erfolgte mit einem Expressionsplasmid der ein Antibiotikaresistenzgen besitzt.

Nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen Agel, XhoI oder SmaI wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach Inkubation mit entsprechenden Restriktionsenzymen zeigten die Gele Banden mit der jeweiligen Größe des verdauten Plasmids an (V). Jeweils rechts daneben ist die entsprechende Bande mit unverdautem Plasmid (UV, ohne Restriktionsenzyme) zu sehen (Abb. 27).

Die Spuren, die mit 205-225 gekennzeichnet sind, entsprechen dem jeweiligen TLR-Transfektanten mit Zugabe der Restriktionsenzyme. Für die TLR3- und TLR9-Plasmide wurde Agel, für das TLR2/6-Plasmid SmaI und für die TLR2- und TLR4-Plasmide XhoI als Restriktionsenzym eingesetzt. Wurde das jeweilige Konstrukt mit dem Restriktionsenzymen geschnitten, entstanden jeweils zwei Banden, die zum einen dem linearisierten "Vektorrest" und zum anderen dem ausgeschnittenen DNA-Stück entsprachen.

Da lineare DNA im Agarose-Gel immer gleich wandert, kann mithilfe eines Größenstandards die DNA-Fragmentgröße bestimmt werden. Bei Plasmid DNA und deren elektrophoretischer Auftrennung treten hingegen mehrere Banden auf. Lediglich bei Plasmid 220 war nur eine

Bande mit der Größe von 5432 bp zu sehen. Die 2. erwartete Bande bei 3769 bp war wahrscheinlich aufgrund des nicht vollkommen verdauten Ansatzes nicht zu erkennen.

Der unverdaute Ansatz mit Plasmid DNA zeigte 3 Banden. Diese Banden kommen durch die unterschiedliche Molekülkonformationen zustande. Plasmide können im unverdauten Zustand in 3 Formen vorliegen. Die erste ist die linearisierte Form (relaxed DNA), bei Einzelstrangbruch spricht man von der zirkulären (coiled) DNA Form und die dritte übliche Form ist die superspiralisierte (supercoiled) DNA. Diese Form ist aufgrund ihrer Topologie wesentlich kompakter und starrer. Daher wandert sie im elektrischen Feld auch dementsprechend schneller als die gleichgroße lineare oder zirkuläre Form.

Der Restriktionsverdau zeigte, dass die unterschiedlichen TLR-Plasmide korrekt in die HEK293 Zellen transfiziert wurden.

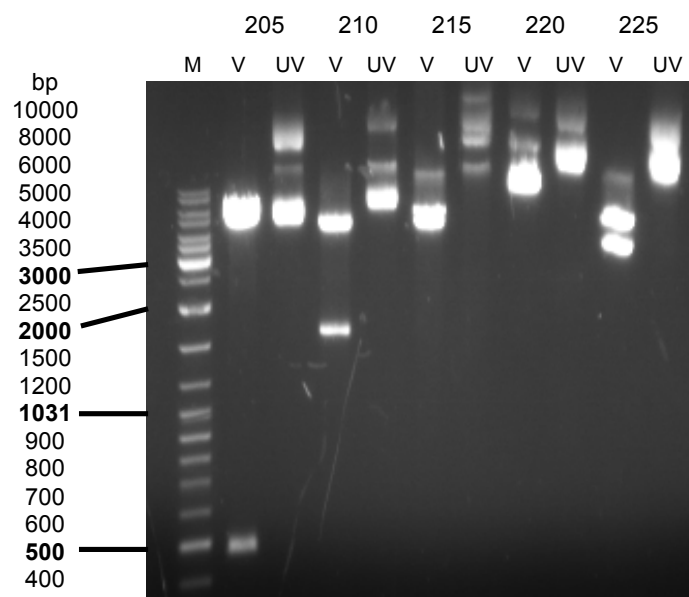


Abbildung 27: Restriktionsanalyse der TLR-transfizierten HEK293 Zellen
Spur 205-225 entspricht dem jeweiligen TLR-Transfektanten nach einem Restriktionsverdau. M bezeichnet die Markerspur. Zu sehen sind die Banden der jeweils verdauten (V) und unverdauten (UV) Proben.

Tabelle 13: Auflistung der TLR-Plasmide
Verwendete humane TLR-Plasmide mit zugehörigen Restriktionsenzymen und resultierenden Fragmentgrößen

| TLR | TLR3 | TLR9 | TLR2/6 | TLR2 | TLR4 |
|-------------------------|------|------|--------|------|------|
| Plasmid | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 |
| Größe | 5679 | 6051 | 10550 | 9201 | 9190 |
| Restriktionsenzyme | Agel | Agel | Smal | XhoI | XhoI |
| Bandengröße nach Verdau | 463 | 1570 | 4799 | 3769 | 3769 |
| | 5216 | 4481 | 5751 | 5432 | 5421 |

4.2.2 Überprüfung der TLR-Plasmid-DNA

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Plasmid den jeweiligen TLR exprimiert, wurde eine PCR-Analyse mit Plasmid-DNA durchgeführt. Dazu wurde die hergestellte Plasmid-DNA in einer 1:10 Verdünnung verwendet.

Abbildung 28 zeigt die gesuchten TLR-Genabschnitte als DNA-Fragmente, die mittels PCR (siehe Methoden 3.3.9) amplifiziert und auf ein Agarose-Gel aufgetragen wurden. Mit Hilfe eines Vergleichsmarkers der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurde, konnte die Größe der erhaltenen PCR Fragmente ermittelt werden.

Im Gel aufgetragen sind die unterschiedlichen Plasmid-DNAs. Zu sehen sind die Banden für den gesuchten TLR-Abschnitt. TLR3 (205) und TLR9 (210) laufen auf fast gleicher Höhe, die Bandengröße liegt hier bei 319 und 331 Basenpaaren. Mit dem Duo-Plasmid für TLR2 und TLR6 (215) wurde eine TLR6-PCR durchgeführt, die die gesuchte Bande bei 1107 bp zeigt. TLR2 (220) und TLR4 (225) laufen ebenfalls im gleichen Basenpaarbereich bei 614 bp (TLR2) und 623 bp (TLR4). Somit beinhalten die jeweiligen Plasmide den gewählten TLR und zeigen dies durch die entsprechende Expression der TLR-Bande.

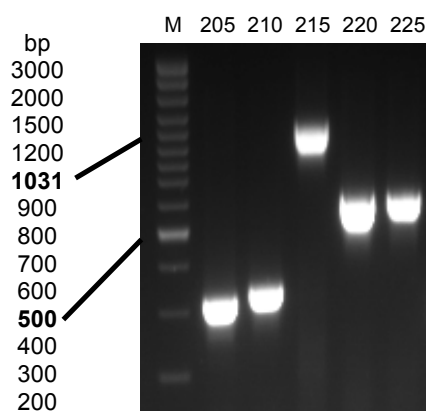


Abbildung 28: TLR-PCR zur Überprüfung der TLR-Expression
 Zur Überprüfung der TLR-Expression der jeweiligen Plasmid-DNA wurde die entsprechende TLR-PCR durchgeführt. Spur 205+210: TLR3-PCR, Spur 215: TLR6-PCR, Spur 220: TLR2-PCR, Spur 225: TLR4-PCR. M bezeichnet die Spur des Markers. Die Banden zeigen die unterschiedlichen TLR-Expresionen.

Tabelle 14 listet die Plasmide mit dazugehöriger Zellbezeichnung und TLR-Bandengröße auf.

Tabelle 14: TLR-Plasmide mit jeweiliger Basenpaargröße des TLR-Abschnittes

| Zellbezeichnung | Plasmid | TLR (bp) |
|-----------------|----------------|----------|
| 205 | pUNO hTLR3 | 319 |
| 210 | pUNO hTLR9 | 331 |
| 215 | pDUO hTLR2/6 | 614/1107 |
| 220 | pDUO CD14/TLR2 | 614 |
| 225 | pDUO CD14/TLR4 | 623 |

4.3 Charakterisierung der TLR-transfizierten Zelllinie HEK293 unter Einfluss einer Infektion mit Parvovirus H-1

4.3.1 Analyse der Viabilitätsrate transfizierter und nicht-transfizierter Zellen

Es konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass das onkolytische H-1PV in der Lage ist eine spezifische gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auszulösen [174]. Deshalb war das Ziel meiner Untersuchungen den genauen Mechanismus dieser Immunantwort zu analysieren. Dazu wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 verwendet. An ihr konnte durch eine stabile Transfektion mit verschiedenen humanen Toll-like Rezeptoren die jeweilige Beteiligung des Rezeptors an der H-1PV vermittelten Zellyse untersucht werden.

Die anti-tumor Effekte von H-1PV wurden bereits in verschiedenen Modellen untersucht [174-176], allerdings konnte der genaue Mechanismus und die Beteiligung der Rezeptoren noch nicht vollständig analysiert werden. Demnach sind eine Vielzahl an weiteren Untersuchungen notwendig um deren Beteiligung an der H-1PV vermittelten tumorspezifischen Immunantwort zu analysieren.

Um den Einfluss der Infektion mit dem Parvovirus H-1 auf HEK293 Zellen zu untersuchen, wurde die Viabilitätsrate bestimmt. Hierbei dient der Kristallviolett-Assay zur Bestimmung der Zellviabilität indem er die lebenden Zellen detektiert. Dazu wurden die Zellen mit einer unterschiedlichen MOI des H-1PV infiziert und die Viabilitätsrate über einen bestimmten Zeitraum analysiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit erfolgte die Färbung mit Kristallviolett und anschließend eine photometrische Messung. Hier dient die Stärke der Färbung als Maß für das Überleben der Zellen.

Die MOI wurde in den Konzentrationen 0,2; 2 und 20 eingesetzt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Tagen infiziert und an Tag 2, 4 und 6 nach Infektion wurde die Viabilitätsrate mit Hilfe des Kristallviolettassays bestimmt.

In Abbildung 29 A ist die Viabilitätsrate der HEK293 Zellen dargestellt. Zu sehen war ein Abfallen der Viabilität, dabei war der Anteil an lebenden Zellen bei einer MOI von 0,2 an Tag 2 noch bei ca. 90 %, nach 2 Tagen sank er bereits auf ca. 30 % und erreichte an Tag 6 die geringste Rate von ca. 10 %. Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Auswirkung der MOIs auf die Viabilitätsrate. An Tag 4 war bei einer kleinen MOI von 0,2 der Effekt deutlich kleiner als mit einer MOI von 2. Und weiter verstärkt wurde er mit einer MOI von 20.

Auch die transfizierten HEK293 Zellen sprechen auf eine H-1PV Infektion an und zeigten eine deutliche verringerte Viabilitätsrate. Hierbei war zu sehen, dass die TLR2-transfizierten Zellen an Tag 2 weniger sensitiv auf die Infektion mit MOI 0,2 reagierten als die mit TLR3

und TLR9 transfizierten HEK293. Nach 4 Tagen allerdings war für alle MOIs ein deutliches Abfallen der Viabilitätsrate zu verzeichnen, die am Tag 6 nach Infektion am geringsten war (Abb. 29 B). TLR3-Transfektanten zeigten bereits an Tag 2 eine auf ca. 12 % verringerte Viabilitätsrate (MOI 20) die bis Tag 6 auf ca. 8 % weiter absank. Für eine MOI von 0,2 war das Abfallen der Anzahl an lebenden Zellen von ca. 82 % an Tag 2 auf ca. 31 % an Tag 4 am auffälligsten. Auch hier erreichten alle MOIs am Tag 6 die stärkste Herabsetzung der Viabilitätsrate (Abb. 29 C).

Die mit TLR9-transfizierten Zellen wiesen ein vergleichbares Verhalten auf, da sie bereits an Tag 2 mit einer MOI von 20 nur noch eine Viabilitätsrate von ca. 6 % zeigten, das sich bis Tag 6 nur noch gering änderte (Abb. 29 D).

Die Analyse hat ergeben, dass HEK293 Zellen sensitiv gegenüber dem Parvovirus H-1 sind und die Viabilitätsrate deutlich sinkt. Auch die TLR-transfizierten Zellen sprachen auf eine H-1PV Infektion an und zeigten eine verminderte Vitalität.

Die Auswertung des Viabilitätsassays ergab außerdem, dass das Überleben der Zellen abhängig ist von der Zeit sowie der Infektionsmultiplizität. Mit gesteigerter MOI war auch eine verstärkte zytotoxische Wirkung des Virus zu beobachten. Eine signifikante Reduktion war beim Einsatz einer MOI von 20 zu sehen. Bereits nach zwei Tagen war hier ein deutlicher Rückgang der Viabilität zu erkennen. Demnach reagierten die Zellen sensitiv auf die H-1PV Infektion und schon mit einer geringen MOI wirkte das Parvovirus H-1 zytotoxisch, was sich in einem reduzierten Überleben der Zellen dargestellt hat.

Die MOI von 20 hat sich bereits in vorherigen Untersuchungen als optimal bewährt und wird demnach in allen weiteren Versuchen in dieser Konzentration eingesetzt.

Bereits zwei Tage nach Infektion mit einer MOI von 20 konnte ein starker zytotoxischer Effekt von H-1PV nachgewiesen werden. Nahezu 80 % der Zellen zeigten keine Viabilität mehr. Dies galt sowohl für die transfizierten als auch die untransfizierten HEK293 Zellen.

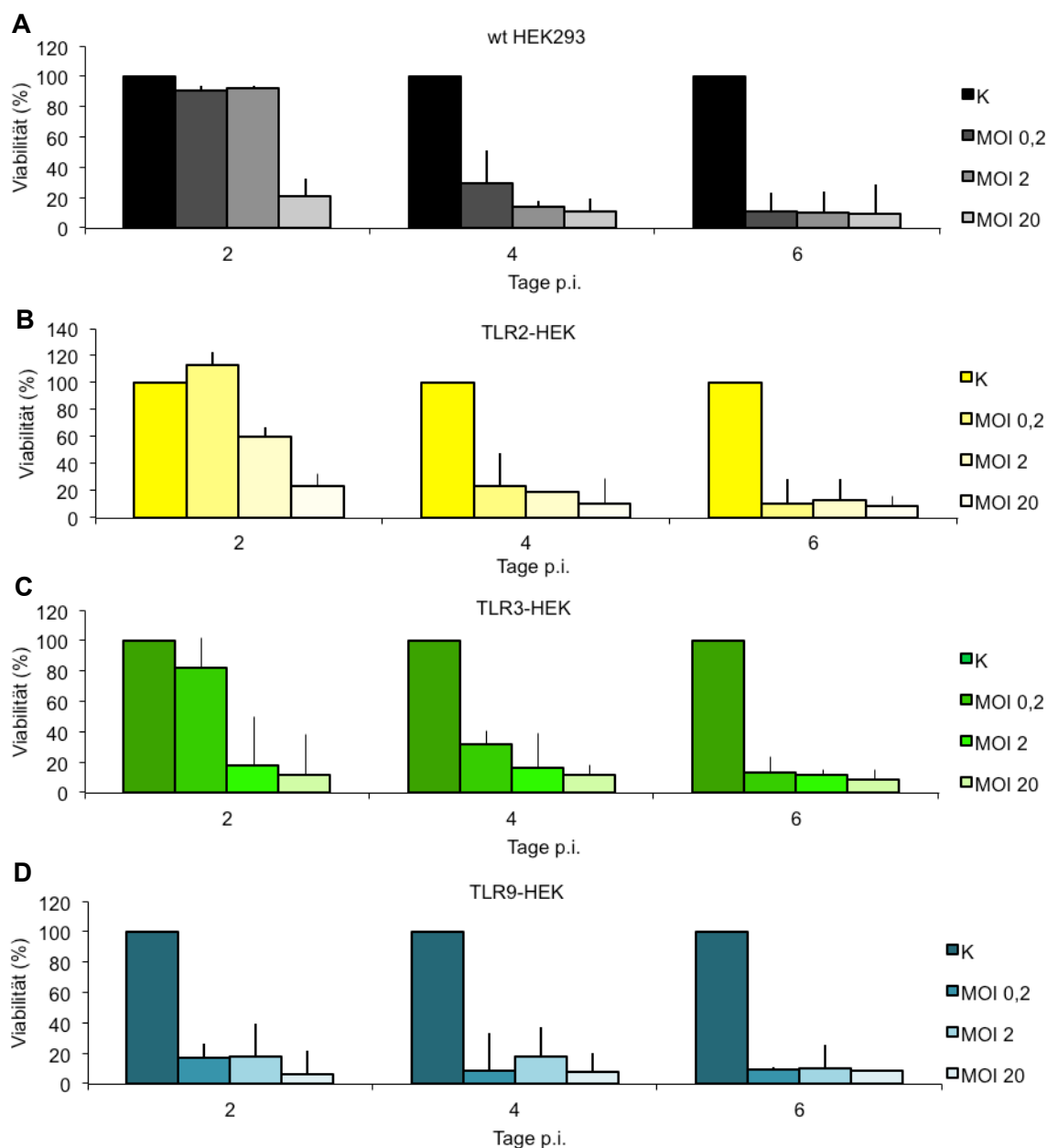


Abbildung 29: Viabilität H-1PV-infizierter transfizierter und wt HEK293 Zellen
 Die Viruskonzentration variierte zwischen einer MOI von 0,2; 2 und 20. Nach Anfärben der Zellen mit Kristallviolett wurde die Viabilität photometrisch bestimmt. Die Anzahl an nicht-infizierten Zellen wurde zu jedem Messzeitpunkt auf 100 % gesetzt. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Zu sehen sind die verminderten Viabilitäten der wt HEK293 Zellen (A) und TLR-Transfektanten (B-D) nach H-1PV Infektion mit unterschiedlicher MOI über einen Zeitraum von 6 Tagen.

4.3.2 Einfluss von TLR-Liganden und dem Parvovirus H-1 auf die Zellvitalität

Das autonome Parvovirus H-1 besitzt sowohl zytotoxische als auch onkolytische Eigenschaften [26]. Mit Hilfe des MTT-Assays konnte die Zytotoxizität nachgewiesen werden.

Zur Stimulation der TLRs wurden die Zellen mit den jeweiligen TLR-Liganden behandelt. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen nach Stimulation mit Hilfe des MTT-Assays untersucht. Abbildung 30 zeigt, dass die Zugabe der TLR-Liganden Poly(I:C), CpG sowie

Zymosan keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte. Sowohl die wildtyp HEK293 Zellen, als auch die transfizierten HEK293 Zellen wurden in ihrer Vitalität nicht von den TLR-Liganden beeinflusst.

In Abbildung 30 sind die Vitalitätsraten von TLR3-, TLR9-, TLR2/6- und TLR2-transfizierten Zellen, sowie den wildtyp HEK293 Zellen zu sehen. Nach H-1PV Infektion sank die Vitalität in den TLR3-Transfektanten auf ca. 66 %. Die Stimulation mit dem TLR3-Ligand Poly(I:C) hingegen hatte keinen negativen Effekt auf die Vitalität der Zellen. Auch die TLR9-Transfektanten zeigten nach H-1PV Infektion eine auf ca. 50 % verminderte Vitalität im Vergleich mit ihren unbehandelten Kontrollen. CpG, der TLR9-Ligand, hingegen beeinflusste die Zellvitalität nicht. Bei den TLR2-Transfektanten zeigte die Stimulation mit Zymosan lediglich eine gering verminderte Zellvitalität. Nach H-1PV Infektion hingegen sank sie auf ca. 53 % ab. Die TLR2/6-transfizierten Zellen wiesen keine veränderte Vitalität auf, weder nach H-1PV Infektion noch nach Zymosanzugabe. Die Vitalität der wildtyp HEK293 Zellen nach H-1PV Infektion war mit der Vitalität der TLR3- und TLR9-transfizierten Zellen vergleichbar.

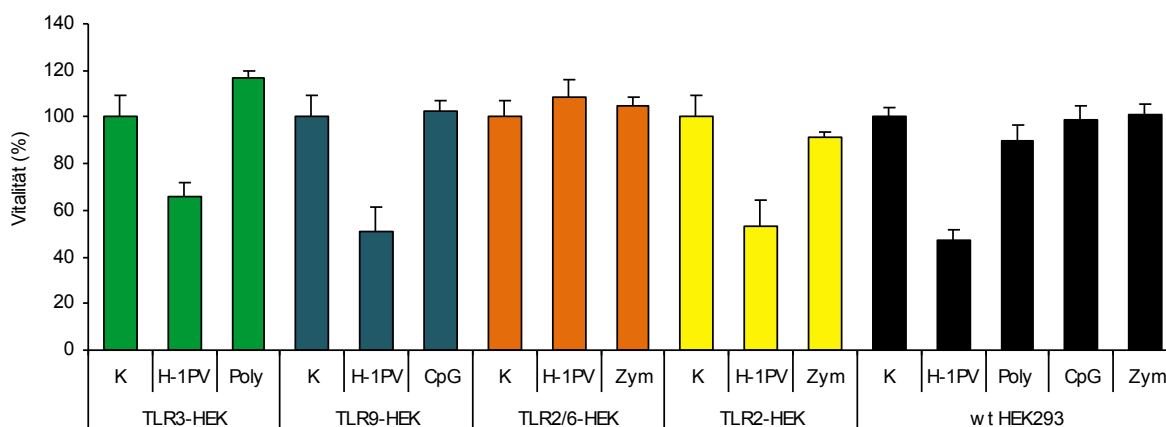


Abbildung 30: Zellvitalität nach H-1PV-Infektion und TLR-Ligandenzugabe
 $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit MOI 20 infiziert oder dem jeweiligen TLR-Liganden stimuliert. K bezeichnet die unbehandelte Kontrolle. Die Zellvitalität wurde mit dem MTT-Assay 24 h nach Infektion und Zugabe der TLR-Liganden bestimmt. Die Daten stellen die Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen dar. Zu sehen sind die verringerten Vitalitätsraten der wt HEK293 Zellen und TLR-Transfektanten nach H-1PV Infektion und die nicht negativ veränderte Vitalitätsrate nach Stimulation mit den jeweiligen TLR-Liganden.

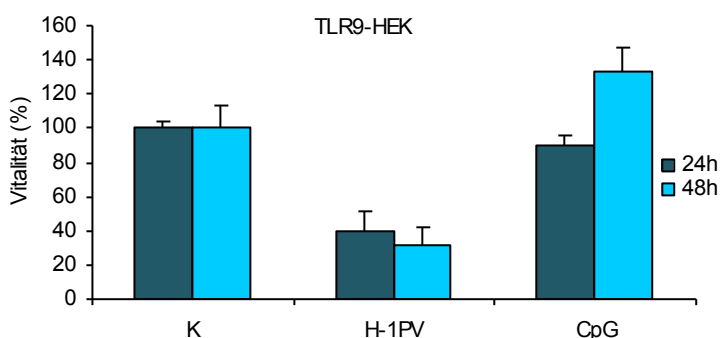


Abbildung 31: Zellvitalität der TLR9-transfizierten HEK293 Zellen
 Exemplarisch stellt diese Abbildung die Vitalitätsänderung der TLR9-transfizierten HEK293 Zellen 24 h und 48 h nach Infektion oder Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG dar. Erkennbar ist der verstärkte Einfluss von H-1PV auf die Vitalität der Zellen.

Die TLR9-transfizierten Zellen in Abbildung 31 sind sensitiv gegenüber einer H-1PV Infektion und verringerten ihre Vitalität nach 24 h auf ca. 40 % und nach 48 h auf ca. 30 %. Die Stimulation der Zellen mit dem TLR9-Liganden CpG hingegen hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität.

Demnach hatte die Stimulation mit TLR-Liganden keinen zytotoxischen Effekt auf die Zellen. Die Infektion mit H-1PV hingegen zeigte deutliche zytotoxische Effekte und verringerte die Zellvitalität.

4.4 Analyse der TLR-Expression in HEK293-Transfektanten

4.4.1 Untersuchung der TLR-Expression auf RNA-Ebene

4.4.2 Überprüfung der TLR-Expression in HEK293 Zellen

Bevor die HEK293 Zellen zur stabilen Transfektion mit TLR-Plasmiden verwendet werden konnten, musste ihre TLR-Expression analysiert werden. Der Nachweis der TLR-Expression erfolgte zunächst durch das Verfahren der PCR. Durch Verwendung spezifischer Primer wurde die Expression von TLR1-10 in HEK293 Zellen untersucht.

Zur Überprüfungen wurden für die unterschiedlichen TLR-PCRs die jeweiligen Kontrollzelllinien mitgeführt, die den entsprechenden TLR exprimieren.

In Abbildung 32 sind die PCR-Ansätze für TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 zu sehen. Zum Größenvergleich der jeweiligen TLR-Bande wurde ein Marker sowie die jeweilige Positivkontrollzelllinie mitaufgetragen. Abbildung 32 A wies in der Kontrollzelllinie HT29 bei einer Größe von 319 bp die Bande für den TLR3 auf. Die HEK293 Zellen hingegen wiesen keine TLR3-Expression auf. Dasselbe Expressionsmuster fand man für TLR2 und TLR6. Hier zeigte die Kontrollzelllinie U937 für TLR2, sowie HT29 für TLR6 die zu erwartende Bandengröße, in den Spuren mit HEK293 Probenmaterial hingegen waren keine Banden zu erkennen (Abb. 32 A). Auch für TLR4 zeigte lediglich die Kontrollzelllinie U937 die entsprechende TLR-Bande (Abb. 32 B). In der durchgeführten TLR9-PCR wies die Zelllinie HT29 als Positivkontrolle eine Bande mit der Größe von 331 bp auf. In HEK293 Zellen war diese nicht zu erkennen (Abb. 32 C).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten keine nachweisbare Expression der jeweiligen TLRs in wildtyp HEK293 Zellen.

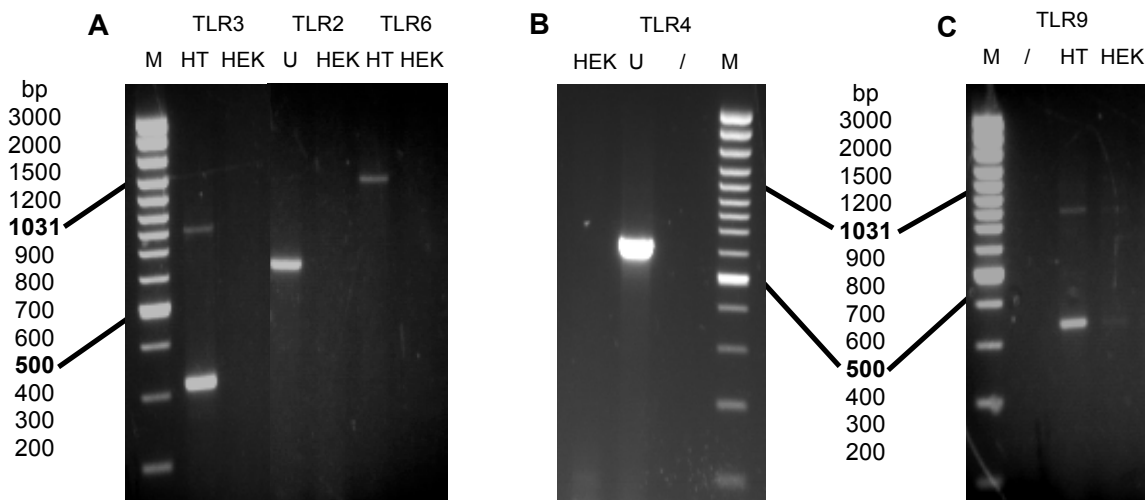


Abbildung 32: Überprüfung der TLR-Expression durch entsprechende TLR-PCR
 Aufgetragen sind die Zelllinien HT29 (HT), HEK293 (HEK) und U927 (U), nach der Durchführung der entsprechenden TLR-PCR (A: TLR3-, TLR2-, TLR6-PCR, B: TLR4-PCR, C: TLR9-PCR). M bezeichnet die Spur des Markers. Zu sehen sind die jeweiligen TLR-Banden der Positivkontrollen und die fehlende TLR-Expression in wt HEK293 Zellen.

Um festzustellen, ob der jeweilige TLR in die HEK293 Zellen transfiziert wurde und dort exprimiert wird, wurde eine PCR-Analyse mit Plasmid-DNA der unterschiedlich transfizierten Zellen durchgeführt.

In Abbildung 33 zu sehen sind die den TLRs zugehörigen Banden in den unterschiedlich transfizierten HEK293 Zellen. Mo bezeichnet die Mock-infizierten Zellen, diese wurden wie die transfizierten Zellen behandelt, aber nicht mit Plasmid-DNA transfiziert. Außerdem wurden für die unterschiedlichen TLR-PCRs die jeweiligen Kontrollzelllinien mit aufgetragen. Die Bezeichnung 205 steht für TLR3-transfizierte HEK293 Zellen, die die erwartete TLR-Bande mit einer Größe von 319 Basenpaare vorweist (Abb. 33 A). Spur 215 in Abbildung 33 B zeigt HEK293 Zellen die mit einem Duo-Plasmid (TLR2 und TLR6) transfiziert wurden. Hier gezeigt wird die Bande nach Durchführung einer TLR2-PCR mit einer Größe von 614 bp. Die TLR2-transfizierten HEK293 Zellen (220) wiesen ebenfalls bei Basenpaargröße 614 die gewünschte Bande auf. In Abbildung 33 B war außerdem die Bande mit einer Größe von 623 bp, die für TLR4 in den TLR4-transfizierten HEK293 Zellen (225) steht erkennbar.

TLR9-transfizierte HEK293 Zellen waren in der mit 210 bezeichneten Spur zusehen und zeigten das erwartete Bandenmuster bei 331 bp (Abb. 33 C). Die mit dem Duo-Plasmid transfizierten Zellen 215 sind in der Abbildung 33 D nach Durchführung einer TLR6-PCR zu sehen und wiesen die erwartete Bande bei 1107 bp auf.

Somit sind die jeweiligen Plasmide richtig transfiziert und eine erwartete TLR-Expression erkennbar. Zudem konnte in den wildtyp HEK293 Zellen keine TLR-Expression festgestellt werden.

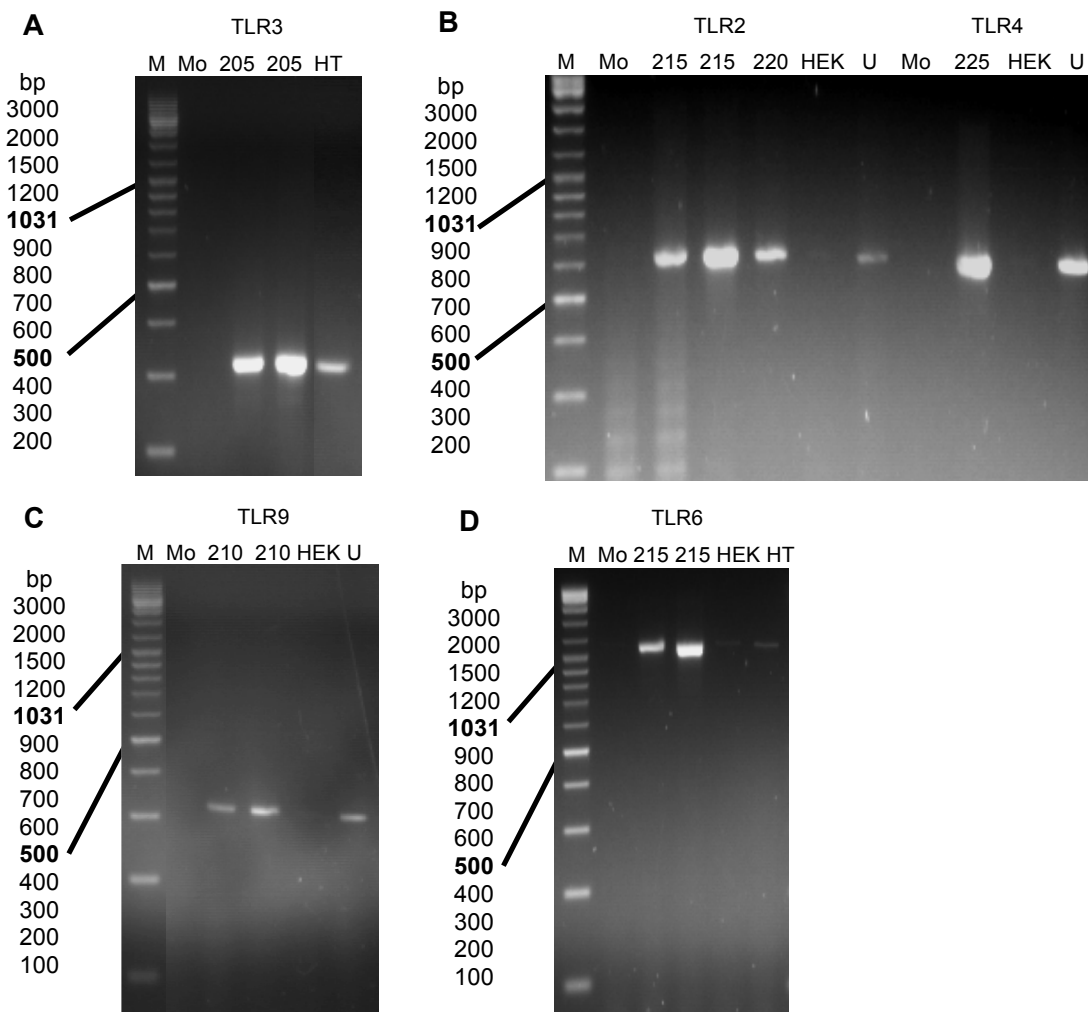


Abbildung 33: TLR-PCRs mit transfizierten HEK293, wt HEK293 und Positivkontrollzelllinien
Gezeigt sind die Ergebnisse der jeweiligen TLR-PCR (A:TLR3-PCR, B: TLR2-, TLR4-PCR, C: TLR9-PCR, D: TLR6-PCR). M bezeichnet die Spur des Markers. Mo bezeichnet die Mock-infizierten Zellen. Aufgetragen sind die Kontrollzelllinien Zelllinien HT29 (HT) und U927 (U), sowie die wt HEK293 Zellen (HEK) und die jeweiligen Transfektanten (205=TLR3-HEK, 210=TLR9-HEK, 215=TLR2/6-HEK, 220=TLR2-HEK, 225=TLR4-HEK). Die Banden entstrechen den jeweiligen TLR-Banden und zeigen eine Expression in den transfizierten Zellen sowie den Positivkontrollen. wt HEK293 Zellen hingegen weisen keine TLR-Expression auf.

Da in weiteren Versuchen auch mit SK29Mel Zellen gearbeitet wird, musste auch deren TLR-Expression überprüft werden. Dies sollte ausschließen, dass bei Untersuchungen der Kokulturen dieser Zellen mit dendritischen Zellen, die TLR-Expression der SK29Mel Zellen zu einem verfälschtem Ergebnis führt. Schließlich sollen die Untersuchungen Aufschluss über die Beteiligung der TLRs von DCs bei der Erkennung von H-1PV-infizierten Tumorzellen geben.

Demnach wurde bei den SK29Mel Zellen mit TLR-PCRs die jeweilige TLR-Expression überprüft. In Abbildung 34 zu sehen sind exemplarisch die Proben einer TLR3- und TLR6-PCR aufgetragen auf einem Agarosegel. Deutliche Banden waren nur wie zu erwarten bei den Positivkontrollen zu erkennen (HT29 für TLR3 und TLR4). Sowohl die untransfizierten HEK293 als auch die SK29Mel Zellen zeigten keine Expression dieser TLRs.

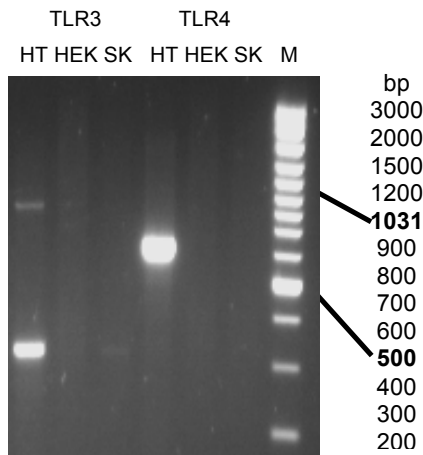


Abbildung 34: TLR-PCRs mit wt HEK293, SK29Mel und Positivkontrollzelllinien
 Gezeigt sind die Ergebnisse der jeweiligen TLR3- und TLR4-PCR. M bezeichnet die Spur des Markers. Aufgetragen ist die Kontrollzelllinien Zelllinien HT29 (HT), wt HEK293 Zellen (HEK) und SK29Mel Zellen (SK). Die Banden zeigen die Expression der jeweiligen TLRs in den Positivkontrollen und keine Expression in SK29Mel und wt HEK293 Zellen.

4.5 Stimulationsexperimente mit TLR-Liganden und Infektion mit H-1PV

4.5.1 Untersuchung der TLR9- und TLR3-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten mittels PCR

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von TLRs bei der Erkennung von H-1PV durch humane Zellen, wurden TLR-transfizierte HEK293-Zellen nach Stimulation mit H-1PV durch humane Zellen, wurden TLR-transfizierte HEK293-Zellen nach Stimulation mit H-1PV mit Hilfe der PCR-Technik analysiert. In den folgenden Versuchen wurden bekannte Liganden zur Stimulation der verschiedenen TLRs verwendet.

Bevor die TLR Liganden CpG, Poly(I:C) und Zymosan zur Stimulation eingesetzt wurden, wurden zunächst die Konzentrationen ermittelt, die eine stimulatorische Wirkung auslösen.

Zunächst wurde für den TLR9-Liganden die optimale Konzentration für die Stimulation der HEK293 Zellen bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit 2,5 und 5 µg/ml CpG behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte eine RNA-Extraktion mit anschließender cDNA-Synthese und einer TLR-PCR. Die Auswertung des Agarosegels in Abbildung 35 ergab für den Einsatz von sowohl 2,5 als auch 5 µg/ml eine deutliche Bande. Demnach reichte schon der Einsatz von 2,5 µg/ml aus um die TLR9-Expression in den transfizierten HEK293 Zellen zu steigern.

Dieselbe Durchführung wurde zur Ermittlung der optimalen Poly(I:C)-Konzentration vorgenommen. Hier ergab sich eine Konzentration von 10 µg/ml als die geeignetste um die TLR3-Expression zu verstärken. Die Analyse für den TLR2 und TLR6 Liganden Zymosan ergab, dass eine Konzentration von 10 µg/ml für die weiteren Versuche eingesetzt wird.

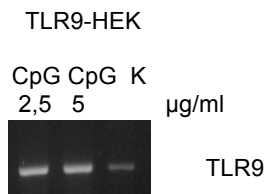


Abbildung 35: TLR9-Expression nach Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG
CpG wurde in den Konzentrationen 2,5 und 5 µg/ml für 24 h zur Stimulation der TLR9-HEK Zellen verwendet. K bezeichnet die unbehandelte TLR9-HEK Zellen. Zu sehen ist die verstärkte TLR9-Expression nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des TLR9-Liganden CpG.

Die folgende Abbildung zeigt die jeweilige TLR-Expression in TLR2- und TLR4-transfizierten Zellen. Zu erkennen waren in Abb. 36 A deutliche TLR2-Banden 6 h und 12 h nach Stimulation mit Zymosan, sowie 24 Stunden nach H-1PV Infektion. Die stärkste TLR2-Expression war 48 Stunden nach Infektion mit H-1PV zu sehen. Auch die TLR4-transfizierten Zellen zeigten eine deutliche verstärkte TLR4-Expression 24 und 48 Stunden nach H-1PV Infektion (Abb. 36 B).

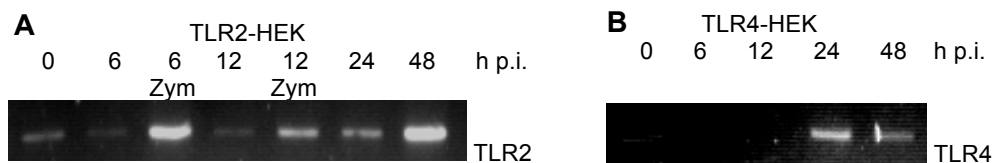


Abbildung 36: TLR2- und TLR4-PCR in transfizierten HEK293 Zellen
Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten (0-48 h) mit H-1PV infiziert. Zym bezeichnet die Zugabe des TLR-Liganden Zymosan. Mit den TLR2-HEK Zellen wurde eine TLR2-PCR durchgeführt. Abb. 36 A zeigt die TLR2-Banden nach unterschiedlicher Behandlung. Die Ergebnisse der TLR4-HEK Zellen sind nach einer TLR4-PCR zu sehen. Abb. 36 B zeigt die veränderte TLR4-Expression nach unterschiedlicher Behandlung. Zu sehen ist eine deutlich verstärkte TLR2- (48 h) und TLR4-Expression (24 h) nach H-1PV Infektion.

Mit Hilfe von spezifischen Primern wurde die Expression der TLRs nach H-1PV Infektion und Behandlung mit den jeweiligen TLR-Liganden untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchung ergaben, dass eine Infektion mit dem Parvovirus H-1 zu einer gesteigerten Expression von TLR9 in den TLR9-transfizierten Zellen führte. Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurden zu verschiedenen Zeitpunkten TLR-PCRs durchgeführt. Bereits nach 24 Stunden ist die TLR9 Bande zu erkennen, die nach 48 Stunden deutlich stärker wurde.

Die TLR3-Expression wurde ebenfalls durch eine Infektion mit dem Parvovirus H-1 verstärkt. Auch hier wurde die Expression über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet. Zu sehen sind die PCR-Analysen 6, 12, 24 und 48 Stunden nach H-1PV Infektion. Zusätzlich wurden die Zellen für 6 sowie 12 Stunden (6 Poly, 12 Poly) mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) stimuliert. Auch dies führte wie zu erwarten zu einer gesteigerten TLR3-Expression (Abb. 37). Als Housekeeping-Gen wurde GAPDH verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Gen, das in jeder Zelle konstitutiv exprimiert wird und in der Regel auch durch äußere Einflüsse

nahezu unbeeinflusst bleibt. Demnach ist der Anteil an der Gesamt-DNA immer gleich und kann als Standard für Genexpressionsanalysen dienen.

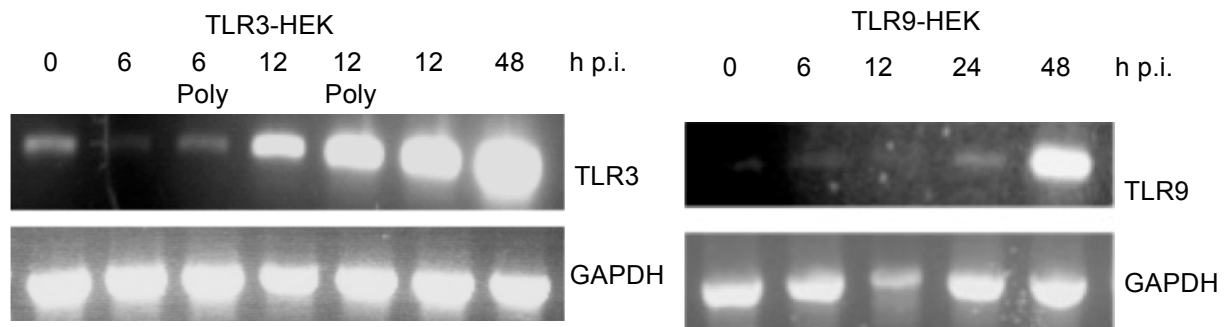


Abbildung 37: TLR3- und TLR9-PCR in transfizierten HEK293 Zellen

Zu sehen sind die Ergebnisse nach einer TLR3-PCR in den TLR3-HEK Zellen, die für die angegebenen Zeiten (0-48 h) mit H-1PV infiziert (p.i.) oder mit dem TLR-Liganden Poly(I:C) (Poly) stimuliert wurden. Bei den TLR9-HEK Zellen wurde eine TLR9-PCR durchgeführt. Gezeigt sind die jeweiligen TLR-Banden nach einer H-1PV Infektion (p.i.) und Stimulation mit TLR-Liganden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (0-48 h). Zu sehen ist die verstärkte TLR3- bzw. TLR9-Expression nach H-1PV Infektion. Zur Kontrolle wurde außerdem eine GAPDH-PCR mit beiden transfizierten Zellen durchgeführt.

4.5.2 Untersuchung der TLR-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten mittels FACS-Analyse

Die weiteren Untersuchungen zeigen die FACS-Analysen der TLR-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten.

Dazu wurden die unterschiedlich transfizierten HEK293 Zellen mit dem H-1PV infiziert und mit dem jeweiligen Liganden stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit dem entsprechenden TLR-Antikörper angefärbt und analysiert.

Abbildung 38 A zeigt die TLR-Expression der TLR3-HEK Zellen. Eine Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) führte zu einem fast 5-fachen Anstieg der TLR3-Expression. Die H-1PV Infektion verstärkte die TLR3-Expression um das ca. 10-fache. Auch die Kombination aus Poly(I:C) und H-1PV bewirkte einen Anstieg um das 10-fache.

In Abbildung 38 B ist die TLR9-Expression der TLR9-HEK Zellen zu sehen. Eine Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG führte hier lediglich zu einem Anstieg der TLR9-Expression um das 2-fache. Die H-1PV Infektion hingegen verstärkte die TLR9-Expression um das ca. 15-fache. Die kombinierte Behandlung der Zellen erhöhte die TLR9-Expression um das ca. 4-fache. Die TLR-2-Expression in TLR2/6-transfizierten Zellen zeigt Abbildung 38 C. Deutlich zu sehen ist, dass weder die Behandlung mit dem TLR2-Liganden Zymosan noch die Infektion mit H-1PV eine nennenswerte Veränderung der TLR2-Expression hervorrief. Auch in den TLR2-transfizierten Zellen war kein deutlicher Anstieg der TLR2-Expression nach Stimulation und Infektion zu verzeichnen (Abb. 38 D).

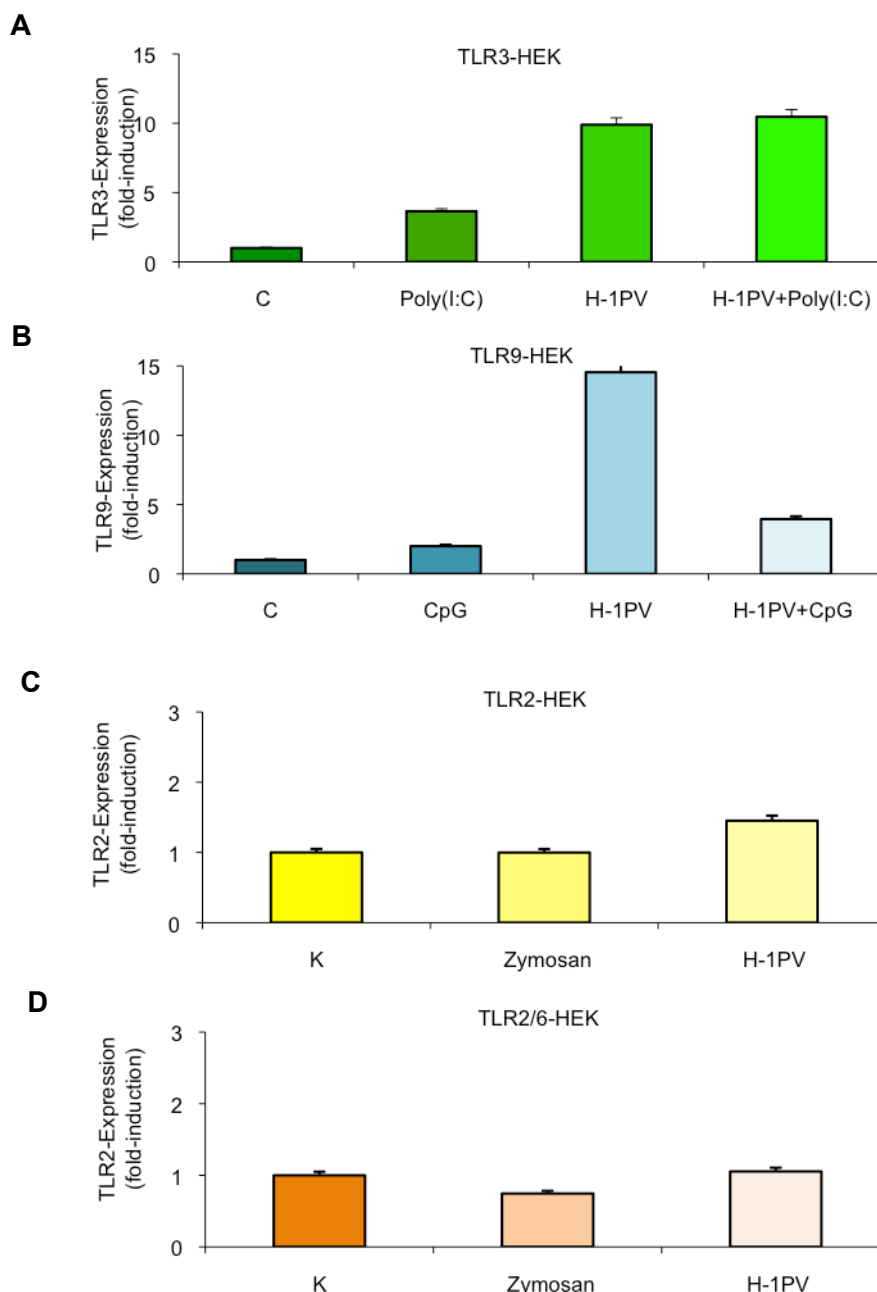


Abbildung 38: FACS-Analyse zum Nachweis der Expression von TLR3, TLR9 und TLR2
 Die transfizierten HEK293 Zellen wurden nach H-1PV Infektion und Behandlung mit TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG, Zymosan) mittels FACS-Analyse untersucht. K bezeichnet die unbehandelte Kontrolle. Die Expression wird als fold-induction dargestellt. Abb. 38 A und B zeigen die TLR3- und TLR9-Expression in unbehandelten (K), mit dem jeweiligen TLR-Liganden (CpG oder Poly(I:C)) stimulierten und H-1PV-infizierten TLR3- und TLR9-Transfektanten. Sowie die Expression nach H-1PV Infektion in Kombination mit TLR-Liganden Stimulation. Zu sehen ist die verstärkte TLR3- bzw. TLR9-Expression nach H-1PV Infektion. Abb. 38 C+D zeigen die TLR2-Expression in unbehandelten (K), mit dem TLR-Liganden Zymosan behandelten und H-1PV-infizierten TLR2- und TLR2/6-Transfektanten. Zu sehen ist die nur gering veränderte TLR-Expression.

In wt HEK293 Zellen führte eine Stimulation mit den TLR-Liganden Poly(I:C), CpG und Zymosan zu keiner erhöhten Expression der entsprechenden TLRs. Die Infektion mit H-1PV führte in den wt HEK293 Zellen zu keiner nennenswerten Erhöhung der TLR3-Expression und die TLR9-Expression wurde lediglich um das 1,8-fache erhöht (Abb. 39 A+B). Auch die TLR2-Expression wurde nur um das etwas über 2-fache erhöht (Abb. 39 C). Vergleicht man

dies mit dem Einfluss der H-1PV Infektion auf die TLR-Expression in den transfizierten Zellen, war es nur eine minimale Steigerung, da in den transfizierten Zellen eine bis zu 15-fache Expressionserhöhung erreicht werden konnte.

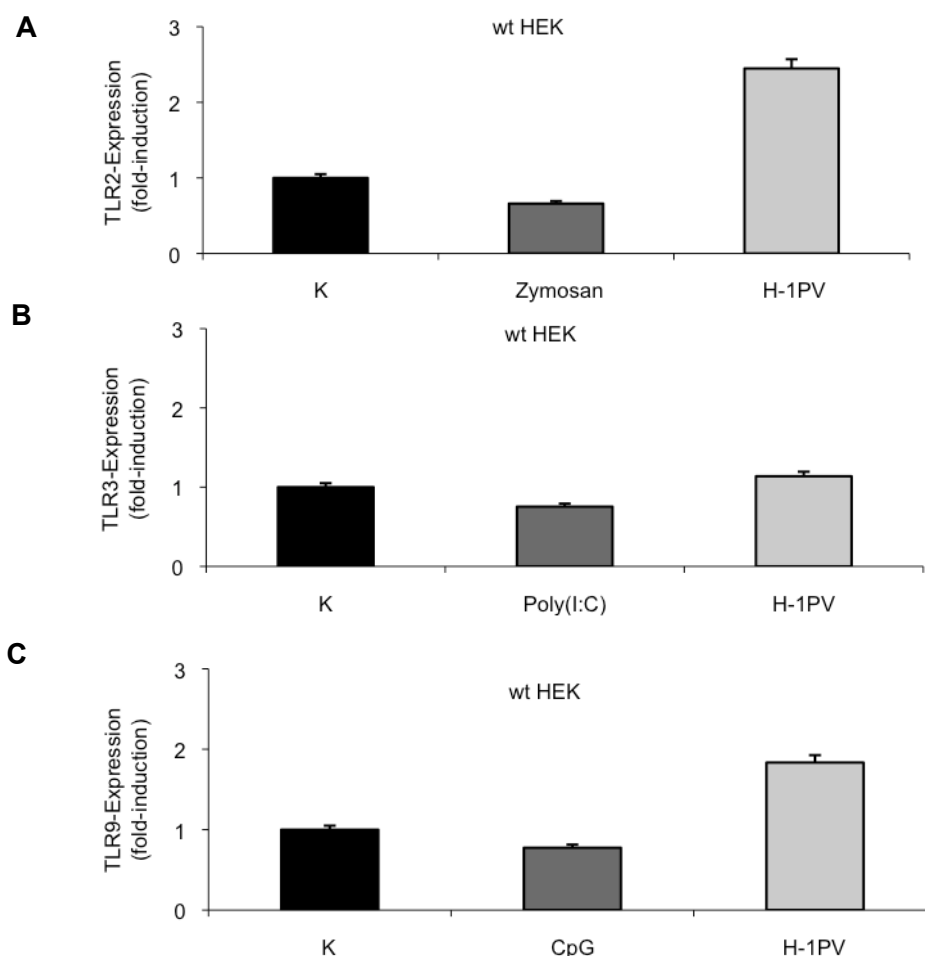


Abbildung 39: FACS-Analyse der TLR-Expression wildtyp HEK293 Zellen

wt HEK293 Zellen wurden nach H-1PV Infektion und Behandlung mit TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG, Zymosan) mittels FACS-Analyse untersucht. K bezeichnet die unbehandelte Kontrolle. Die Expression wird als fold-induction dargestellt. Abb. 39 A, B und C zeigen die TLR2-, TLR3- und TLR9-Expression in unbehandelten (K), mit dem jeweiligen TLR-Liganden (Zymosan, Poly(I:C) oder CpG) stimulierten und H-1PV-infizierten wt HEK293 Zellen. Zu sehen ist die nur gering veränderte TLR-Expression.

Um auszuschließen, dass die SK29Mel Zellen eine TLR-Expression hervorbringen und so in den Kokultursversuchen die Ergebnisse verfälschen, wurden auch hier FACS-Analysen nach Liganden-Stimulation und H-1PV Infektion durchgeführt. In den SK29Mel Zellen führte weder die Stimultion mit Poly(I:C) zu einer erhöhten TLR3-Expression (Abb. 40 A), noch bewirkte die Stimulation mit CpG eine verstärkte TLR9-Expression (Abb. 40 B). Auch eine H-1PV Infektion beeinflusste die TLR3- und TLR9- Expression nicht.

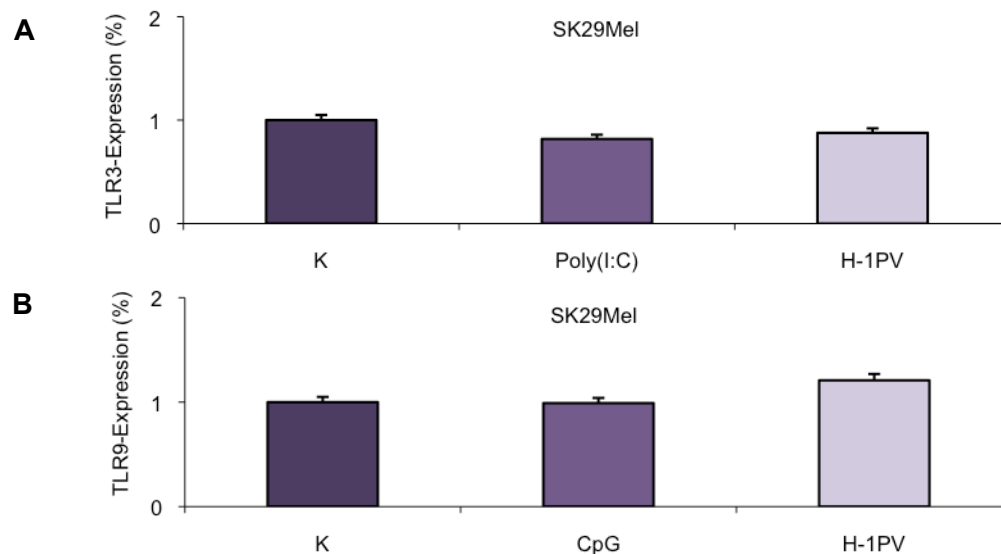


Abbildung 40: FACS-Analyse der TLR3- und TLR9-Expression in SK29Mel Zellen
 SK29Mel Zellen wurden nach H-1PV Infektion und Behandlung mit TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG) mittels FACS-Analyse untersucht. K bezeichnet die unbehandelte Kontrolle. Abb. 40 A zeigt die TLR3-Expression in unbehandelten (K), H-1PV-infizierten (H-1PV) und mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) behandelten SK29Mel Zellen. Abb. 40 B zeigt die TLR9-Expression nach jeweiliger Behandlung. Zu erkennen ist die unveränderte TLR-Expression in SK29Mel Zellen.

4.6 Untersuchung der Signaltransduktion

4.6.1 Nachweis der NFκB-Translokation in HEK293 Zellen nach Infektion mit Parvovirus H-1 mittels Western Blot

Wenn die Erkennung von H-1PV über TLRs erfolgt, bringt dies auch eine veränderte Expression des Transkriptionsfaktors NFκB mit sich. Deshalb sollte nun die Rolle der TLRs und deren angeschalteter Signalweg weitergehend untersucht werden.

Wie bereits gezeigt werden konnte, reagierten die HEK293 Zellen auf eine H-1PV Infektion mit einer gesteigerten Expression der Toll-like Rezeptoren 3 und 9.

Zur weiteren Untersuchung der NFκB-Translokation wurden Antikörper für die NFκB Untereinheit p65 verwendet. Die Untersuchung erfolgte sowohl anhand von Western Blot als auch mithilfe von FACS-Analysen.

Um den Nachweis zu erbringen, dass jeweils dieselbe Menge an Protein eingesetzt wurde, erfolgte die Durchführung eines Western Blots mit dem spezifischen Antikörper für Aktin, das konstitutiv in der Zelle vorkommt.

Anhand der gesteigerten NFκB-Expression und einer NFκB-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern konnte der Signalweg der aktivierten TLRs belegt werden. Demnach wurde in H-1PV-infizierten Zellen die NFκB-Expression untersucht.

Die folgende Abbildung 41 zeigt die NFκB-Expression in TLR3-transfizierten HEK293 Zellen 24 Stunden nach H-1PV Infektion. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich

eine gesteigerte NFκB-Expression nach H-1PV Infektion. Zudem wurden die TLR3-transfizierten HEK293 Zellen mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Hier bewirkte die Behandlung mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) eine konzentrationsabhängig gesteigerte NFκB-Expression. Eine Konzentration von 10 µg/ml Poly(I:C) verstärkt die NFκB-Expression deutlich mehr im Vergleich zu einer Konzentration von 0,1 µg/ml.

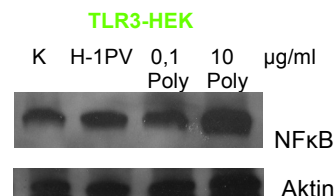


Abbildung 41: NFκB-Expression

Zum Nachweis der NFκB-Expression wurden die Zellen mittels Western Blot nach Infektion mit dem H-1PV und TLR-Liganden Zugabe analysiert. Zu sehen ist die NFκB-Expressionsbande in unbehandelten (K), H-1PV-infizierten (H-1PV) und mit dem TLR-Liganden Poly(I:C) (Konzentration 0,1 und 10 µg/ml) behandelten Proben. Zudem sind die Aktinbanden, das als Ladekontrolle dient, zu sehen.

Ein Aktivierungsmerkmal für NFκB ist dessen Translokation vom Zytoplasma der ruhenden Zelle in den Zellkern der aktivierten Zelle.

Demnach zeigen die weiteren Untersuchungen die Translokation von NFκB in den transfizierten HEK293 Zellen nach einer H-1PV Infektion. Zur Analyse der NFκB-Translokation wurden die transfizierten HEK293 Zellen in 10 cm Schalen ausgesät, mit H-1PV infiziert oder den jeweiligen TLR-Liganden stimuliert. Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurde aus den Zellen Kern- und Zytoplasmaextrakte gewonnen und diese mit Hilfe der Western Blot Methode auf Proteinebene untersucht.

Die NFκB-Expression wurde in den Zytoplasma-Extrakten über einen Zeitraum von 48 h immer geringer. Dies war in beiden Zellen (TLR3- und TLR9-transfiziert) der Fall. In den TLR3-transfizierten Zellen war nach 96 h nahezu kein NFκB mehr im Zytoplasma detektierbar. Im Kern hingegen zeigte sich eine ansteigende NFκB-Expression. Dies war sowohl bei den TLR3- als auch bei den TLR9-transfizierten HEK293 Zellen der Fall. Bereits 24 h nach Infektion war die Bande in den TLR3-transfizierten Zellen deutlich stärker als zu den Zeitpunkten davor. Für die TLR9-transfizierten Zellen war dies 48 h nach Infektion der Fall. In Abbildung 42 sieht man demnach eine deutliche Verschiebung des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Kern. Gelangt NFκB in den Zellkern, werden dort NFκB-abhängige Gene transkribiert, die Zellen sind demnach aktiviert.

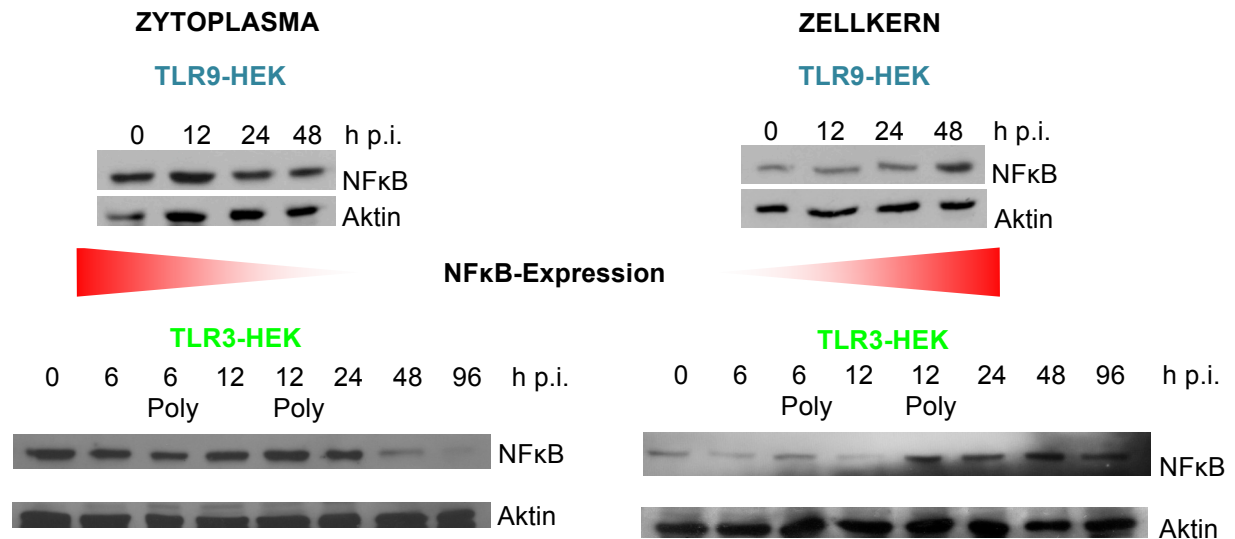


Abbildung 42: NFκB-Translokation der TLR3- und TLR9-Transfektanten

Zum Nachweis der NFκB-Translokation wurden die Zellen mittels Western Blot nach Infektion mit dem H-1PV oder Zugabe von TLR-Liganden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0-96 h) analysiert. Gezeigt sind die Proteinbanden nach H-1PV Infektion und Poly(I:C)-Stimulation in den unterschiedlichen Zellfraktionen (Zytoplasma und Zellkern), sowie die Banden der Ladekontrolle Aktin. Zu sehen ist die nachlassende NFκB-Expression im Zytoplasma, sowie die ansteigende NFκB-Expression im Zellkern.

Auch in den TLR2/6- und TLR2-transfizierten HEK293 Zellen führte eine Infektion mit H-1PV zu einer Translokation von NFκB. Hier war die gesteigerte NFκB-Expression im Zellkern allerdings nicht so nachdrücklich zu erkennen wie bei den TLR3- und TLR9-transfizierten Zellen (Abb. 43). Erkennbar war der Anstieg der NFκB-Expression im Zellkern. Nach 24 h war die NFκB-Bande in beiden Zelllinien verstärkt.

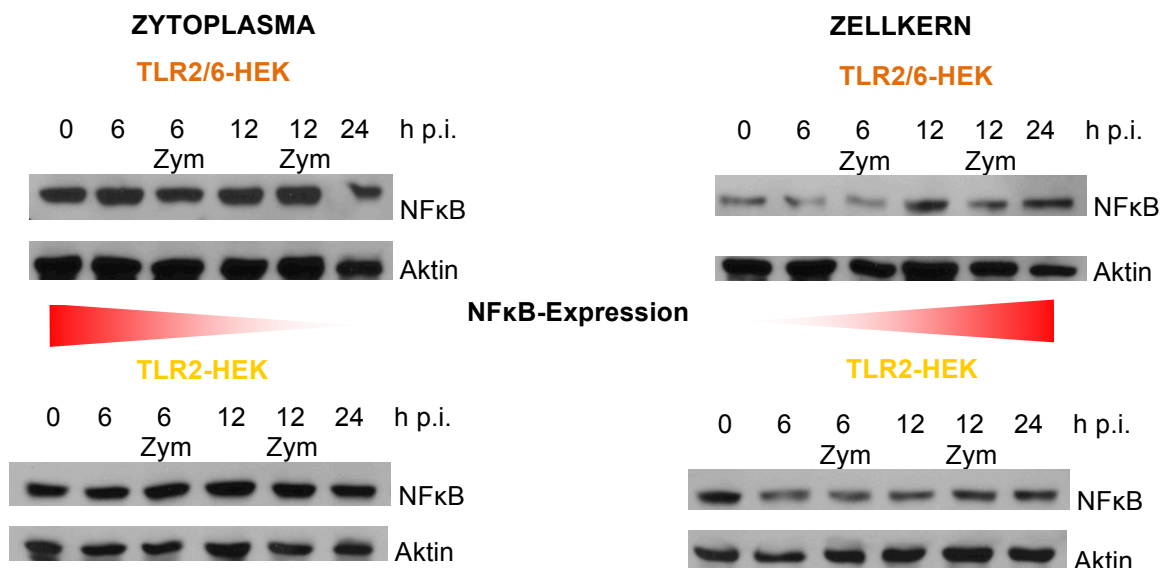


Abbildung 43: NFκB-Translokation der TLR2- und TLR2/6-Transfektanten

Zum Nachweis der NFκB-Translokation wurden die Zellen mittels Western Blot nach Infektion mit dem H-1PV oder Zugabe von TLR-Liganden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0-24 h) analysiert. Zu sehen sind die Proteinbanden nach H-1PV Infektion und Zymosan-Stimulation in den unterschiedlichen Zellfraktionen (Zytoplasma und Zellkern), sowie die Banden der Ladekontrolle Aktin. Erkennbar sind die nachlassende NFκB-Expression im Zytoplasma, sowie die ansteigende NFκB-Expression im Zellkern.

4.6.2 NFκB-Expressionsanalysen mittels FACS

Die Expression von NFκB wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper untersucht. Die unterschiedlich behandelten Zellen wurden mit einem PE-konjugierten NFκB-Antikörper angefärbt und mit einem FACS-Gerät analysiert.

Anhand von Inhibitionsversuchen konnte der Relevanznachweis für die Erkennung von H-1PV über TLRs erfolgen. Eine TLR- bzw. NFκB-Blockade wurde durch den Einsatz entsprechender Inhibitoren erreicht.

Chloroquine wirkt als lysosomtrophische Substanz einer endosomalen Ansäuerung entgegen. Dieser Prozess spielt allerdings bei den TLR-Signalwegen eine Rolle, so dass er bei Chloroquinegabe unterbrochen wird. Bei dem Inhibitor Chloroquine handelt sich um eine leicht basische Substanz, die sich in den sauren Teilen der Zelle, wie Endosomen und Lysosomen anreichert. Durch die Anreicherung wird die endosomale Azidifizierung inhibiert und es führt zu einer Inhibition der lysosomalen Enzyme die einen sauren pH-Wert benötigen. Da ein saurer pH-Wert in den Endosomen zur TLR-Aktivierung benötigt wird, kann Chloroquine als Antagonist für endosomale TLRs eingesetzt werden.

Da TLR3 und TLR9 endosomale Rezeptoren sind, wurden sie eine Stunde vor H-1PV Infektion oder TLR-Ligandenzugabe mit Chloroquine behandelt.

Eine Inhibition von NFκB kann auch durch die Behandlung mit Celastrol erreicht werden. Bei der Substanz Celastrol handelt es sich um ein aus der chinesischen Pflanze *Tripterygium wilfordii* isoliertes Triterpen. Die Gabe von Celastrol führt zu einer Inhibition des Transkriptionsfaktors NFκB. Celastrol inhibiert den Transkriptionsfaktor NFκB indem es auf die IκB kinase und TAK1-induzierte NFκB-Aktivierung abzielt [177, 178].

In Abbildung 44 sind die NFκB-Expressionsraten der unterschiedlich transfizierten HEK293 Zellen zu sehen. Abbildung 44 A zeigt, dass die Stimulation mit Poly(I:C) in den TLR3-transfizierten zu einer verstärkten NFκB-Expression führte. Die Behandlung mit dem TLR-Inhibitor Chloroquine, sowie dem NFκB-Inhibitor Celastrol hingegen bewirkte eine verringerte NFκB-Expression. Eine Infektion mit dem Parvovirus H-1 erhöhte die NFκB-Expression in einem größeren Maß, als die Stimulation mit dem TLR-Liganden. Die Kombination von beiden führte zu keiner stärkeren Expression als durch Infektion alleine. Durch die Zugabe der Inhibitoren vor bzw. nach H-1PV Infektion wurde die NFκB-Expression wie zu erwarten verringert. Hier wurde die NFκB-Expression von Chloroquine/H-1PV im Vergleich mit Celastrol/H-1PV stärker inhibiert.

Auch in den TLR9-transfizierten Zellen führte die H-1PV Infektion zu einer verstärkten Expression von NFκB (Abb. 44 B). Allerdings in einem nicht so großen Ausmaß wie in den TLR3-transfizierten Zellen. Die zusätzliche Stimulation mit CpG hingegen erhöhte die NFκB-Expression deutlich.

Wie in Abb. 44 B deutlich zu sehen, inhibierte die Zugabe von Chloroquine vor H-1PV Infektion, die NFκB-Expression. Die kombinierte Behandlung mit Celastrol und H-1PV Infektion hingegen verringerte die NFκB-Expression nicht. Dies war auch bei der kombinierten Gabe von CpG und Chloroquine der Fall.

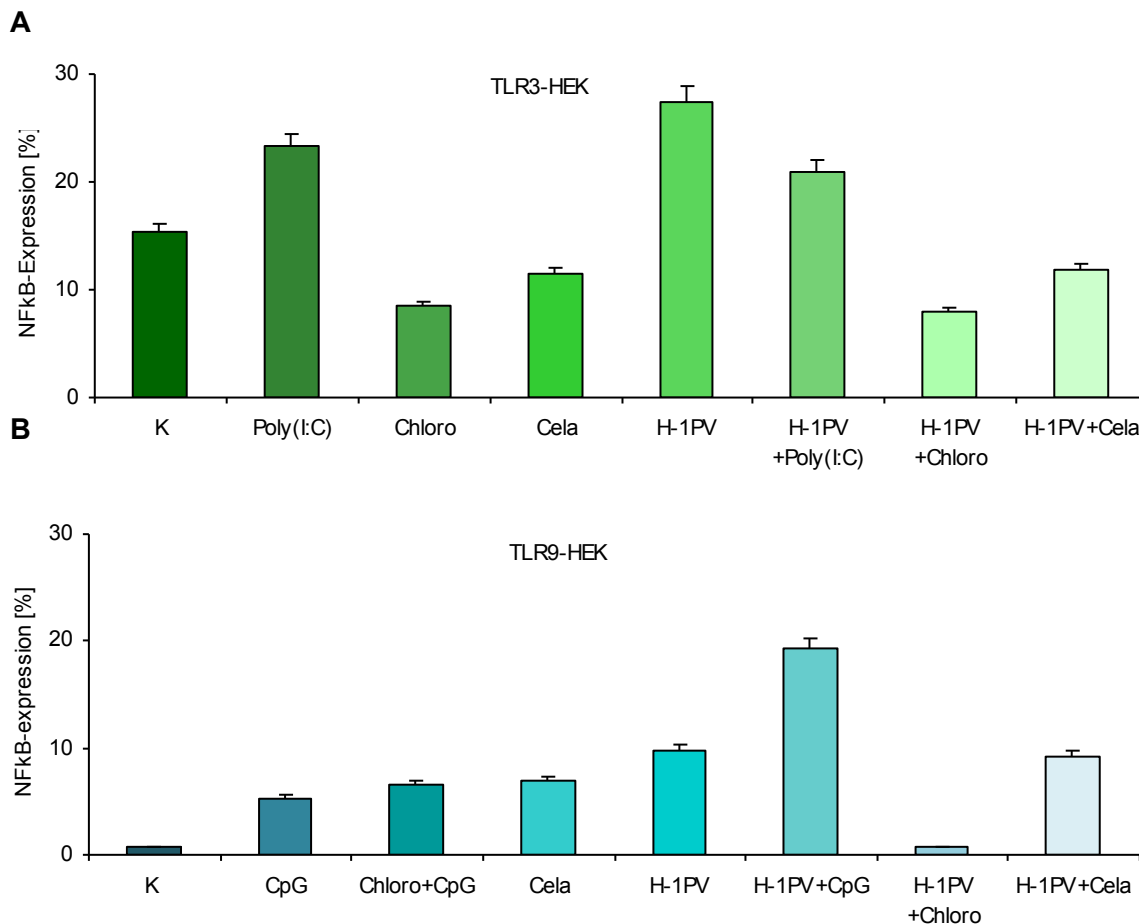


Abbildung 44: NFκB-Expression der TLR3- und TLR9-Transfektanten

Zum Nachweis der NFκB-Expression wurden die transfizierten Zellen mittels FACS nach Infektion mit dem H-1PV oder Zugabe von TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG), dem TLR-Inhibitor Chloroquine (Chloro) und NFκB-Inhibitor Celastrol (Cela) sowie deren Kombination analysiert. K bezeichnet die unbehandelte Kontrolle. Zu sehen ist die NFκB-Expressionen nach unterschiedlicher Behandlung in den TLR3-transfizierten (A) und TLR9-transfizierten HEK293 Zellen (B). Nach einer H-1PV Infektion wurde die NFκB-Expression in beiden Fällen erhöht.

Die wt HEK293 Zellen wurden ebenfalls nach unterschiedlicher Behandlung auf ihre NFκB-Expression hin untersucht. Zu sehen ist in Abbildung 45 auch hier eine gesteigerte NFκB-Expression nach H-1PV Infektion. Zudem wurde auch in den wt HEK293 Zellen die zusätzliche Gabe von Chloroquine vor H-1PV Infektion die NFκB-Expression gehemmt. Celastrol hingegen beeinflusste die Expression nur in geringem Maße.

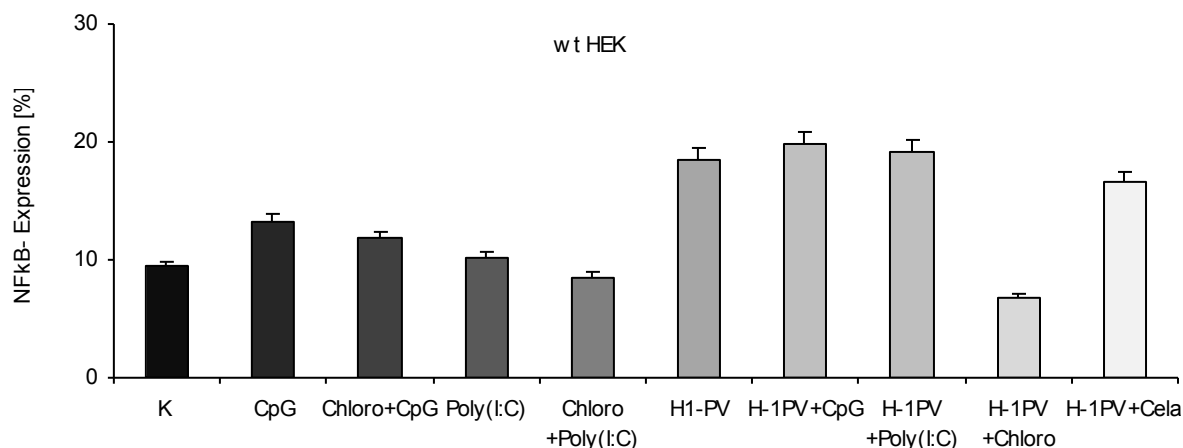


Abbildung 45: NFκB-Expression der wt HEK293 Zellen

Zum Nachweis der NFκB-Expression wurden wt HEK293 Zellen mittels FACS nach Infektion mit dem H-1PV oder Zugabe von TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG), dem TLR-Inhibitor Chloroquine (Chloro) und NFκB-Inhibitor Celastrol (Cela) sowie deren Kombination analysiert. K bezeichnet die unbehandelte Kontrolle. Zu sehen ist die NFκB-Expressionen nach unterschiedlicher Behandlung in wt HEK293 Zellen.

4.6.3 Aktivität des NFκB-Luciferase-Reportergens in HEK293 Zellen nach Infektion mit Parvovirus H-1 mittels Luciferase-Assay

Die Aktivierung des NFκB-Signalweges über TLR3 und TLR9 wurde mit Hilfe eines NFκB-Luciferase-Reportergens nach Infektion mit Parvovirus H-1 mittels Luciferase-Assay untersucht. Mit Hilfe der transienten Transfektion eines NFκB-Luciferase Reporter Plasmids sollte der quantitative Nachweis der Aktivität von NFκB erbracht werden.

Das hierfür verwendete Plasmid (Methoden 3.3.3) besitzt ein Reporter gen, in diesem Fall Luciferase, dessen Expression durch einen NFκB-induzierbaren ELAM-1 Promotor kontrolliert wird. Endogenes NFκB bindet nach Aktivierung an diesen Promotor, so kommt es zur Aktivierung des Luciferase-Reporter-Genes. Nun kann der quantitative Aktivitätsnachweis von NFκB durch Messung der Luciferase-Aktivität erfolgen.

Die TLR-transfizierten Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und transient mit einem NFκB-Luciferase-Reportergens transfiziert. Anschließend erfolgte die H-1PV Infektion, sowie die Behandlung mit den jeweiligen TLR-Liganden über einen Zeitraum von 24 h. Die NFκB-Aktivierung wurde dann durch Messung der Firefly-Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten gezeigt (Methoden 3.3.4).

Die Aktivierung von NFκB in den TLR-transfizierten Zellen wurden nach Stimulation und H-1PV Infektion mit Hilfe eines Luciferase-Reporterkonstruktes gemessen. Die TLR-Stimulation erfolgte mit den bekannten Agonisten der jeweiligen TLRs. Um die NFκB-Aktivierungen, die durch die Aktivierung der unterschiedlichen TLRs hervorgerufen wurde deutlicher zu machen, wurde die NFκB-Reportergenaktivierung zusätzlich in mit einem NFκB-Inhibitor (Celastrol) behandelten Zellen analysiert.

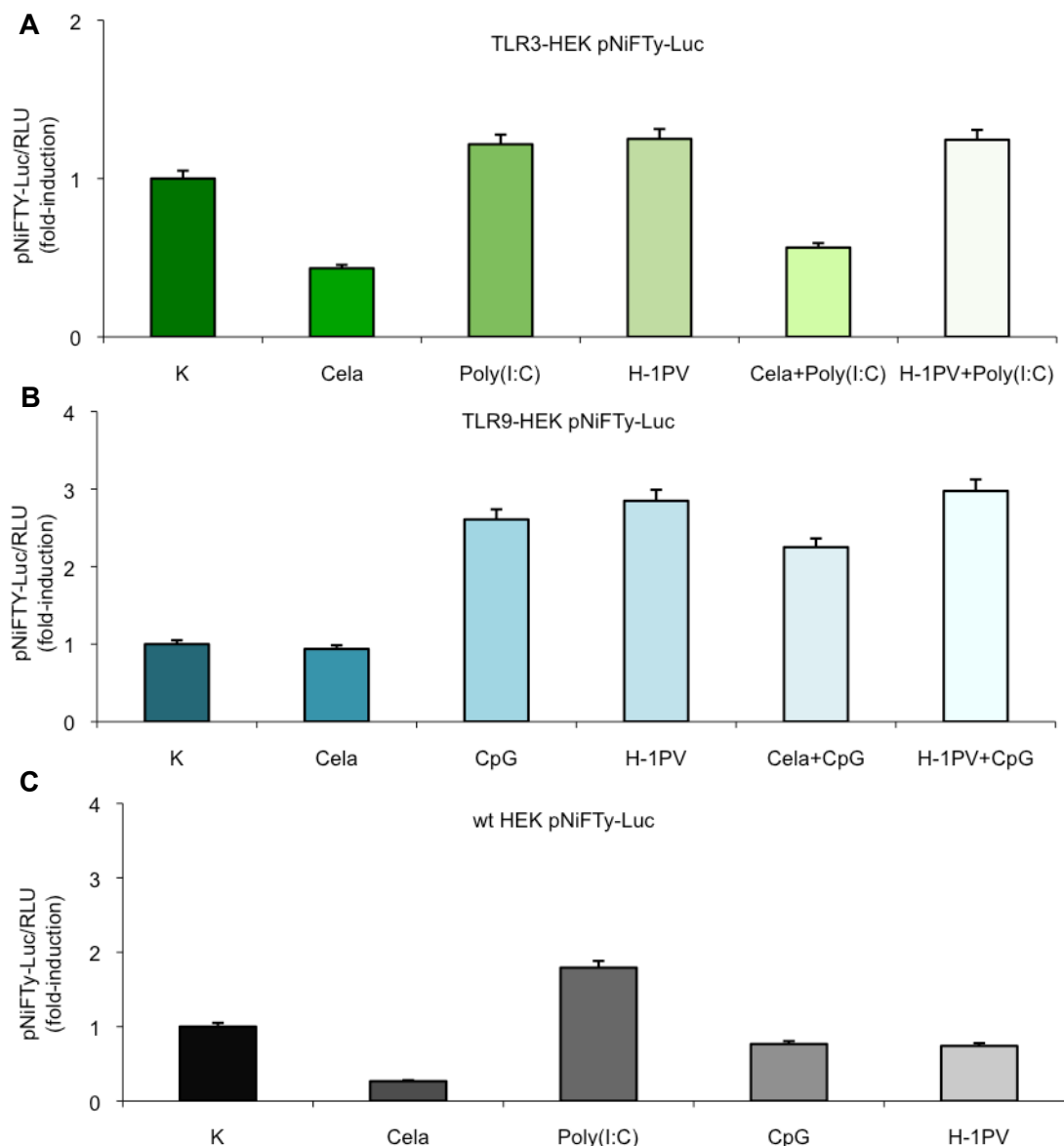


Abbildung 46: NFκB-Aktivierung über TLR

Die Zellen wurden nach der Transfektion des NFκB-Luciferase-Plamids in 6-well Platten kultiviert und mit dem Parvovirus H-1 infiziert oder den jeweiligen TLR-Liganden stimuliert. Dann wurde die NFκB-Aktivität mit Hilfe des Luciferase-Assays ausgewertet. Zu sehen ist die NFκB-Aktivierung in unbehandelten (K), mit Celastrol (Cela), Poly(I:C), CpG und H-1PV-infizierten (H-1PV) Zellen. Die Experimente wurden dreimal mit vergleichbaren Resultaten wiederholt. Die Abbildungen zeigen die Aktivierung von NFκB nach H-1PV Infektion und TLR-Stimulation in TLR3- (A) und TLR9-transfizierten (B). Die wt HEK293 Zellen hingegen zeigen keine NFκB-Aktivierung nach H-1PV Infektion (C).

Die Ergebnisse zeigten, dass eine H-1PV Infektion in den TLR-transfizierten Zellen in der Lage war, eine Aktivierung von NFκB hervorzurufen.

In den TLR9-transfizierten Zellen bewirkte die Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG eine Aktivitätssteigerung um das 3-fache (Abb. 46 A). Nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 konnte ebenfalls eine 3-fache Induktion der Luciferase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem NFκB-Inhibitor Celastrol hingegen führte wie zu erwarten in beiden Zelllinien zu keiner NFκB-Aktivität. Bei der kombinierten Behandlung der TLR9-transfizierten HEK293 Zellen mit Celastrol und CpG kommt es zu einer verringerten NFκB-Aktivität im

Vergleich zur CpG-Gabe alleine (Abb. 46 B). Die kombinierte Behandlung der TLR3-transfizierten Zellen mit Celastrol und dem TLR3-Liganden Poly(I:C), führte durch den NFκB-Inhibitor Celastrol zu einer Hemmung der NFκB-Aktivität. Eine H-1PV Infektion führte in den TLR3-transfizierten Zellen ebenfalls zu einer gesteigerten NFκB-Aktivität um das 3-fache. Die wt HEK293 Zellen zeigten lediglich bei der Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) eine erhöhte NFκB-Aktivität. Die Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG und eine H-1PV Infektion wirkten sich nicht auf die NFκB-Aktivität aus (Abb. 46 C).

4.7 Untersuchung der IκB-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten

Zur weiteren Untersuchung zählt die Analyse der IκB-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten.

NFκB liegt in der Zelle bereits als Protein vor, allerdings in einer inaktivierten Form. Diese Form kommt durch die Bindung an das Inhibitorprotein IκB zustande und hält es im Zytoplasma zurück. Der NFκB/IκB-Komplex ist die inaktive Form. Bei einer Aktivierung wird NFκB aus diesem Komplex freigesetzt und kann es als aktive Form vom Zytoplasma in den Zellkern wandern. Das freigesetzte IκB hingegen wird proteolytisch abgebaut [179]. Demnach sollte in den folgenden Untersuchungen die Expression von IκB eine Aussage über die NFκB-Aktivierung ermöglichen. Dazu wurden die von unterschiedlich behandelten Zellen erhaltenen Proteinextrakte aus dem Zytoplasma mittels Western Blot auf ihre IκB-Expression hin analysiert. Diese sollte sich nach NFκB-Aktivierung verringern, da durch das Auflösen des NFκB/IκB-Komplexes NFκB freigesetzt wird und IκB proteolytisch gespalten wird.

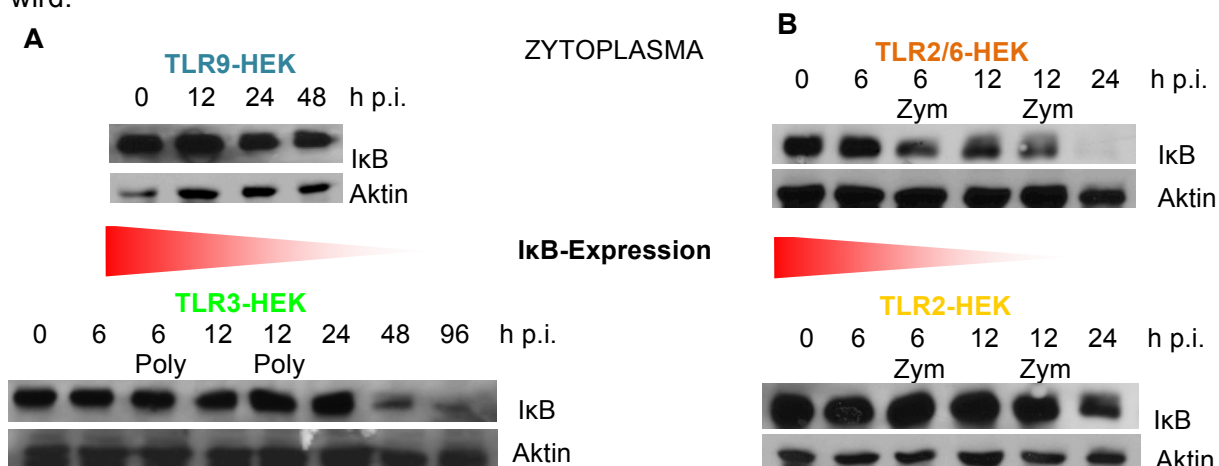


Abbildung 47: IκB-Expression
 IκB-Expression in TLR3-, TLR9-, TLR2/6- und TLR2-transfizierten HEK293 Zellen
 Zum Nachweis der IκB-Expression wurden die Zellen mittels Western Blot nach Infektion mit dem H-1PV oder Zugabe von TLR-Liganden über einen Zeitraum von 0-96 h analysiert. Gezeigt sind die Proteinbanden ind TLR9- und TLR3-tansfizierten Zellen (A) sowie in TLR2/6- und TLR2-transfizierten Zellen (B) nach H-1PV Infektion und Poly(I:C)- oder Zymosan-Stimulation, sowie die Banden der Ladekontrolle Aktin. Zu sehen ist die nachlassende IκB-Expression im Zytoplasma.

Die Abbildungen 47 A+B zeigen die Western Blots der verschiedenen TLR-Transfektanten. In den TLR9-transfizierten Zellen sah man 48 h nach H-1PV Infektion eine verringerte Expression von I κ B. Die TLR9-transfizierten Zellen zeigten nach 48 h eine Verringerung der I κ B-Expression, die dann 96 h nach Infektion nochmals abnahm (Abb. 47 A). Auch die TLR2/6-transfizierten Zellen wiesen eine verringerte I κ B-Expression auf. Dies war hier bereits 12 h nach H-1PV Infektion der Fall und verringerte sich noch weiter nach 24 h. Auch die Stimulation mit dem TLR6-Liganden Zymosan bewirkte eine Verringerung der I κ B-Expression. Die TLR2-transfizierten Zellen hingegen ließen nur eine minimal verringerte I κ B-Expression 24 h nach H-1PV Infektion erkennen (Abb. 47 B).

4.8 Analyse dendritischer Zellen

4.8.1 Analyse der Expression von Oberflächenproteinen auf DCs

Die Generierung von DCs aus PBMCs wurde wie im Material und Methoden Teil beschrieben durchgeführt. Die isolierten Monozyten wurden zur Herstellung von unreifen DCs mit GM-CSF und IL-4 für 7 Tage kultiviert. Um reife DCs zu erhalten wurde am zweiten Tag nach der Isolation ein zusätzlicher Zytokincocktail zugegeben. Die darin enthaltenen Zytokine bewirken eine Ausreifung der dendritischen Zellen. Im Anschluss konnten die DCs für Versuche verwendet werden.

Anhand der Expression des Oberflächenproteins CD86 können Rückschlüsse auf den Reifungsgrad der DCs gezogen werden. Die erhöhte Expression ist ein Indikator für die Ausreifung der DCs. Demnach wurde eine durchflusszytometrische Analyse des charakteristischen Oberflächenmarkers CD86 durchgeführt.

Wie in Abbildung 48 dargestellt, hatten DCs, die ohne jeglichen Reifungsstimulus kultiviert wurden, wie zu erwarten eine niedrige Expressionsdichte für den Reifungsmarker CD86. In diesem Fall wurde diese Expression als 1 gesetzt und die Expression entsprechend als fold-induction berechnet.

Bei den mit einem Zytokincocktail behandelten DCs konnte eine Expressionszunahme um das 2,8-fache des untersuchten Oberflächenmarkers gezeigt werden. Bei den mit LPS stimulierten Zellen kam es zu einer um das 1,5-fache erhöhten CD86-Expression im Gegensatz zu den unstimulierten und demnach unreifen dendritischen Zellen.

Dabei war zu beobachten, dass sich die Stimulation mit Poly(I:C) im Bezug auf die Expression von CD86 als potentester Stimulus für iDCs erwies. In Abbildung 48 ist zu sehen, dass Poly(I:C) zu einem deutlichen Anstieg der CD86-Expression in iDCs führte. So erhöhte sich zum Beispiel CD86-Expression im Vergleich zu iDCs nach Stimulation mit dem TLR-Liganden Poly(I:C) um das ca. 4-fache. Ähnlich verhielt es sich nach der Stimulation mit dem

TLR-Liganden CpG, hier stieg die Expression der iDCs um das 3-fache. Bei mit dem TLR9-Liganden CpG stimulierte mDCs kam es zu einer CD86-Expressionserhöhung um das 3,5-fache. Bei mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) stimulierten mDCs stieg die CD86-Expression um das 3,5-fache.

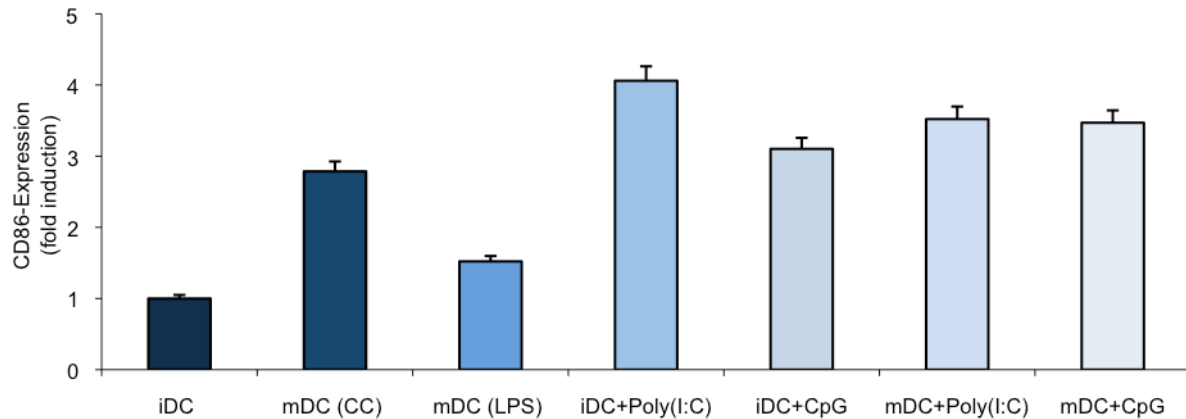


Abbildung 48: CD86-Expression von mit TLR-Liganden stimulierten DCs

DCs wurden mit den TLR-Liganden CpG und Poly(I:C) stimuliert. Als Positivkontrolle dienten die mit einem Zytokincocktail (CC) oder LPS zur Ausreifung gebrachten DCs. Am 7.Tag der Kultur wurden sie geerntet, markiert und gemessen. Gezeigt sind die Unterschiede der CD86-Expression in iDCs und mDCs nach unterschiedlicher Stimulation. Zu sehen ist die gesteigerte CD86-Expression nach Stimulation mit TLR-Liganden.

Im folgenden Experiment sollte getestet werden, ob H-1PV-induzierte TCL DCs zur Ausreifung bringen können. Der nachfolgende Versuch zeigt die Expressionsanalyse des kostimulatorischen Moleküls CD86 nach Kokulturversuchen.

Unreife DCs reagierten auf Zugabe der TCL von H-1PV infizierten SK29Mel Zellen mit einer verstärkten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (siehe Abb. 49).

Die Inkubation der DCs mit H-1PV infizierten SK29Mel Zellen führte zu einer erhöhten CD86-Expression. Demnach führte der Kontakt von DCs mit H-1PV-induzierten Tumorzelllysaten zu deren Ausreifung.

Die Stimulation der DCs mit H-1PV-induzierten TCL führte zu einer CD86-Expression von ca. 34 % der Zellen. Im Gegensatz dazu aktivierten nicht-infizierte SK29Mel Zellen die unreifen DCs nicht. SK29Mel Zellen alleine exprimierten hingegen kein CD86.

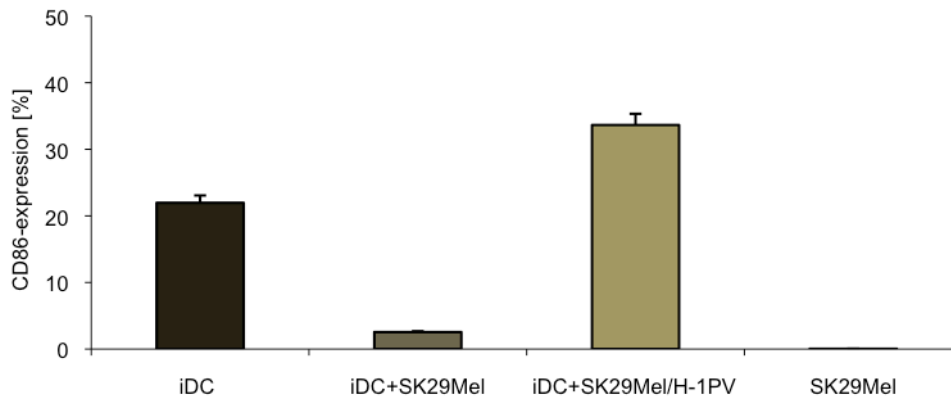


Abbildung 49: Expression des Oberflächenmoleküls CD86

FACS-Analyse der CD86-Expression unterschiedlich stimulierter DCs. Die DCs wurden zum einem mit unbehandelten SK29Mel Zellen und zum anderen mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen kokultiviert. Gezeigt sind die Unterschiede der CD86-Expression in iDCs, sowie nach deren Kokultur mit unbehandelten SK29Mel Zellen und H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen. Zudem ist die CD86-Expression der SK29Mel Zellen gezeigt. Zu sehen ist die gesteigerte CD86-Expression nach Kokultur der DCs mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen.

4.8.2 Untersuchung der TLR9- und TLR3-Expression in DCs

Der nächste Versuch zeigt die Veränderung der Expression von TLRs humaner DCs nach Stimulation mit TLR-Liganden.

Die TLR3-Expression in DCs wurde durch die kombinierte Gabe von Chloroquine und dem TLR3 Liganden Poly(I:C) verringert. Dies war sowohl in iDCs als auch in mDCs der Fall (Abb. 50 A).

Auch die TLR9-Expression wurde bei einer Kombination des TLR-Inhibitors mit dem TLR9-Liganden CpG gehemmt (Abb. 50 B). Wurden allerdings iDCs mit CpG stimuliert, kam es zu einer verstärkten Expression von TLR9. Nach einer Stimulation der mDCs mit CpG kam es ebenfalls zu einer Steigerung der Expression, die aber im Vergleich zu den stimulierten iDCs geringer war.

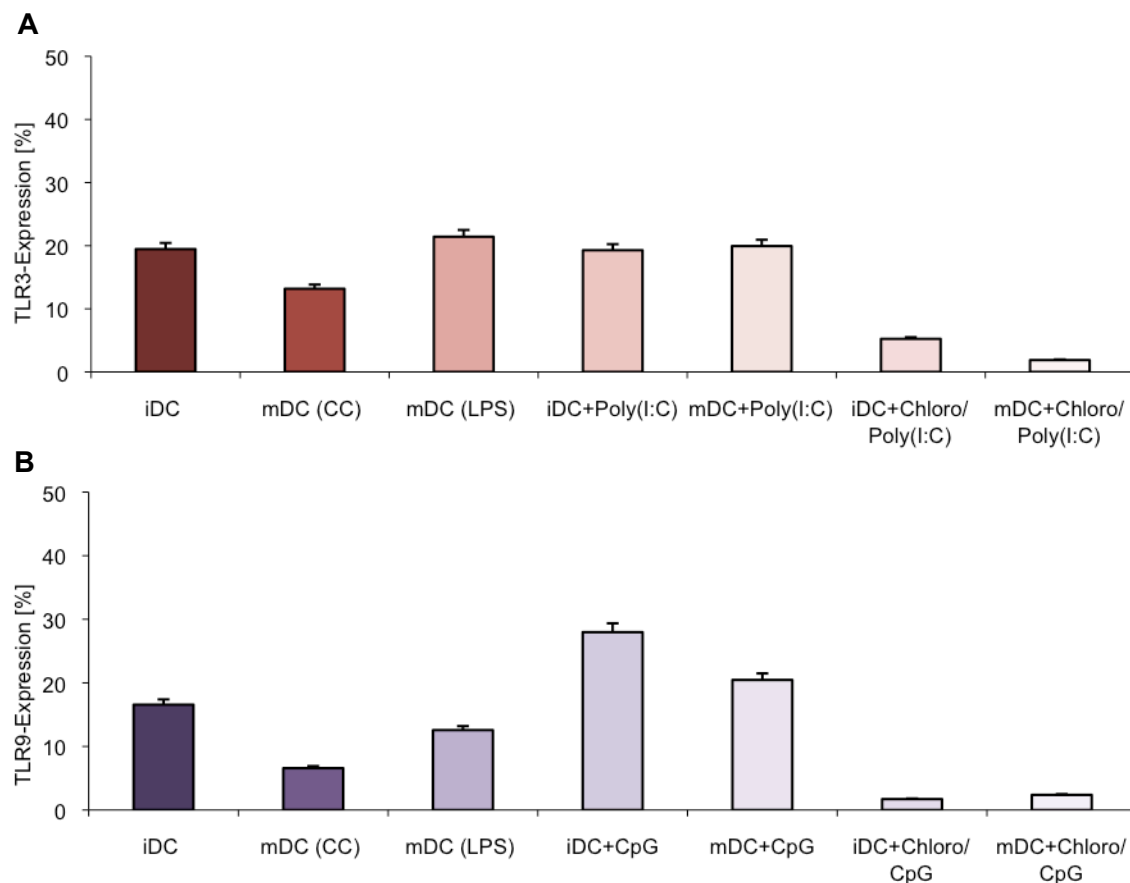


Abbildung 50: TLR3- und TLR9-Expression in unterschiedlich behandelten DCs
 DCs wurden nach Behandlung mit TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG) und dem TLR-Inhibitor Chloroquine (Chloro), sowie deren Kombination mittels FACS-Analyse untersucht. Abb. 50 zeigt die veränderte TLR3- (A) und TLR9-Expression (B) in iDCs, mDCs und mit dem jeweiligen TLR-Liganden (Poly(I:C) oder CpG), sowie die verminderte TLR-Expression in mit dem TLR-Inhibitor Chloroquine behandelten iDCs und mDCs. Zudem ist die verminderte TLR-Expression nach TLR-Liganden Stimulation in Kombination mit dem TLR-Inhibitor Chloroquine gezeigt.

4.9 Expressionsanalysen in DC nach Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel

4.9.1 Bestimmung der TLR-Expression in DC nach Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel

Die Ergebnisse der untersuchten TLR-transfizierten HEK293 Zellen ergab eine TLR3 und TLR9 vermittelte NFκB-Aktivierung. Dies galt es nun in einem geeigneten humanen System weiter zu untersuchen. Das Transfektionssystem der HEK293 Zellen diente der Untersuchung der Beteiligung der einzelnen TLRs, da HEK293 Zellen keine TLR besitzen. Das humane Melanommodell hingegen stellt ein System dar, welches der *in vivo* Situation viel eher entspricht. Nun soll auch hier die veränderte TLR-Expression nach einer H-1PV Infektion der SK29Mel Zellen mit anschließender Kokultur erfolgen. So war es möglich die Interaktion von H-1PV-infizierten Tumorzelllysaten und den TLRs der dendritischen Zellen in einem natürlichen Zusammenhang zu analysieren.

Nun soll die These, dass die stimulatorische Eigenschaft von H-1PV-induzierten TCL auf DCs über den TLR-Signalweg stattfindet bestätigt werden. Demnach müssten einzelne TLRs hochreguliert werden. Wie bereits bekannt, führt die TLR-Aktivierung und deren gesteigerte Expression zu einer erhöhten Anzahl von Aktivierungsmarkern auf den dendritischen Zellen [159].

Um zu untersuchen, ob die TLR-Expression auf DCs durch die Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen verändert wird, wurde die Expression von TLR3 und TLR9 analysiert. Für dieses Experiment wurden die Versuchsansätze mit PE-konjugierten TLR-Antikörpern angefärbt und anhand einer FACS-Analyse untersucht.

In Abbildung 51 A ist deutlich zu erkennen, dass die Kokultur mit H-1PV infizierten SK29Mel Zellen zu einer gesteigerten TLR3-Expression führte. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen der Kokultur mit uninfizierten und infizierten SK29Mel Zellen und deren Kokultur mit den DCs. Bei einer Kokultur mit den unbehandelten SK29Mel Zellen war keine Auswirkung auf die TLR3-Expression der DCs zu erkennen. Die stärkste TLR3-Expression wurde bei mDCs in Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen gefunden. Demnach wirkte sich die Stimulation der DCs mit H-1PV-induzierten TCL auf die Expression von TLR3 aus, indem sie diese verstärkte.

Die TLR9-Expression in iDCs wurde durch die Kokultur mit unbehandelten SK29Mel Zellen nicht erhöht (Abb. 51 B). Eine Kokultivierung mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen hingegen bewirkte sowohl bei iDCs als auch bei mDCs eine deutlich erhöhte Expression des TLR9. Demnach führte auch hier die Kokultur mit H-1PV-induzierten TCL zu einer Erhöhung der TLR-Expression.

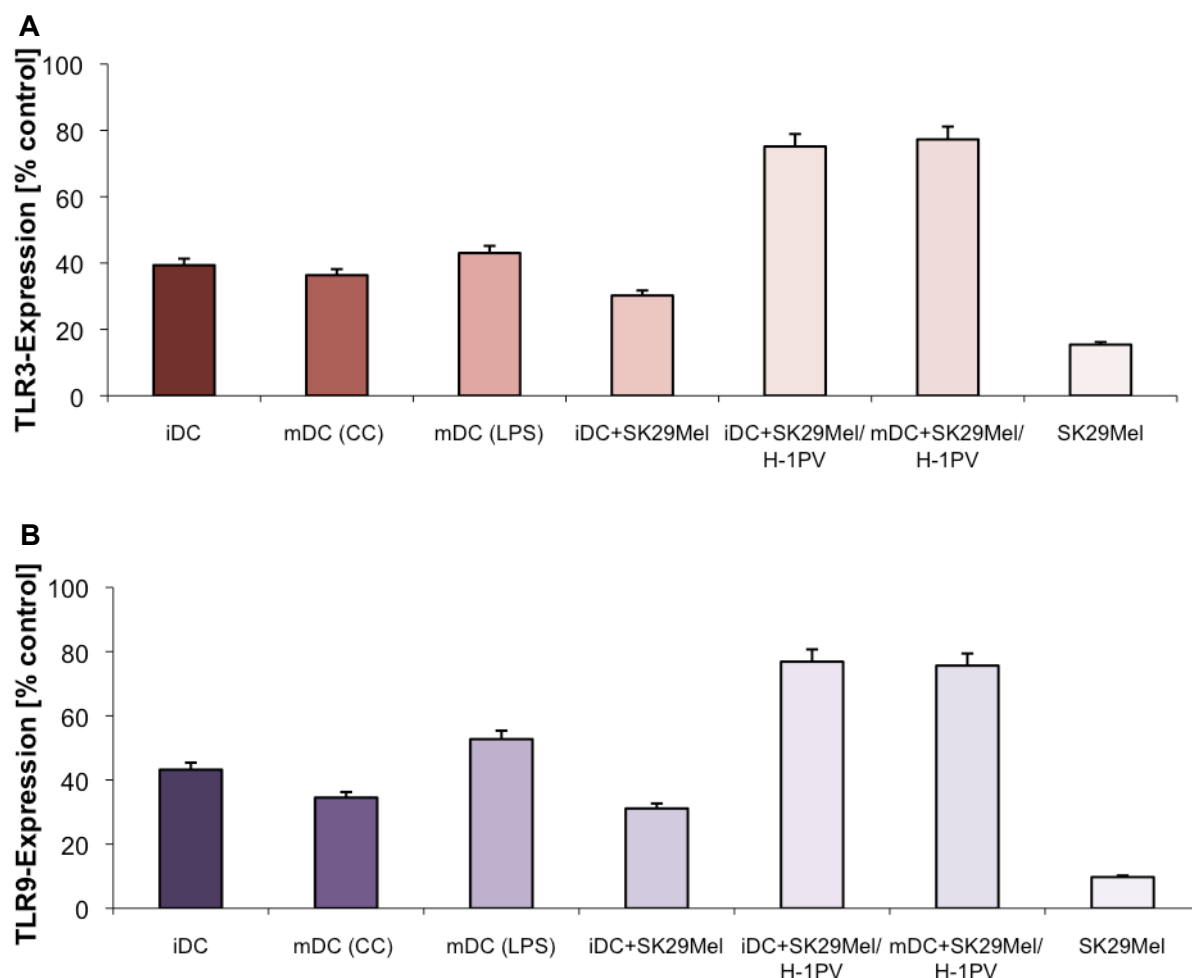


Abbildung 51: TLR3- und TLR9-Expressionsanalyse

FACS-Analyse der TLR3- und TLR9-Expression in unreifen und reifen dendritischen Zellen nach unterschiedlicher Behandlung und Kokultur. DCs wurden im unreifen (iDC), reifen (mDC) Zustand und nach Kokultur mit unbehandelten und H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Abb. 51 zeigt die TLR3-(A) und TLR9-Expression (B) in iDCs, mDCs und in iDCs sowie mDCs nach Kokultur mit unbehandelten oder infizierten SK29Mel Zellen. Zudem ist die TLR3- bzw. TLR9-Expression in SK29Mel Zellen gezeigt. Zu sehen ist die gesteigerte TLR3- und TLR9-Expression nach Kokultur der DCs mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen.

4.9.2 NFκB-Expression in DC-Kokulturversuchen

Erfolgt die Detektion von H-1PV tatsächlich über Mitglieder der TLR-Familie, so müssten die unter den vorangegangenen Punkten gezeigten veränderten Expressionen mit einer ebenfalls veränderten Expression des Transkriptionsfaktors NFκB einhergehen. Deshalb wurden die unterschiedlich inkubierten dendritischen Zellen im Bezug auf ihre NFκB-Expression getestet.

Abbildung 52 zeigt, dass die mit unterschiedlichen Liganden stimulierten Zellen (Poly(I:C), CpG und jeweils die Kombination mit Celastrol) zu keiner verstärkten Expression von NFκB führte. Wurden die unreifen Zellen allerdings mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen kokultiviert bewirkte dies einen Anstieg der NFκB-Expression auf über 60 %. Die Kokultur mit unbehandelten SK29Mel Zellen hingegen führte lediglich zu einer NFκB-Expression von 35 %.

Demnach kann man die Aussage treffen, dass die Detektion von H-1PV-induzierten Tumorzelllysate über TLRs eine erhöhte NFκB-Expression, also eine NFκB-Aktivierung auslöste.

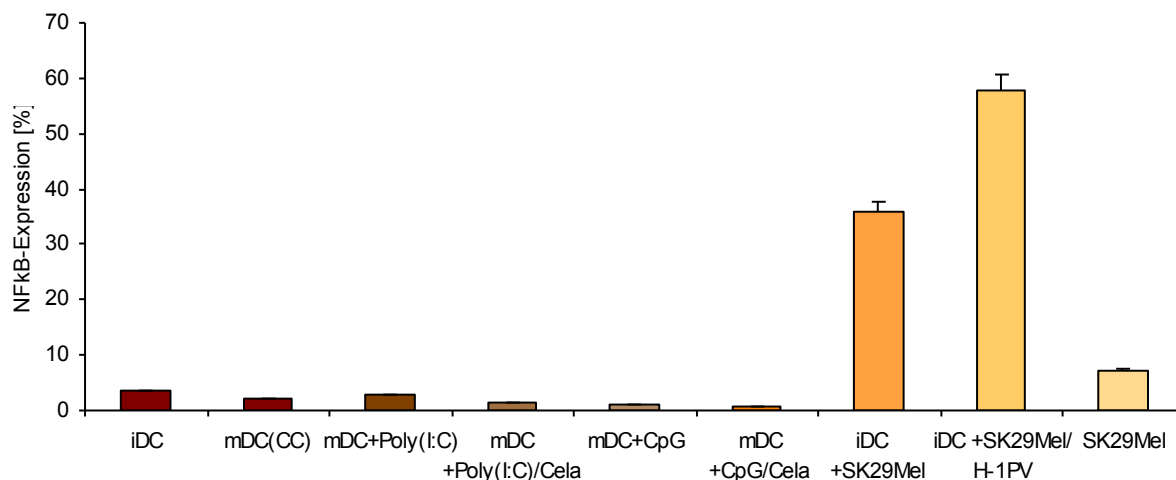


Abbildung 52: NFκB-Expressionsanalyse

FACS-Analyse der NFκB-Expression in unreifen (iDC) und reifen (mDC) dendritischen Zellen nach unterschiedlicher Behandlung und Kokultur. Zum Nachweis der NFκB-Expression wurden die DCs nach Zugabe von TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG) und dem NFκB-Inhibitor Celastrol (Cela) und deren Kombination, sowie nach Kokultur mit unbehandelten und H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen analysiert. Zu sehen ist die deutliche Zunahme der NFκB-Expression in iDCs nach Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen.

4.9.3 Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF-α in DC-Kokulturversuchen

Anhand der NFκB-Translokation und der NFκB-abhängigen Aktivierung des Reportergens konnte die Zellaktivierung nur qualitativ beurteilt werden. Deshalb wurde mittels ELISA die TNF-α-Abgabe von DCs nach der Stimulation mit H-1PV-induzierten TCL untersucht.

Die Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α oder IL-6 sind ein zusätzliches Zeichen der DC-Aktivierung. Die Zytokinproduktion durch DCs führt u.a. zu einer T-Zell-Proliferation und wirkt sich auf die Differenzierung von CD4⁺Zellen aus. Mithilfe von TLR-Agonisten ist es möglich die DC-Reifung über eine Induktion von TNF-α (oder andere inflammatorische Zytokine) zu steigern, und so auch die CD80- und CD86-Expression auf DCs hochzuregulieren [101].

Deshalb wurde nun die Zytokinproduktion der DCs nach der Kokultur mit H-1PV infizierten SK29Mel Zellen untersucht. Um zu zeigen, dass die hier verwendeten DCs ebenfalls aktivierbar sind, wurden DCs ausgesät und Kokulturen angelegt indem sie mit unterschiedlichen TCL versetzt wurden. Dazu wurden zum einen unreife DCs, reife DCs, mit TLR-Liganden behandelte unreife bzw. reife DCs, sowie kokultivierte unreife und reife DCs untersucht, indem die Zytokinproduktion nach der Stimulation bzw. Kokultur mittels ELISA gemessen wurde. Nach 2 Tagen wurde der Zellkulturüberstand nach Zentrifugation auf den

TNF- α -Gehalt hin analysiert.

Wie Abbildung 53 zeigt, sezernierten DCs nach Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen eine hohe Menge an TNF- α (ca. 750 pg/ml). Reife DCs (CC) zeigten einen TNF- α -Gehalt von 960 pg/ml. Eine Stimulation mit unbehandelten SK29Mel Zellen hingegen bewirkte nur eine vergleichsweise sehr geringe Konzentration von TNF- α (ca. 330 pg/ml), was vergleichbar war, mit dem TNF- α -Gehalt unreifer DCs (ca. 380 pg/ml). Durch Stimulation mit dem TLR-Liganden CpG erhöhte sich der Gehalt des Zytokins auf ca. 770 pg/ml für unreife und ca. 1600 pg/ml für reife DCs. Die Stimulation mit Poly(I:C) zeigte bei unreifen DCs 560 pg/ml TNF- α , bei reifen DCs stieg die Sekretion von TNF- α auf 1170 pg/ml.

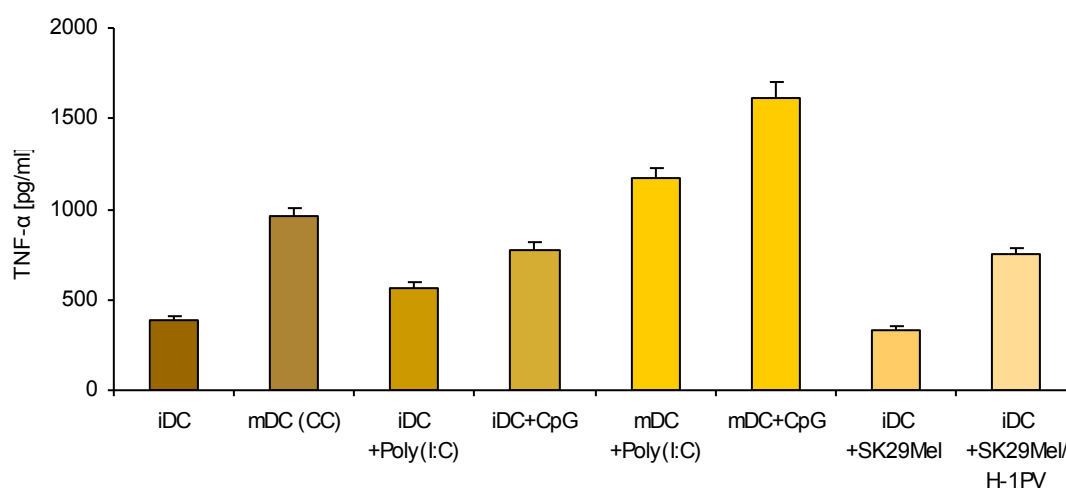


Abbildung 53: TNF- α -Produktion unterschiedlich behandelter DCs

Analyse der TNF- α -Produktion mittels ELISA in unreifen (iDC) und reifen (mDC) dendritischen Zellen nach unterschiedlicher Behandlung und Kokultur. Die TNF- α -Produktion wurde nach Zugabe von TLR-Liganden (Poly(I:C), CpG), sowie nach Kokultur mit unbehandelten und H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen analysiert. Zu sehen ist die verstärkte TNF- α -Produktion von mDCs nach Zugabe von TLR-Liganden, sowie die erhöhte TNF- α -Produktion von iDCs nach Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen.

In den Überständen der kokultivierten DCs mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen konnte demnach eine verstärkte Produktion von TNF- α beobachtet werden. Dies deutet auf eine DC-Aktivierung hin und ist ein zusätzliches Signal der DC-Reifung.

4.10 Untersuchung der HMGB1-Expression von infizierten und stimulierten HEK293-Transfektanten

Desweiteren sollte die Rolle der HMGB1-Expression nach H-1PV Infektion analysiert werden. HMGB1 wird von allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Es handelt sich um ein in der Evolution hochkonserviertes Kernprotein.

Zur Untersuchung der HMGB1-Expression wurden die Zellen entsprechend behandelt und die Zytoplasmaproteine extrahiert. Die Zytoplasmaextrakte der unterschiedlich behandelten

Zellen wurden mittels Western Blot und eines HMGB1-spezifischen Antikörpers ausgewertet. In den TLR3-transfizierten Zellen war ein Anstieg der HMGB1-Expression zu beobachten (siehe Abb. 54). 24 Stunden nach H-1PV Infektion lag die stärkste HMGB1-Expression vor. Auch in TLR9-transfizierten Zellen bewirkte die Infektion mit H-1PV eine Zunahme der HMGB1-Expression. Hier war schon nach 12 Stunden die stärkste Bande zu erkennen. In den wt HEK293 Zellen hingegen war in den infizierten Zellen keine erhöhte HMGB1-Expression zu verzeichnen. Lediglich die Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) verstärkte die Expression von HMGB1.

Insgesamt konnte nach diesem Ergebnis in den TLR-transfizierten HEK293 Zellen eine verstärkte HMGB1-Expression nach Infektion mit dem Parvovirus H-1 gezeigt werden.

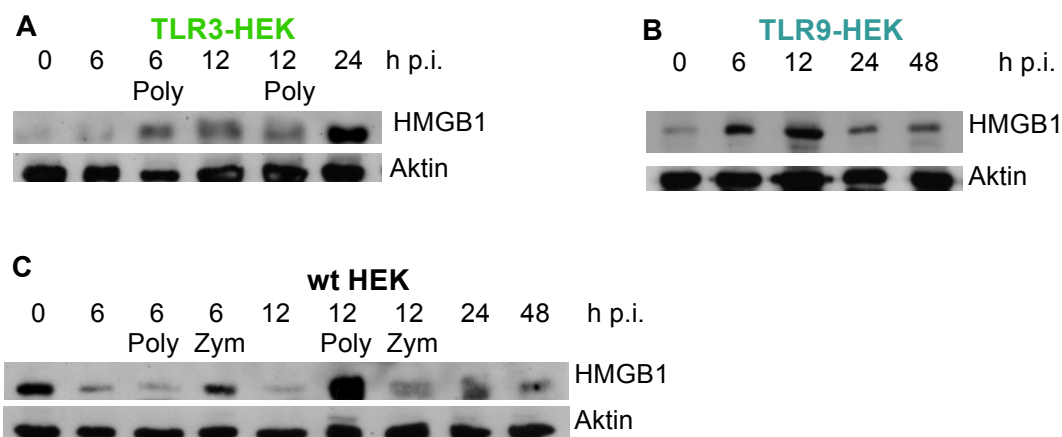


Abbildung 54: HMGB1-Expressionsanalyse

Analyse der HMGB1-Expression in TLR3-(A) und TLR9-transfizierten (B) sowie wt HEK293 Zellen (C) nach unterschiedlicher Behandlung über einen Zeitraum von 0-48 h. Zum Nachweis der HMGB1-Expression wurden die Zellen mittels Western Blot nach Infektion mit dem H-1PV oder Zugabe von TLR-Liganden analysiert. Gezeigt sind die Proteinbanden von HMGB1 nach H-1PV Infektion und Poly(I:C)- oder Zymosan-Stimulation, sowie die Banden der Ladekontrolle Aktin. Zu sehen ist eine verstärkte HMGB1-Expression nach H-1PV Infektion in den TLR-transfizierten Zellen.

5 DISKUSSION

Diese Dissertation konnte zeigen, dass H-1PV-infizierte Tumorzellen in der Lage sind, eine spezifische Immunantwort unter Beteiligung von Toll-like Rezeptoren zu induzieren und eine Vernichtung des Tumors herbeizuführen.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand hier der Einsatz von onkolytischen Viren. Onkolytische Viren benötigen gewisse Voraussetzungen für einen Therapieeinsatz. Dazu gehört eine Selektivität für transformierte Zellen, die dann möglichst ohne das gesunde Gewebe zu schädigen, zerstört werden. Eine genetische Stabilität sollte gegeben sein, so dass keine Integration in das Wirtsgenom erfolgt. Zudem muss eine Produktion unter GMP- (Good Manufacturing Practice) Bedingungen möglich sein [180].

Zu den Viren, die diese Eigenschaften mehrfach aufweisen gehört das autonome Parvovirus H-1. Es besitzt sowohl onkotrope als auch onkolytische Eigenschaften. Diese führen dazu, dass es in der Lage ist einen onkosuppressiven Effekt auszulösen, der bei unterschiedlichen Tumorarten greift [49, 50].

Weitere Mitglieder der Parvovirusfamilie (H-1PV, MVM, KRV, RPV-1, MPV-1) werden aufgrund ihrer tumorsupprimierenden Eigenschaften für eine Erweiterung der Krebstherapie in Betracht gezogen [11, 61, 181, 182]. MVM und H-1PV sind in der Lage die Bildung von spontanen, chemisch oder viral induzierten Tumoren in Versuchstieren zu hemmen. Zudem kann H-1PV Metastasen im Rattenmodell unterdrücken [61, 183]. Außer durch die Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen konnten Viren durch die Produktion von immunregulatorischen Molekülen die Tumortoleranz überschreiten und eine Immunantwort auslösen. Demnach wurde der onkolytische Effekt von H-1PV durch eine virus-verstärkte antitumorale Immunantwort unterstützt [176]. Zudem wurden diese Viren (z.B. MVM, H-1PV) bereits als Vektoren benutzt und der antitumorale Effekt konnte verstärkt werden, indem therapeutische Transgene (z.B. kostimulatorische Zytokine und Chemokine) eingebaut wurden. So konnte ein stärkerer Effekt erreicht werden als in den wildtyp Viren [57, 60]. Durch den Einbau von z.B. IL-2, MCP-3 oder IP-10 konnten zusätzliche Antitumoreigenschaften zum Einsatz kommen. Auf diese Weise hatte die Anwendung von Parvoviren zusätzlich zu ihren onkosuppressiven Eigenschaften eine immunmodulatorische Wirkung [19]. Auch für andere onkolytische Viren wie das HSV konnten immunstimulatorische Effekte gezeigt werden [184] und es wurden nicht nur Tumorzellen beseitigt sondern auch das Immunsystem aktiviert sowie antitumorgerichtete CTLs generiert, die den Tumor ebenfalls bekämpfen. Zudem wurde beobachtet, dass Tiere die eine Behandlung mit onkolytischen Viren bekamen, gegen eine erneute Tumorimplantation desgleichen Tumors immun waren [185].

Tabelle 15: Onkolytische Viren und deren Effektivität

| Onkolytische Viren | Effektivität |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| H-1PV | Direkte Zellyse durch virale Replikation (NS1) Zytopathischer Effekt Aktivierung der Immunantwort Transgene Expression (MCP-3, IL-2, IP-10) [17, 59, 174] |
| MVM | Zellyse durch virale Replikation (NS1) Zytopathischer Effekt Aktivierung der Immunantwort Transgene Expression (IL-2, MCP-3, IP-10) [17, 19, 186] |
| Adenovirus | Direkte Zellyse durch virale Replikation Antitumorale Immunität aktiviert (E1A) Direkte Zytotoxizität durch virale Proteine (E4ORF4) Transgene Expression (AdTK-RC) [187] |
| Herpes simplex Virus | Direkte Zellyse durch virale Replikation Antitumorale Immunität aktiviert Transgene Expression (rRp450) [187] |
| Vaccinia Virus | Direkte Zellyse durch virale Replikation Transgene Expression (GM-CSF) [65] |
| Reovirus | Zytopathischer Effekt Aktivierung der Immunantwort [188] |
| Newcastle disease Virus | Zytopathischer Effekt Aktivierung der Immunantwort [189] |

Raykov *et al.* gingen der Frage nach, ob durch den Einbau von immunstimulatorischen CpG-Motiven in das H-1PV-Genom dessen Wirkung verstärkt werden kann. Raykov *et al.* konnten zeigen, dass die Erhöhung der CpG-Motive in H-1PV den Antitumoreffekt steigerte. Die zusätzlichen CpG-Motive verstärkten die Wirkung der infizierten Tumorzellen die so als Vakzin dienen, eine Immunstimulation erzeugten, Metastasen unterdrückten und dies mit einem stärkeren Effekt als wildtyp Viren [190].

Die onkolytischen Eigenschaften von H-1PV wurden bereits in vielen verschiedenen humanen Tumorzellen belegt. Dazu zählen Melanome, Lymphome, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Brustkrebs, Hepatome und Glioblastome [43, 51, 174, 191-197].

H-1PV konnte auch in Gliomazellen, die eine Resistenz gegen Bestrahlung und Cisplatin entwickelt haben den Zelltod auslösen [198]. Dies ist von besonderem Interesse, da Hirntumore häufig resistent gegenüber konventionellen Therapien sind. Geletneky *et al.* berichteten, dass eine intratumoral oder multiple intravenöse H-1PV Verabreichung bei Ratten mit Gliomatumoren eine selektive Zytotoxizität in Tumorgewebe besaß, eine Tumoregression und ein signifikantverlängertes Überleben bewirkte. Normales Hirngewebe hingegen war offensichtlich resistent gegenüber dem zytolytischen Viruseffekt. Für eine Behandlung von Glioblastomen mit H-1PV sprach außerdem, dass H-1PV über die Blutbahn die Blut-Hirnschranke zu überschreiten vermag [175]. Kiprianova *et al.* konnten zeigen, dass auch eine intranasale H-1PV-Verabreichung in Ratten zu einer signifikanten Tumoregression führte und dies somit eine effiziente Methode darstellt, das Virus an seine Wirkstelle zu transportieren [199]. Auch in humanen Leukämie-Zellen (U937) und

verschiedenen Leberkarzinomen führte eine Infektion mit H-1PV zu Apoptose [41, 51].

Ein Vorteil beim Einsatz von Parvoviren ist, dass deren Erbgut nicht wie bei Herpes-, Polio- oder Adenoviren vor der Verabreichung genetisch manipuliert werden muss. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Parvoviren ihr Genom nicht in das Wirtserbgut einbauen und demnach keine unerwünschten Gene angeschaltet werden [175].

Die antineoplastische Wirkung von H-1PV besteht aus zwei unterschiedlichen Wirkweisen, dem direkten onkolytischen Effekt und den indirekten Immunreaktionen [17].

Die immunstimulierenden Aktivitäten der Parvoviren präsentieren sich unter anderem durch die H-1PV/TCL-induzierte Aktivierung von NK-Zellen, die adjuvante Wirkung von H-1PV auf autologe Tumorzellen-Vakzine und die Hochregulation Th1-basierter Immunantworten, die durch eine H-1PV Infektion bei Ratten und humanen PBMCs gezeigt wurde [200-202].

Demzufolge bietet das Parvovirus H-1 mit seinen Eigenschaften des Onkotropismus und der Onkosuppression in Verbindung mit Apathogenität für den menschlichen Organismus eine geeignete Möglichkeit zur Behandlung maligner Tumoren und besitzt demnach mehrere Kriterien für einen idealen onkolytischen Virus.

Das Parvovirus B19, auch ein ssDNA Virus, ist im Gegensatz zum Parvovirus H-1 ein human-pathogenes Virus. Es löst aber ebenso wie H-1PV über NS1 einen zytotoxischen Effekt aus, der in diesem Fall auf erythroide Zellen abzielt und hier Apoptose auslöst [203] und somit einen negativen Effekt auf den Organismus hat. Im Gegensatz dazu soll der Einsatz des H-1PV einen positiven Effekt durch Stimulation des Immunsystems und die Beseitigung von Tumorzellen erzielen.

Im Fokus meiner Untersuchungen stand die Beteiligung von TLRs an der Aktivierung von DCs nach einer H-1PV Infektion. Wenn durch PRRs Pathogene aufgespürt werden, können DCs diese einordnen, Informationen über dessen Herkunft geben und eine entsprechende gezielte Immunantwort auslösen. Diese Informationen sind wichtig, um eine autoreaktive Reaktion zu vermeiden.

Hierbei sind Rezeptoren wie z.B. die hoch konservierten TLRs von großer Bedeutung, die zu der am besten charakterisierten Gruppe von Muster-Erkennungsrezeptoren gehören [112]. Sie sind an der mikrobiellen Erkennung und der Induktion verschiedener Gene der Immunantwort beteiligt. Zudem schalten sie verschiedene Signalwege an, mit denen sie die Informationen der eindringenden Pathogene in die Zelle weiterleiten und beeinflussen die DC-Reifung und T-Zell-Differenzierung [112].

Werden TLRs aktiviert, führt dies zu einem Expressionsanstieg von kostimulatorischen Molekülen auf den DCs und bewirken so deren Reifung [112]. Da eine Antigenpräsentation

ohne kostimulatorische Moleküle zu einer Anergie führt, ist die TLR-vermittelte CD80/CD86-Aktivierung ein ausschlaggebender Schritt für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort [73]. Die von intrazellulären TLRs ausgelöste Th1-Antwort bewirkt eine Abwehr von intrazellulären Pathogenen und den von ihnen befallenen Zellen und kann dazu dienen körpereigene Krebszellen zu beseitigen [204]. Dies ist genau der erwünschte Effekt, der mit der Parvovirus H-1 Therapie erzielt werden soll.

Durch seine onkotropen und onkolytischen Eigenschaften kann die Immuntherapie mit Hilfe des Parvovirus H-1 erweitert werden, da es in der Lage ist DCs zu aktivieren und somit deren Wirkweise zu verstärken. Ziel war es nun die Beteiligung der Toll-like Rezeptoren an der DC-Aktivierung nach H-1PV Infektion genauer zu analysieren.

5.1 Einfluss der H-1PV Infektion auf Toll-like Rezeptoren

5.1.1 TLR-Transfektion

Um der Frage nachzugehen, welche TLRs an der Erkennung von H-1PV beteiligt sind, wurde ein System gewählt, indem die Analyse einzelner TLRs möglich war. Parvoviren scheinen für einen Einsatz in einer Umgebung mit endosomal lokalisierten TLRs besonders geeignet um dort als TLR-Ligand zu wirken [205].

Da HEK293 Zellen keine TLRs exprimieren [158] aber die Signalwegkomponenten besitzen, eignen sie sich besonders für eine Transfektion mit humanen TLRs. Nach Stimulation mit TLR-Liganden produzieren die transfizierten Zellen unter anderem IL-8 [206].

Da die TLR-Plasmide ein Antibiotikaresistenzgen besaßen, konnten die transfizierten Zellen selektioniert werden. In diesem Fall handelte es sich um eine Blastocidinresistenz, so dass durch die Gabe von Blastocidin nach der Transfektion nur die transformierten Zellen weiter proliferierten. Die stabile Transfektion der TLRs ermöglichte im Anschluss die Identifikation derjenigen TLRs, die für eine Weiterleitung des Erkennungssignals von H-1PV in das Zellinnere verantwortlich sind, nachdem sie mit dem Parvovirus H-1 infiziert wurden.

5.1.2 Zytotoxizität des H-1PV in TLR-transfizierten Zellen

Wie frühere Untersuchungen bereits zeigten, ist das Parvovirus H-1 in der Lage eine spezifische und gegen den Tumor gerichtete Immunantwort, sowie eine Tumorzelllyse auszulösen [26, 195]. Demnach bilden die autonomen Parvoviren einen neuen Ansatz zur Behandlung von Krebs. Allerdings variierte die Empfänglichkeit der Tumorzellen für H-1PV abhängig von der Herkunft des Tumors und der Proliferationskapazität der Zellen [54].

Ziel dieser Arbeit war es nun den genauen Mechanismus zu untersuchen. Zur Analyse der Beteiligung der TLRs an der H-1PV vermittelten Zelllyse wurde wie bereits beschrieben das Transfektionssystem mit TLR-transfizierten HEK293 Zellen verwendet. Eine Bestimmung der

Viabilitätsrate sollte nun Auskunft über den Einfluss der Infektion mit dem Parvovirus H-1 auf HEK293 Zellen geben.

Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl die wildtyp als auch die TLR-transfizierten HEK293 Zellen sensitiv gegenüber dem Parvovirus H-1 sind. Dies konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe für weitere Zelllinien (SK29-Mel, MZ7Mel, MKN45, HepG2) gezeigt werden [174, 194, 196]. HEK293 Zellen waren also sensitiv gegenüber einer Infektion mit dem Parvovirus H-1. Hristov *et al.* haben bereits gezeigt, dass HEK293 und HeLa Zellen nach H-1PV Infektion in Apoptose gehen. In HEK293 Zellen führte die Expression von NS1 zu einem temporären Anstieg der S-Phase-Fraktion und resultierte in einer Akkumulation der G2-Phase [207]. Geletneky *et al.* konnten in Gliomazellen (NCH-82 and NCH-89) mit einer MOI von 5 einen starken zytopathischen Effekt zeigen [198]. Zudem konnte in Brustkrebszellen eine deutlich verringerte Zellviabilität für eine MOI von 100 nachgewiesen werden [197].

5.1.3 TLR-Expression in transfizierten Zellen nach H-1PV Infektion

Die etablierte TLR-PCR wurde mit spezifischen Primern durchgeführt, um die Expression von TLR1-10 in HEK293 Zellen zu untersuchen. Der zu den endosomal lokalisierten zugehörige TLR3 ist in der Lage dsRNA zu erkennen [117]. Auch bei der Transkription von DNA Viren kommt dsRNA zustande [125].

Eine Induktion der antiviralen Immunantwort erfolgt über die Typ I IFN und Zytokin-Produktion. TLR3 trägt somit zur Unterbindung von Virusinfektionen bei, was eine Kopplung der Anfälligkeit für HSV-1 mit einer TLR3-Defizienz erklärt [184]. TLR3 ist zudem in der Lage nicht nur dsRNA innerhalb viraler Partikel zu erkennen, sondern auch in infizierten, apoptotischen Zelle nach deren Phagozytose [208].

Wie zu erwarten konnte in den wildtyp HEK293 Zellen keine Expression der einzelnen TLRs nachgewiesen werden. Ganz anders sah das Expressionsprofil der TLRs nach H-1PV Infektion der transfizierten HEK293 Zellen aus.

Die Untersuchungen mit Hilfe des TLR-Transfektionssystems konnten nachweisen, dass die H-1PV Infektion eine gesteigerte TLR3-Expression auslöst. In Lungenepithelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Influenza A-Virusinfektion die TLR3-Expression hochreguliert [209]. Auch nach einer Infektion mit dem Rhinovirus konnte eine gesteigerte TLR3-Expression nachgewiesen werden [210].

Zudem konnte eine erhöhte Expression von TLR9 nach einer H-1PV Infektion festgestellt werden. Hier ergaben die Ergebnisse der Untersuchungen demnach eine gesteigerte Expression von TLRs als Folge einer Infektion mit dem Parvovirus H-1.

Raykov *et al.* konnte für HEK Zellen die den murinen TLR9 stabil exprimierten eine TLR9-abhängige Immunaktivierung nach H-1PV Infektion beobachten [190]. Für ein weiteres

Mitglied der Parvovirinfamilie, das Kilham Rat Virus, konnte in BBDR Ratten bereits eine Aktivierung der Immunzellen unter TLR9-Beteiligung gezeigt werden [211]. Auch für andere Viren konnte eine TLR9-Aktivierung nachgewiesen werden. Unter anderem wird TLR9 von MCMV, HSV-1 und 2 sowie HPV und Adenoviren (AAV-1, -2, -9) *in vitro* aktiviert, die auch CpG-DNA Motive enthalten [134, 212-215]. Für TLR9 konnten Cerullo *et al.* zeigen, dass eine Defizienz die Immunantwort abschwächt und eine TLR9-Blockade die akute inflammatorische Antwort reduziert [216]. Auch für das Parvovirus B19 konnte in B19-NS1-transfizierten COS-7 Epithelialzellen eine gesteigerte TLR9-Expression beobachtet werden [217]. Eine Spezifität für den Liganden CpG-DNA konnte in TLR9-defizienten Mäusen gezeigt werden, da es hier nach CpG-Stimulation zu keiner Erkennung kam [134, 138], Makrophagen keine inflammatorischen Zytokine bildeten und auch DCs nicht ausreifen.

TLR9 ist demnach ein Sensor für eine DNA-Virus Infektion. Auch nach einer H-1PV Infektion konnte eine gesteigerte TLR9-Expression nachgewiesen werden. Eine Stimulation über TLR9 stellt somit eine geeignete Möglichkeit dar, um die Bandbreite für therapeutische Behandlungen zu erweitern.

Mithilfe von künstlichen Agonisten ist es möglich gezielt die Immunreaktionen gegen Krebszellen oder andere Krankheitserreger zu verstärken. Synthetische CpG-haltige Oligonukleotide sind bereits im Einsatz. Eine verstärkte Antigenpräsentation an T-Zellen konnte für die TLR-Liganden R848 (für TLR7 und 8) [218] und CpG (für TLR9) gezeigt werden.

Anhand der Experimente ließ sich zusammenfassend zeigen, dass in den mit humanen TLR-Expressionsplasmiden transfizierten HEK293 Zellen die Rezeptoren TLR3 und TLR9 eine zentrale Rolle bei der Erkennung von H-1PV haben und in der Lage waren eine angemessene Immunantwort auf diesen Stimulus hervorzurufen.

5.1.4 Induktion und Translokation von NF κ B nach der Infektion mit H-1PV

Eine Stimulation der TLRs mit ihren jeweiligen Liganden führt zu einer Aktivierung des Signaltransduktionsweges. Hier löst die TIR-Domäne hoch konservierte Signalingkaskaden aus [219]. Über intrazelluläre biochemische Abläufe werden so Informationen weitergeleitet. Die TLR-Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung und/oder Dimerisation was zu einer Rekrutierung wichtiger Adaptormolekülen führt [140]. Eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erfolgte durch Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen sowie Phosphorylierungen durch Proteinkinasen Dies löst die Expression verschiedener Gene (z.B IL-2, -6, -10, 12, IFN- γ und TNF- α) [152] die an der Immunantwort beteiligt sind aus. Abhängig vom Ligand werden von den TLRs unterschiedliche

Transkriptionsfaktoren induziert. Dementsprechend variiert auch die anschließende Genexpression.

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor ist der hochkonservierte Transkriptionsfaktor NF κ B [152], der eine erste Antwort bei der Einwanderung von Pathogenen auslöst und der Wirtsorgansimus so eindringende Pathogene abwehren kann. NF κ B reguliert die Transkription einer Reihe von Genen die an der Immun- und Entzündungsantwort beteiligt sind. Demnach handelt es sich um einen pleiotropen Transkriptionsfaktor [154].

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse, das eine H-1PV Infektion die TLR-Expression steigert, wurde der nach einer TLR-Aktivierung folgende virusinduzierte IKK-NF κ B-Signalweg untersucht. Dieser führt nach einer Virusinfektion unter anderem zur T-Zell Proliferation und Expression von Effektorzytokinen wie IL-2, IFN- γ , TNF- α [152] und aktiviert den apoptotischen Zelltod [220].

Der NF κ B-Signalweg kann in den klassischen und den alternativen Signalwege eingeteilt werden. Dies geschieht anhand der IKK Untereinheiten die aktiviert werden. Eine TLR-Stimulation führt genauso wie inflammatorische Zytokine, geotoxischer Stress und Antigene zu einer Aktivierung des klassischen Signalweges. Während des klassischen NF κ B-Signalwegs erfolgt hauptsächlich eine Aktivierung p65-haltige Dimere, dabei kommt das p65/p50 Dimer am häufigsten vor [157].

Die Untersuchungen der TLR-transfizierten Zellen hat ergeben, dass die H-1PV Infektion zu einer deutlichen Verschiebung des Transkriptionsfaktors NF κ B vom Zytoplasma in den Kern führte. Die Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern war hier ein Aktivierungsmerkmal für NF κ B. Somit konnte gezeigt werden, dass bei der Erkennung von H-1PV über TLRs, deren Aktivierung zu einer veränderten NF κ B-Expression führt.

Auch eine Vesicular Stomatitis Virusinfektion führte zu einer nuklearen Translokation von NF κ B, das als essentielle Komponente eine antivirale Immunantwort gegen infektiöse Pathogene auslöst [221]. Für einen Adenovirus-abgeleiteten Vektor (Ad.CFTR) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach einer Infektion von der Lungenkarzinomzelllinie A549 eine Translokation von NF κ B in den Zellkern erfolgte [222].

Im Gegensatz dazu blockiert A52R, ein Protein des Vaccinia Virus die über TLRs wie TLR3 ausgelöste NF κ B-Aktivierung und unterdrückt so eine Immunabwehr [223]. Auch das Poxvirusprotein N1L inhibiert den TLR-vermittelten NF κ B-Signalweg [224]. Dies ist in dem Fall der Parvovirus H-1 Infektion allerdings nicht erwünscht, da hier gezielt eine Immunabwehr eingeleitet werden soll.

Die Auswertung der Untersuchungen zeigte außerdem, dass eine H-1PV Infektion sowohl in

den TLR3- als auch in den TLR9-transfizierten Zellen in der Lage war, eine NFκB-Reportergenaktivierung hervorzurufen.

Die TLR3- und TLR9-transfizierten Zellen haben nach H-1PV Infektion eine erhöhte NFκB-Reportergenaktivität gezeigt. Dies deutet erneut auf einen TLR-vermittelten NFκB-Signalweg hin, der die Expression proinflammatorischer Zytokine bewirkt. So können T-Zellen aktiviert werden und die ausgelöste Th1-Antwort führt zu einer Beseitigung der Tumorzellen.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls eine TLR-abhängige NFκB Aktivierung nach Stimulation beobachtet werden, dazu zählt das HCV, das NFκB unter anderem durch sein NS3 Protein über TLRs aktiviert [225].

Viele Viren hingegen unterbrechen die Immunantwort durch multifunktionale virale Proteine, die den NFκB-Signalweg blockieren [226]. Ein Beispiel für die Inhibition von NFκB ist das West Nil Protein NS1, das den TLR3-Signalweg, indem es die Translokation von RELA und IRF3 verhindert, blockiert und so die IL-6 und IFN-β-Produktion unterdrückt [227].

Die gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktor NFκB, sowie dessen Translokation in den Zellkern ließ den Schluss zu, dass sowohl TLR3 als auch TLR9 durch die Erkennung von H-1PV aktiviert wurden und die entsprechende Signalkaskade ausgelöst wurde. Demnach induzieren H-1PV-infizierte HEK-Transfektanten NFκB via TLR3 und TLR9.

5.1.5 IκB-Expression nach H-1PV Infektion

Durch die Aktivierung kommt es zur Freisetzung von NFκB, das in seiner aktiven Form in der Lage ist in den Zellkern zu wandern. Das hierbei ebenfalls freigesetzte IκB wird proteolytisch abgebaut [179]. Wird IκBα abgebaut führt dies zu einer Demaskierung des Kernlokalisationssignals von NFκB so dass dessen Translokation in den Kern möglich ist [155].

Wurden die Zellen dem Parvovirus H-1 als Stimulus ausgesetzt bewirkte dies, dass IκB nach einem gewissen Zeitraum nicht mehr nachweisbar war.

So konnte gezeigt werden, dass es nach einer H-1PV Infektion sowohl in den TLR3- als auch in den TLR9-transfizierten Zellen zu einer verringerten Expression von IκB kommt.

Somit war auch anhand der Untersuchungen der IκB-Expression eine Aussage über die NFκB-Aktivierung möglich. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es nach einer H-1PV Infektion zu einer NFκB-Aktivierung kam. Dies führte zu einer Auflösung des NFκB/IκB-Komplexes, bei der sowohl NFκB als auch IκB freigesetzt wurde. Die IκB-Expression ging hier aufgrund des proteolytischen Abbaus zurück. Auch nach einer Adenovirus-Infektion wurde eine Degradation von IκBα beobachtet [228]. Ebenso führt eine Infektion mit dem Vesicular Stomatitis Virus zur IκBα-Degradation [221].

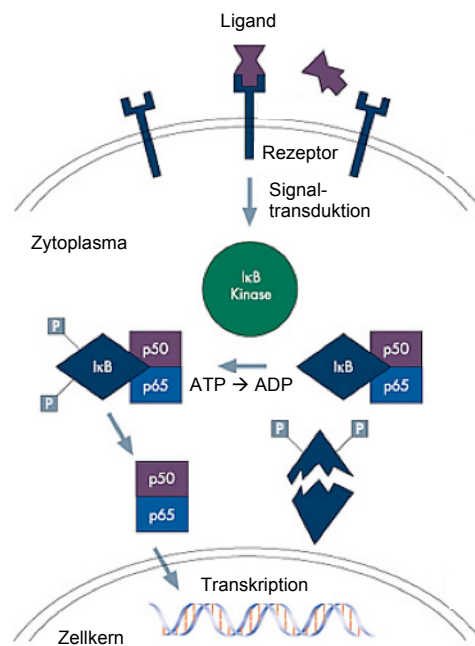


Abbildung 55: IκB
(verändert nach: „Analysis of protein interactions between components of the NF-κB signaling pathway using the LiquiChip system“)

5.1.6 Gesteigerte HMGB1-Expression nach H-1PV Infektion

Weitere Untersuchungen wurden bezüglich der HMGB1-Expression nach H-1PV Infektion durchgeführt. HMGB1 ist ein ubiquitäres chromatin-bindendes Protein, das im Kern nahezu aller eukaryotischen Zellen vorkommt [145].

Die von HMGB1 ausgelösten Signalwege sind noch nicht vollständig geklärt, aber es konnte gezeigt werden, dass HMGB1 im endosomalen Raum mit TLR9 interagiert. Bei einer Infektion mit CpG-haltiger pathogener DNA wird diese von HMGB1 gebunden. Dieser Komplex aktiviert DCs dahingehend mehr IFN-α zu sezernieren als ohne die Anwesenheit von HMGB1 [149].

HMGB1 gehört zu den DAMPS (damage associated molecular patterns), den *damage*-assoziierten molekularen Mustern und stellt somit ein Warnsignal dar, das eine bestimmte Wirkung auf die das Immunsystem ausübt [145]. HMGB1 ist ein DNA-bindendes Molekül und in der Lage die Transkription sowie weitere nukleare Funktionen zu regulieren [150].

Es kann aktiv von inflammatorischen Zellen als Warnsignal abgegeben werden. Eine passive Ausschüttung erfolgt als aus nekrotischen Zellen [147]. Demnach kann die Freisetzung von HMGB1 eine Immunantwort gegen nekrotische Zellen auslösen. Es konnte gezeigt werden, dass HMGB1 durch Bindung an TLR4 auf DCs die Tumorantigenpräsentation kontrollieren kann. Bei der HMGB1-Abgabe durch inflammatorische oder nekrotische/apoptotische Zellen, wirkt es demnach als endogener TLR-Agonist [229]. In RAW264.7 Zellen konnte eine

HMGB1 Abgabe nach Stimulation mit dem TLR3 Liganden Poly(I:C) beobachtet werden [230].

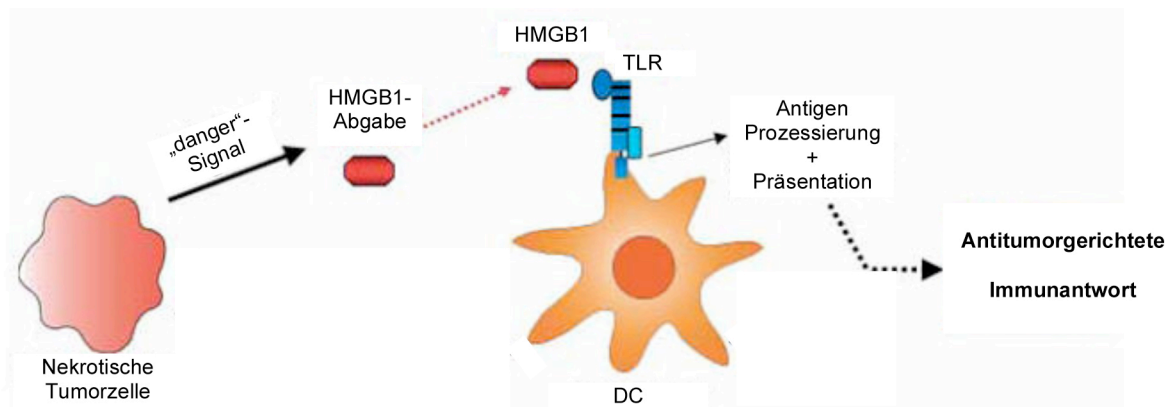


Abbildung 56: HMGB1-Signalgebung
(verändert nach: http://1.bp.blogspot.com/_QjnhWpqrSpq)

Auch die TLR-transfizierten HEK293 Zellen zeigten nach H-1PV Infektion eine gesteigerte HMGB1-Expression. Dies konnte auch nach einer HCV-Infektion gezeigt werden, da auch hier eine Abgabe von HMGB1 in den extrazellulären Raum beobachtet wurde. Das sezernierte HMGB1 kann nun eine antivirale Antwort auslösen [231]. Auch eine Vaccinia Virus-induzierte Zellyse war in der Lage eine HMGB1-Abgabe auszulösen (in Ovarialkarzinomzellen) [232]. Zudem konnte für Jurkat, HeLa, Panc-1 und U937 Zellen eine Sekretion von HMGB1 beobachtet werden, nachdem sie mit apoptoseauslösenden Agenzien behandelt wurden [233]. Eine HMGB1-Abgabe wurde auch in Jurkat Zellen nach Auslösung von Nekrose beobachtet [234]. Zudem konnte nach einer Infektion mit dem Adenovirus Typ 5 in Makrophagen eine HMGB1 Abgabe beobachtet werden [235]. Curtin *et al.* konnten bereits zeigen, dass in Mäusen mit Glioblastomen, die mit zwei verschiedenen Adenovirusvektoren (Ad-TK+Ad-Flt3L) sowie Ganciclovir behandelt wurden, eine HMGB1-Abgabe der Tumorzellen induziert werden konnte. Dies aktivierte den TLR2-Signalweg in den tumorinfiltrierenden DCs und löste so eine antitumorale Immunantwort aus. Die HMGB1-Abgabe von nekrotischen/apoptotischen Tumorzellen kann demnach die immunologische Antwort auf diese Zellen verstärken und so die Ergebnisse einer Anti-Krebs-Therapie beeinflussen [236]. Auch nach Infektion mit H-1PV konnte eine HMGB1-Abgabe beobachtet werden. Demnach bietet auch dies eine Möglichkeit die antitumorale Immunantwort zu verstärken.

5.2 Einfluss der H-1PV Infektion nach Kokulturversuchen mit Dendritischen Zellen

5.2.1 Gesteigerte Expression des Oberflächenmarkers CD86 auf DCs nach Stimulation mit TLR-Liganden

Die Analyse von Oberflächenproteinen auf dendritischen Zellen lässt Rückschlüsse über deren Reifungsgrad zu (siehe Tabelle 4). Zu diesen Oberflächenproteinen gehört CD86, dessen erhöhte Expression ein Indikator für die DC-Ausreifung ist was durch uns bereits gezeigt werden konnte [174]. Eine Aktivierung der TLRs und deren gesteigerte Expression führt zu einer ebenfalls gesteigerten Anzahl an Aktivierungsmarkern auf den dendritischen Zellen. Dies ist notwendig um naive virusspezifische T-Zellen zu aktivieren. Der TLR-Signalweg verstärkt zudem die Cross-Präsentation durch DCs und löst so eine antivirale zytotoxische Antwort aus, die durch CD8⁺Zellen vermittelt wird [208]. Dies sollte nach einer H-1PV Infektion genauer analysiert werden.

Schierer *et al.* zeigten bereits, dass Adenoviren die melanomgerichtet sind, nicht toxisch auf moDCs wirken und auch deren Reifung nicht beeinflussten [237]. Auch für das Newcastle Disease Virus ist bekannt, das seine gegen den Tumor gerichteten Eigenschaften nicht nur aus einer Zerstörung der Tumorzelle sondern auch aus einer Wirkung auf das Immunsystem besteht [189].

Viren (z.B. Masernviren) sind allerdings auch in der Lage DCs zu infizieren und so eine Blockade der Immunantwort oder den Zelltod der DCs auszulösen [238]. Ein Beispiel für den Einfluss auf die Expression kostimulatorischer Moleküle ist das Vaccinia Virus, da es die Expression verhindert und es so zu keiner DC-Ausreifung kommt [239]. Für H-1PV hingegen konnte gezeigt werden, dass DCs nicht negativ beeinflusst werden und die Reifung nicht blockiert wird [174]. Cervantes-Barragan *et al.* haben für den basierend auf einem murinen Coronavirus-Vaccinevektor gezeigt, dass er die Belieferung von verschiedenen Antigenen und immunstimulatorischen Zytokinen an professionelle APCs *in vitro* und *in vivo* fördert. Diese Vektoren zielten auf DCs ab und führten zu einer vektorvermittelten Antigenexpression und Reifung der DCs. Ebenso wurde eine lang andauernde CTL Antwort, die eine schützende antivirale und antitumorgerichtete Immunität auslöst, generiert [240].

Auch nach einer Reovirusinfektion von Tumorzellen wurde eine inflammatorische Antwort ausgelöst, die zu einer Aktivierung dendritischer Zellen führte [241].

Die hier durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, inwieweit dendritische Zellen durch die Stimulation mit TLR-Liganden zur Ausreifung gebracht werden können und dementsprechend die Expression der kostimulatorischen Moleküle erhöht werden konnte.

Die Expressionsanalysen ergaben, dass eine Stimulation mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C) zu einer erhöhten CD86-Expression auf iDCs und mDCs führt. Für Poly(I:C) konnte bereits

gezeigt werden, dass es nach einer Stimulation von DCs zu einer Hochregulation von Reifungsmarkern wie CD80, 83 und 86 kam [242]. Außerdem wurde für humane moDCs, die TLR9 exprimieren bereits gezeigt, dass nach Stimulation mit CpG-A ODN19 ihre Reifung (Hochregulation von z.B. CD83, CD86) erzielt werden kann [243]. Auch die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten eine erhöhte CD86-Expression nach Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG und konnten demnach die Ergebnisse belegen.

Zudem konnte für eine Stimulation mit TLR8-Liganden bereits eine verstärkte Expression von CD80 im Vergleich zu ohne TLR Agonisten gereiften DCs beobachtet werden [244].

Weiterhin konnte belegt werden, dass unreife DCs nach Zugabe von TCL H-1PV-infizierter SK29Mel Zellen eine deutlich verstärkte CD86-Expression vorweisen. Die Inkubation mit unbehandelten SK29Mel Zellen, verstärkt die CD86-Expression hingegen nicht.

Auch für eine Kokultur von hPBMCs mit H-1PV-infizierten PDAC Zellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Stimulation und einem Effekt der Zellen auf den Tumor kommt. Da keine weiteren Viren von den PDACs produziert werden, kommt es wahrscheinlich durch die Abgabe von PBMC-aktivierenden-zellulären Faktoren durch diese Zellen zu einer Wirkung. Das H-1PV-infizierte Tumorzellen Faktoren abgeben, die eine DC-vermittelte Cross-Präsentation von TAA vermitteln, konnte auch in früheren Publikationen gezeigt werden [201].

5.2.2 Gesteigerte TLR-Expression in DCs nach der Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel

Anhand der Untersuchungen der TLR-transfizierten HEK293 Zellen, wurde eine TLR3 und TLR9-vermittelte NFκB-Aktivierung nach H-1PV Infektion gezeigt. Dies galt es nun in einem geeigneten System darzustellen, das der humanen Immunantwort nahe kommt. Das Transfektionssystem der HEK293 Zellen konnte Auskunft über die Aktivierung einzelner TLRs geben, stellt aber ein künstlich geschaffenes System dar.

Die Verwendung des humanen Melanommodells entsprach der *in vivo* Situation viel eher und ermöglichte eine Untersuchung der TLRs in Zellen des Immunsystems. In diesem System konnte die veränderte TLR-Expression der DCs nach einer Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen analysiert werden.

Insbesondere konnte der Frage nachgegangen werden, ob die TLR-Signalgebung und die NFκB-Aktivierung an diesem Mechanismus beteiligt ist. Hierbei stand die Analyse der Beteiligung von TLRs bei der DC-Aktivierung nach Stimulation mit TCLs besonders im Vordergrund.

Zunächst wurde die veränderte TLR-Expression in humanen DCs nach der Stimulation mit den jeweiligen TLR-Liganden gezeigt werden. Hier konnte mit Hilfe von Inhibitionsversuchen

eine TLR-Aktivierung belegt werden. Denn die Interaktion von TLR9 mit CpG-DNA geschieht in den Endosomen bei einem pH-Wert von 6,5-5,0 [245]. Wenn CpG-ODNs die Zelle erreichen, wandert TLR9 vom ER in die das CpG-enhaltende Endosomen [246]. Dort wird TLR9 in seinen funktionalen Rezeptor proteolytisch gespalten und der TLR9-Signalweg ausgelöst [139]. Der verwendete Inhibitor Chloroquine inhibiert die endosomalen Azidifizierung und hemmt die Immuneffekte die durch CpG-ODNs bzw. TLR-Liganden ausgelöst werden. Dies zeigt die wichtige Rolle des Kompartimentes bei der Interaktion mit TLRs sowie deren nachfolgenden Signalwege [245, 246]. Die Untersuchungen zeigten nach Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG eine erhöhte TLR9-Expression in DCs. Auch die TLR3-Expression war nach Stimulation mit dem TLR-Liganden Poly(I:C) gering erhöht. Wird der TLR-Signalweg in mDCs aktiviert, erfolgt die NK und/oder CTL-Aktivierung. Um antigenspezifische CTLs zu aktivieren muss in DCs ein Cross-Priming induziert werden, das durch TLRs ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu werden Tregs durch IL-6, das von DCs auf eine TLR-Aktivierung hin produziert wird, unterdrückt [247]. Dies sind die gewünschten Effekte die eine Behandlung mit dem Parvovirus H-1 bewirken soll.

Mit Hilfe von Kokulturversuchen konnte die Interaktion von H-1PV-infizierten Tumorzelllysaten und den TLRs der dendritischen Zellen in einem natürlichen Zusammenhang analysiert werden.

Die Analysen ergaben eine deutlich gesteigerte TLR3-Expression in dendritischen Zellen nach einer Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen. Dabei gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Kokultur mit unbehandelten und infizierten SK29Mel Zellen und deren Kokultur mit den DCs.

Die TLR3-Expression steigt in humanen moDCs während ihrer Reifung von Monozyt zu moDC an [248]. DCs, die eine hohe phagozytische Aktivität für apoptotische und virusinfizierte Zellen aufweisen besitzen eine hohe TLR3-Expression [249]. TLR3-stimulierte DCs konnten Antigene virusinfizierter Zellen cross-präsentieren und so virusspezifische T-Zellen induzieren [208]. Schulz *et al.* konnten zeigen, dass murine DCs nachdem sie Kontakt mit EMCV oder SFV-OVA virus-infizierten Zellen hatten und dsRNA über TLR3 erkannt haben, aktiviert wurden. Eine Immunisierung mit virusinfizierten Zellen oder Zellen mit synthetischer dsRNA führte zu einem TLR3-expressionsabhängig gesteigerten CTL-Cross-Priming gegen zellassoziierte Antigen. Demnach ist TLR3 an dem Cross-Priming von CTLs gegen Viren beteiligt, die DCs nicht direkt infizieren [208].

Für den Poxvirus MVA konnte gezeigt werden, dass er TLR3 in unreifen humanen Monozyten-abgeleiteten DCs induziert [250]. Eine TLR3-Defizienz im Menschen ist mit einer Anfälligkeit für HSV-1 verbunden [251].

Ein Wirkstoff, IPH-3102, der als dsRNA ein TLR3-Ligand ist, konnte über die Aktivierung von

NF κ B und Typ1 IFN Produktion eine antivirale Immunantwort auslösen und so Krebszellen zerstören [252].

Hier führte die Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen sowohl bei iDCs als auch bei mDCs zu einer deutlich erhöhten Expression des TLR9. Somit hat auch in diesem Fall eine Kokultur mit H-1PV-induzierten TCL eine verstärkte TLR-Expression ausgelöst. Somit kann über die gezielte Aktivierung von DCs mit TLR Liganden deren Fähigkeit virusspezifische T-Zellen zu aktivieren gesteigert werden [215].

Eine TLR-Aktivierung nach einer Vaccinia Infektion resultierte in einer DC-Reifung, einer T-Zell-Aktivierung und DCs waren dann in der Lage Cross-Präsentation auszulösen [253]. Auch für HD-Ad Vektoren wurde gezeigt, dass sie die TLR9-Expression hochregulieren [216]. Mit einem Herpes Simplex Virus der dahingehend verändert wurde, dass er GM-CSF sezerniert zeigten Untersuchung nach intratumoraler Injektion in Melanomen eine Tumorzelllyse. Durch die GM-CSF Abgabe konnte die DC Funktion verstärkt werden und eine Immunantwort gegen Krebsantigene ausgelöst werden [254].

Imiquimod gehört zu einer der ersten Medikamente die TLRs als Zielstruktur nutzen. Über TLR7 induziert es die IFN- γ Produktion und verursacht so eine antivirale und antitumorale Wirkung, zudem wird die IL-6 und TNF-Produktion aktiviert [255].

CpG-basierte Oligonukleotide sind als sogenannte IMOs (immunmodulatorische Oligonukleotide) zur TLR9-Stimulation im Einsatz. Für IMO-2055 konnte bereits in Mausmodellen eine Antikrebs-Aktivität, die durch die Kombination mit Chemotherapeutika verstärkt werden kann, nachgewiesen [256]. Eine Phase-I-Studie hat gezeigt, dass die Kombination mit Gemcitabin oder Irinotecan eine effizientere Wirkung erzielt.

Auch die Gabe des TLR9-Liganden CpG7909 in Kombination mit einer Peptid-MART-1-Vakzinierung in Patienten mit HLA2+ Melanomen führt zu einer 10-fach gesteigerten Anzahl an antigenspezifischen CD8+T-Zellen [257]. Der TLR7/TLR8-Ligand Resiquimod (R484) induziert IFN- α , IL-12 und TNF- α und wird für die Behandlung von Hepatitis-C und andere virale Erkrankungen eingesetzt [255].

Wie die beschriebenen Ergebnisse zeigten, stellen die TLR-zielgerichteten Therapieoptionen eine ideale Möglichkeit zur Erweiterung der Krebsbehandlung dar.

Anhand der Analysen konnte die These bestätigt werden, dass die stimulatorische Eigenschaft von H-1PV-induzierten TCL auf DCs über den TLR-Signalweg stattfindet. Dies geschah über den Nachweis, dass einzelne TLRs nach einer Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel hochreguliert wurden.

Die Erkennung von H-1PV und/oder dessen TCL durch TLR3 bzw. TLR9 induzierte eine Reifung dendritischer Zellen. Die anschließende Präsentation viraler Antigen auf MHC I-Molekülen, das sogenannte Cross-Priming, kann dann eine CD8⁺T-Zellantwort stimulieren

und durch die Zytokinausschüttung von infizierten Zellen gefördert werden. Dies ist das Therapieziel und soll die Tumorbekämpfung vorantreiben.

Die bisher diskutierten Ergebnisse führten zum Schluss, dass die H-1PV-Detektion über Mitglieder der TLR-Familie auch veränderte Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors NFκB in TLR-transfizierten HEK293 Zellen induziert. Um dies in einem System, das der *in vivo* Situation viel eher entspricht zu belegen, wurden in unserem humanen Melanommodell unterschiedlich inkubierte DCs auf ihre NFκB-Expression hin getestet. Nach der Kokultur mit H-1PV indizierten Tumorzelllysaten konnte in DCs eine erhöhte NFκB-Expression festgestellt werden. Dies hat eine Induktion proinflammatorischer Gene wie TNF-α, IL-2, IFN-γ zur Folge was zu einer Aktivierung von T-Zellen führt und eine Th1 Antwort auslöst, die dann für eine Beseitigung der Tumorzellen verantwortlich ist [152].

Zu den NFκB aktivierenden Stimuli gehören außerdem CMV, HSV-1, HHV 6 und das Adenovirus [258]. TLR9 und TLR2 sind in der Lage das Adenovirus zu erkennen, was zu einer Aktivierung der NFκB-Signalkaskade führt, die in einer IFN Typ I Produktion resultiert, eine antivirale Antwort induziert [228] und so eine gute Option zur Erweiterung der Gentherapie oder als Vaccinvektor darstellt.

Das adenovirale Protein E3 14.7K hingegen inhibiert die antivirale Immunantwort durch eine Blockade von NFκB nach TLR-Aktivierung [259]. Auch N1L, ein Protein des Poxvirus konnte den TLR-Signalweg über NFκB blockieren [224].

Hier konnte gezeigt werden, dass H-1PV-infizierte SK29Mel Zellen nach Kokultur mit DCs NFκB via TLR3 und TLR9 induzierten und so in der Lage sind eine Immunantwort auszulösen, die zur Beseitigung der Tumorzellen führt.

5.2.3 H-1PV-infizierte SK29Mel Zellen induzieren Produktion proinflammatorischer Zytokine in DCs

Da nicht nur die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, sondern auch die anschließende Transkription verschiedener Zytokine eine Aussage über die aktivierte Immunantwort machen, wurde in diesem Fall die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF-α bestimmt.

Der Aktivierung von TLRs folgt eine Signalkaskade die in einer NFκB-Translokation resultiert und eine proinflammatorische Antwort zur Folge hat. Der TLR3-Signalweg führt unter anderem zu einer Aktivierung von NFκB und einer anschließenden Zytokin- und Chemokinexpression, zu der TNF-α, IL-6, IL-12 gehört [260]. Auch eine TLR9-Aktivierung

fürte zu einer Aktivierung von NF κ B und resultierte dann in einer Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α [261].

H-1PV-induzierte TCL waren in der Lage die Abgabe von TNF- α von DCs nach einer Kokultur zu verstärken. Die Kokultur von DCs mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen bewirkte demnach eine Induktion proinflammatorischer Gene.

Eine Aktivierung des Immunsystems durch DCs wird unter anderem durch die Präsentation von phagozytierten Tumorantigenen an T-Zellen erreicht. Außerdem führt die H-1PV Infektion zur Produktion bestimmter Zytokine, die durch die Aktivierung verschiedener Immunzellen Wirkung auf Tumorzellen zeigen [174].

Die Untersuchungen von Kariko *et al.* zeigten bereits eine TLR3 Aktivierung und anschließende TNF- α -Expression in humanen DCs nach Kontakt mit mRNA die von nekrotischen Zellen abgegeben wurde [262]. Auch Hayashi *et al.* konnten eine, über TLR5 ausgelöste, Aktivierung von NF κ B mit anschließender TNF- α -Produktion zeigen [263].

Zudem induzierten die TLR7-Agonisten Imiquimod und Resiquimod eine NF κ B-Aktivierung mit folgender Produktion von TNF- α [255] und lösten so eine antivirale und antitumorale Immunantwort aus. Erkennt ein TLR dsRNA des Lang Reovirus und Poly(I:C) resultierte dies ebenfalls in einer Induktion verschiedener Zytokine wie z.B TNF- α [260]. Eine Induktion der Immunantwort über eine NF κ B-Aktivierung kam auch durch die Erkennung von Glykoproteinen des CMV über TLR2 zustande und führte zur Produktion proinflammatorischer Zytokine [264].

In früheren Untersuchungen konnten dsDNA Viren wie MCMV, HSV und Baculovirus [134, 212] als Auslöser für eine TLR9-induzierte inflammatorische Zytokinproduktion gezeigt werden. Für die Makrophagenzelllinie RAW264.7 wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit Poly(I:C) eine TNF-Produktion induziert [265].

Auch Delhem *et al.* konnten zeigen, dass eine H-1PV Infektionen keine immunsuppressiven Nebeneffekte verursacht, sondern NK-Zellen und CD8⁺T-Lymphozyten nur gering beeinflusst wurden und eine H-1PV Infektion auf humane Neutrophile keine Auswirkungen hat. CD4⁺T-Zellen verändern sich nach einer H-1PV Infektion nicht negativ, vielmehr konnte eine Aktivierung von CD4⁺T-Lymphozyten nachgewiesen werden, was u.a. durch eine erhöhte Sekretion von Th1 und Th2 Zytokinen (IL-2, IFN- γ , IL-4) gezeigt wurde. Die Aktivierung dieser Zellen fördert so den onkosuppressiven Effekt von H-1PV [266].

Hier waren H-1PV-induzierte TCL in der Lage die TNF- α Produktion von DCs nach einer Kokultur zu verstärken. Diese Feststellung zeigte, dass eine Infektion mit H-1PV in der Lage war, ein zusätzliches aktivierendes Signal auf bereits reife DCs zu geben und so eine verbesserte Antigenpräsentation sowie eine effizientere Stimulation der T-Zell-Antwort zu veranlassen.

5.3 H-1PV als therapeutischer Ansatz in der Tumormedizin

Der Einsatz von onkolytischen Viren die selektiv in Tumorzellen replizieren, bietet neuen Therapiemöglichkeiten. Eine Reihe von onkolytischen Viren wurde bereits in der letzten Dekade in klinischen Studien getestet. Das Prinzip der Therapie besteht darin, dass die Viren die Krebszellen im Verlauf ihrer Replikation abtöten. Dabei ist von großer Bedeutung, dass das umgebende Gewebe nicht beschädigt wird.

Ein Vorteil beim Einsatz onkolytischer Viren ist im Gegensatz zu niedermolekularen Wirkstoffen (small molecules), dass sie zusätzlich replizieren und therapeutische Antitumorgene tragen kann. Zudem besitzen onkolytischen Viren die Fähigkeit zwischen tumorartigen und gesunden Zellen zu unterscheiden. Abhängig vom Tumorzelltyp variiert die Ansprechbarkeit auf den Virus [54]. Sie können Zellen infizieren, in ihnen replizieren, Apoptose auslösen, virale Partikel freisetzen und sich so weiter im Tumor ausbreiten.

Demnach könnten folgende Mechanismen bei der Zerstörung von Tumoren *in vivo* bedeutsam sein.

1. Zellyse durch virale Replikationsvorgänge [203]
2. Induktion proinflammatorischer Zytokine mit Aktivierung von T-Zell vermittelten Immunantworten [194]
3. Überwinden von Apoptoseresistenzen (Chemo-, Radiotherapie) [193, 198]

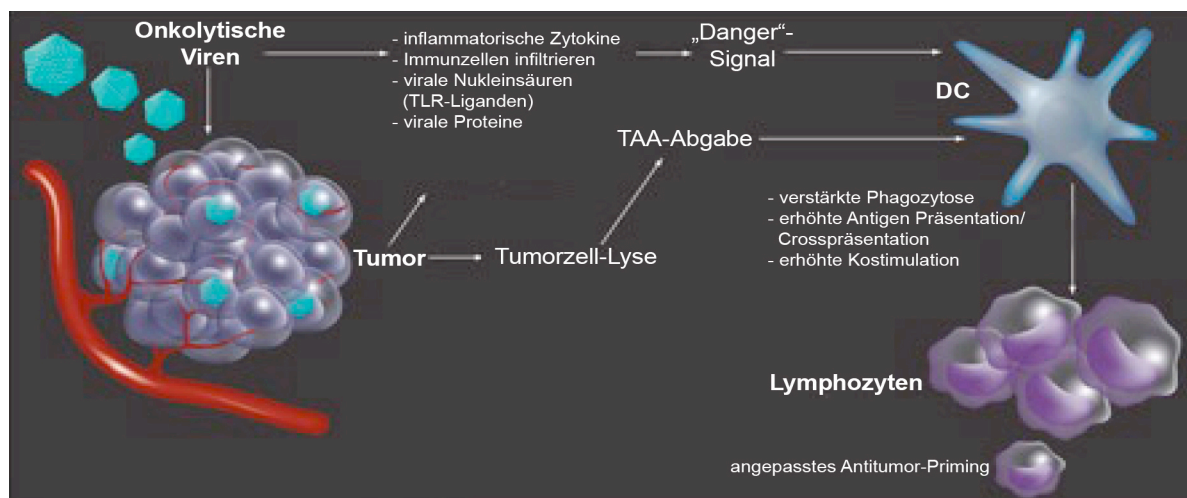


Abbildung 57: Onkolytische Viren und deren Wirkung auf Tumorzellen

Gezeigt sind mögliche Ansatzpunkte für die Wirkung von onkolytischen Viren auf Tumorzellen, sowie die von ihnen ausgelöste antitumor-gerichtete Immunantwort. Verändert nach: [267].

Die Generierung einer antitumoralen Immunantwort kann durch eine Infektion von Tumoren mit *in vivo* wirkenden onkolytischen Viren die als humane apathogene Organismen tumorreaktive T-Zellen aktivieren, ausgelöst werden. Für diese Form der Therapie stellt das Parvovirus H-1 einen geeigneten Kandidaten dar. Zum einen werden infizierte Zellen verstärkt phagozytiert. Zum anderen kommen die durch die Viruslyse entstandenen Tumorzelllysate in

Kontakt mit DCs und durch Cross-Präsentation werden CTLs aktiviert, die den Tumor beseitigen können (siehe Abb. 57) [267].

Untersuchungen der letzten 20 Jahre mit onkolytischen Viren wie Adenoviren, Herpes- und Vacciniaviren sowie Reoviren, Newcastle Disease Viren, Masernviren und Vesicular Stomatitis Viren [17] bieten zusätzliche Möglichkeiten in der Behandlung von Krebs. Für Adenoviren konnte gezeigt werden, dass sie auch nach Infektion mit hohem Titer keinen toxischen Einfluss auf iDCs haben und deren Reifung nicht inhibieren [237]. Andere Viren hingegen (Masern-, Vaccinia und HSV-1-Viren) induzierten in DCs Apoptose [268].

Das Parvovirus H-1 stellt ein geeignetes Virus zu Therapiezwecken dar, da sie keinen negativen Einfluss auf DCs haben, sondern sie über H-1PV-infizierte Tumorzelllysate aktivieren.

Die letzten Jahre zeigten eine deutliche Steigerung in der Entwicklung von klinischen und präklinischen Therapien in denen onkolytische Viren zur Bekämpfung von Krebs eingesetzt werden [269]. Mithilfe onkolytischer Viren kann das Ziel verfolgt werden, die Krebstherapie zu erweitern, indem z.B. der Tumorzelltod gefördert und die antitumorgerichtete Immunantwort aktiviert und verstärkt wird.

Ein weiterer Therapieansatz zum tumorselektiven Zelltod besteht in der Gabe von speziellen Virusproteinen [40]. Für E4orf4 aus Adenoviren, sowie für das Parvovirusprotein NS1 und Apoptin aus dem Chicken Anemia Virus konnte beobachtet werden, dass eine Überexpression dieser Proteine zytotoxisch auf Tumorzellen wirken, normale Zellen aber nicht beeinträchtigt werden [270]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine H-1PV Infektion einen Vakzinierungseffekt auslöst. Infizierte Tiere konnten vor chemisch induzierten Tumoren und vor einem Tumorwachstum nach Implantation transformierte Zellen geschützt werden [20].

Auch für B-Zell NHL (Non-Hodgkin-Lymphome) konnte gezeigt werden, dass sie auf eine H-1PV Infektion ansprechen indem Nekrose ausgelöst wurde. Dies gilt auch für NHL mit einer Rituximabresistenz [193]. Außerdem ermöglichen die Mechanismen der Tumorzelllyse durch das Parvovirus H-1 die Resistenz von Tumorzellen gegenüber herkömmlicher Zelltod-Induktoren zu umgehen [43, 193].

Auch Untersuchungen mit Brustkrebszellen wurden im Gegensatz zu normalen Zellen durch H-1PV-induzierte zytopathische Effekte zerstört [197]. Ebenso stellt die onkolytische Therapie für die Behandlung von Neuroblastomen eine vielversprechende Möglichkeit dar. In Neuroblastomzellen löst die H-1PV-Infektion einen G2-Arrest aus und Apoptose wird induziert. Durch die geringe Toxizität des Virus auf nichttransformierte Zellen, die schnelle

Replikation und die lytischen Effekte auf Neuroblastomzellen sind so neue Möglichkeiten der Therapieform gegeben [271].

Dinsart *et al.* konnten zeigen, dass SMAD4 als intakter Transkriptionsfaktor für eine optimale Aktivität des viralen Promotors P4 benötigt wird. SMAD4 ist ein essentieller Bestandteil des parvoviralen Viruszyklus und könnte helfen, Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom (PDAC) für eine effiziente parvovirusbasierte Therapie zu selektionieren [272].

THERAPIE-KOMBINATIONEN

Im Bezug auf die Kombination der onkolytischen Therapie mit Standardtherapien wie Bestrahlung und Chemotherapie muss beachtet werden, dass diese Therapien auch Einfluss auf den Virus haben können, indem sie z.B. dessen Replikation hemmen. Demnach müssen hier genaue Untersuchungen vorgenommen werden.

Durch die Kombination mit Chemotherapeutika kann eine verbesserte Immunantwort ausgelöst werden. Hierbei werden unter anderem von den durch die Chemotherapeutika und H-1PV lysierten Tumorzellen Antigene freigesetzt. Diese tumorspezifischen Antigene können von TLR erkannt werden und lösen so eine weitere Immunantwort aus. Dazu zählt die DC-Aktivierung, zudem werden die durch die Chemotherapie unterdrückte Tregs weiter gehemmt. Außerdem führte die Kombination von Chemotherapeutika (Cisplatin, Vincristine) und dem H-1PV durch eine verstärkte DC-Reifung, die Produktion proinflammatorischer Zytokine und einer Aktivierung von CTLs zu einer verbesserten Immunstimulation und Beseitigung von Tumorzellen [194].

Ein weiteres Beispiel dieser Therapiemöglichkeit besteht in der Kombination von H-1PV und Gemcitabin. Angelova *et al.* konnten zeigen, dass die Gemcitabinwirkung bei der Behandlung von Pankreaskarzinomen durch die Kombination mit H-1PV verstärkt wurde und dies auch mit einer geringer dosierten Menge an Chemotherapeutika, was die Nebenwirkungen verringerte [192]. Das rekombinante H-1PV, das ein Apoptin-Gen beinhaltet, erhöhte die Zytotoxizität *in vitro* in humanen Tumorzellen, wenn es in Kombination mit Chemotherapeutika (Paclitaxel, Etoposid) verabreicht wurde [58].

Die Wirkung von H-1PV wurde auch in Kombination mit weiteren Arzneimitteln wie dem Antibiotikum Norfloxacin oder Phytoalexin (Resveratrol) untersucht. In humanen Pankreaszelllinien konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Behandlung synergistische (H-1PV und Norfloxacin) und additive Effekte (H-1PV und Phytoalexin) hat [191].

Zudem zeigte die Kombination mit weiteren onkolytischen Viren weitere Therapiemöglichkeiten. H-1PV zusammen mit einem Reovirus bewirkte in humanen Gliomazellen (U87) eine gesteigerte Zelllyse [273].

Außerdem konnte beim PDAC durch eine onkolytischen Immuntherapie mit H-1PV eine verstärkte NK-Zell-vermittelte Immunantwort ausgelöst werden. H-1PV zerstört Pankreas-

tumorzellen, stimuliert durch die Infektion der Tumorzellen eine NK-Zellantwort und verstärkt die Erkennung der Tumorzellen durch die NK-Effektorzellen [200].

Dies spricht für den Einsatz des H-1PV in Kombination mit weiteren Therapien.

Schierer *et al.* zeigten, dass für eine potente Vakzinierung zusätzliche stimulatorische Signale benötigt werden. Diese können durch virusinfizierte Tumorzellen erzeugt werden, z.B. durch das Einbringen immunregulatorischer Gene in das adenovirale Genom [237]. Das onkolytische Virus JX-594 [65], wird als erstes zielgerichtetes Vacciniavirus für die Behandlung von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen eingesetzt und eine klinische Studie Phase 2b für Patienten mit Sorafenib-resistenten HCC (hepatozelluläres Karzinom) ist derzeit in Vorbereitung.

5.4 Schlussfolgerung

In der letzten Dekade wurden enorme Entwicklungen im Verständnis der TLR-Rolle für Pathogenerkennung und Abwehrmechanismen gemacht. Strukturanalysen gaben Hinweise darauf, dass endogenen Moleküle zusammen mit PAMPs als Adjuvanzien fungieren und über TLRs (o.a. PRRs) angeborene Immunantworten auslösen. Zudem spielen TLRs eine Schlüsselrolle bei der Förderung der adaptiven Immunität gegen infektiöse Mikroorganismen. Außerdem wurde deutlich, dass zytosolische PRR-Signalwege (TLR3+9) in Nicht-Immunzellen eine Rolle bei der Förderung und Erhöhung der DC-Reifung und anschließender Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen haben [144].

Durch die gezielte Aktivierung von TLRs ist es so möglich eine gezielte Immunantwort auszulösen. Auch in der Krebstherapie ist dies von großer Bedeutung, da hier die gezielte Aktivierung der zellulären Immunabwehr eine gute Therapieoption darstellt.

Demnach ist die weitere Analyse von Toll-like Rezeptoren von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten von Krebs, sowie weiteren Erkrankungen.

Berücksichtigt man nun alle Untersuchungen, zeigt sich, dass TLRs eine geeignete Zielstruktur zu Therapiezwecken darstellen, um so das Überleben von Krebspatienten zu verlängern, auch von solchen die nach Chemotherapien ein Rezidiv bilden. Demnach ist das bessere Verständnis der Funktion und Regulation von TLRs und deren Signalwege für weitere Untersuchungen von großem Interesse.

Zudem bietet der Onkotropismus von H-1PV, begründet durch die präferentielle Vervielfältigung der Viren in neoplastischen Zellen und Tumorgewebe [11], eine Spezifität, die bei den konventionell angewandten Krebstherapien nicht gegeben ist.

Demnach bietet die Verknüpfung der onkolytischen Therapie mit der TLR-gerichteten Therapie einen vielversprechenden neuen Ansatz zur Erweiterung der Krebstherapie.

Erstmals konnte hier belegt werden dass eine DC-Kokultur mit H-1PV-infizierten SK29Mel Zellen zu einer TLR-Aktivierung und einer anschließenden TLR-vermittelten NF κ B-Aktivierung führt. Daher sind H-1PV-induzierte TCL immunogen und einerseits in der Lage eine Immunantwort über eine TLR-Aktivierung DCs zu induzieren und andererseits ein proinflammatorisches Milieu schaffen und so eine effiziente tumorspezifische Immunantwort auszulösen. Die TLR Nutzung als Therapiemöglichkeit hat also 2 Wirkungsbereiche, zum einen die Immunstimulation und zum anderen das Vernichten von Krebszellen [274].

Die genaue Analyse der TLR-abhängigen viralen Erkennung kann helfen neue Therapiemöglichkeiten und antivirale Agentien hervorzubringen. Des Weiteren ist es möglich über die zielgerichtete TLR-Aktivierung auf DCs deren Fähigkeit virusspezifische T-Zellen zu aktivieren zu verstärken. So können neue TLR-Liganden als Adjuvanzen oder Immunmodulatoren wirken [215].

Dabei ist es wichtig die antitumorale Immunantwort so zu verstärken, dass eine Beseitigung des Tumors möglich wird. Zudem muss der Virus so effektiv sein, dass die ausgelöste antivirale Immunantwort eine Wirkung des Virus zulässt, bevor dieser bekämpft wird.

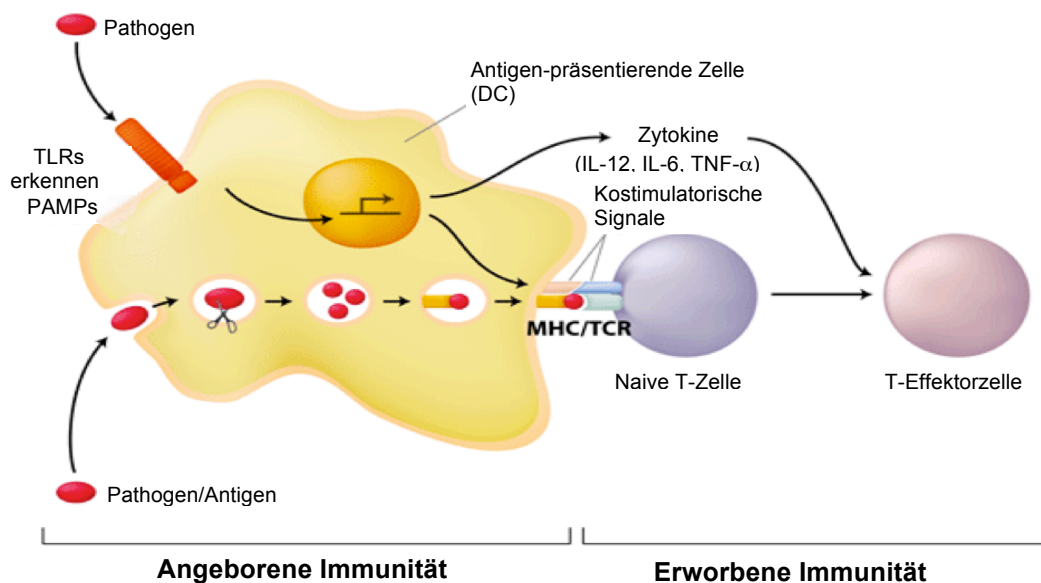


Abbildung 58: TLRs als Verbindungsstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität (verändert nach: lip.blogspot.com/2009_05_01_archive.html)

Ein weiterer Nutzen von TLR Agonisten für die Krebstherapie ist die Kombination mit bestehenden Therapien wie Bestrahlung, Chemotherapie oder monoklonalen Antikörpern um diese zu ergänzen. Um eine signifikante Antitumorantwort über die TLR-Stimulation auszulösen gibt es verschiedene Mechanismen.

1: Verstärkung der angeborenen Immunantwort, über die Stimulation von Antitumormechanismen. Dazu gehören die Aktivierung von NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen sowie die Induktion von Zytokinen.

2: Verstärkung der T-Zell Immunität durch Antigenfreisetzung von Tumorzellen, die durch angeborene Mechanismen oder zusätzliche zytotoxische Agenzien zerstört wurden und so eine CD4 Th1 und CD8 CTL Antwort gegen die Tumorantigene auslösen [205].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem onkolytischen Parvovirus H-1 humane dendritische Zellen über Toll-like Rezeptoren aktiviert. Anhand von mit humanen TLR transfizierten Zellen, identifizierten wir nach einer H-1PV Infektion eine Aktivierung von TLR3 und TLR9 was zu einer gesteigerten NFκB-Expression führt. Darüber hinaus bewirkten H-1PV-induzierte Tumorzellysate eine effektive Immunstimulation über die Reifung von dendritischen Zellen, sowie eine verstärkte Produktion proinflammatorischer Zytokine. Diese Ergebnisse zeigten, dass H-1PV immunmodulatorische Eigenschaften über TLRs vermittelte.

Demnach wurde durch die H-1PV Infektion die Immunantwort über TLRs induziert. Somit verknüpft eine Infektion mit H-1PV die ausgelöste Immunantwort mit der Bekämpfung der infizierten Tumorzellen. Die Infektion hat demnach einen positiven Effekt und trägt dazu bei den Tumor zu beseitigen.

Somit kann durch den Einsatz des H-1PV die onkolytische Wirkung mit der Nutzung der TLRs als Therapiemöglichkeit verknüpft werden. Die onkolytischen Virotherapie mit H-1PV erhöht durch unterschiedliche Auswirkungen auf DCs die Immunreaktion und verstärkt die Anti-Tumor-Immunität. Diese Ergebnisse zeigen einen neuen potenziellen Ansatz für den Einsatz onkolytischer Viren für TLR-zielgerichtete Therapieoptionen und stellen eine ideale Möglichkeit zur Erweiterung der Krebsbehandlung dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA: Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 1991, 10:3941-3950.
2. Richards RG, Armentrout RW: Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J Virol* 1979, 30:397-399.
3. Spalholz BA, Tattersall P: Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* 1983, 46:937-943.
4. Cossons N, Faust EA, Zannis-Hadjopoulos M: DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome. *Virology* 1996, 216:258-264.
5. Brown KE, Anderson SM, Young NS: Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993, 262:114-117.
6. Kishore J, Kapoor A: Erythrovirus B19 infection in humans. *Indian J Med Res* 2000, 112:149-164.
7. Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Allaume X, Servant A, Bernaudin F, Auguste V, Garbarg-Chenon A: Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J Clin Microbiol* 1999, 37:2483-2487.
8. Toolan HW: A virus associated with transplantable human tumors. *Bull N Y Acad Med* 1961, 37:305-310.
9. Black PH: The oncogenic DNA viruses: a review of in vitro transformation studies. *Annu Rev Microbiol* 1968, 22:391-426.
10. Toolan HW: Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters. *Nature* 1967, 214:1036.
11. Rommelaere J, Cornelis JJ: Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* 1991, 33:233-251.
12. Kilham L, Margolis G: Cerebellar Disease in Cats Induced by Inoculation of Rat Virus. *Science* 1965, 148:244-246.
13. Jacoby RO, Ball-Goodrich LJ, Besselsen DG, McKisic MD, Riley LK, Smith AL: Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* 1996, 46:370-380.
14. Moore AE, Nicastrri AD: Lethal infection and pathological findings in A x C rats inoculated with H virus and RV. *J Natl Cancer Inst* 1965, 35:937-947.
15. Guglielmino S, Tempera G, Pappalardo G, Castro A: H-1 and X14 parvovirus antibodies in women with abortions or still-births. *Acta Virol* 1978, 22:426-428.
16. Siegl G: Molecular biology and pathogenicity of human and animal parvoviruses. *Behring Inst Mitt* 1990:6-13.
17. Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, Schlehofer JR, Raykov Z: Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010, 21:185-195.
18. Kerr JR, Bloom, M.E.: Pathogenesis of parvovirus infections. London: Edward Arnold; 2006; 385-416.
19. Cornelis JJ, Salome N, Dinsart C, Rommelaere J: Vectors based on autonomous parvoviruses: novel tools to treat cancer? *J Gene Med* 2004, 6 Suppl 1:S193-202.
20. Geletneky K, Hartkopf AD, Krempien R, Rommelaere J, Schlehofer JR: Therapeutic implications of the enhanced short and long-term cytotoxicity of radiation treatment followed by oncolytic parvovirus H-1 infection in high-grade glioma cells. *Bioeng Bugs* 2010, 1:429-433.
21. Geletneky K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Dahm M, Krebs O, Knebel Doeberitz Mv, Huber B, Hajda J: Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC Cancer* 2012, 12:99.
22. Chapman MS, Rossmann MG: Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology* 1993, 194:491-508.
23. Paradiso PR: Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *J Virol* 1981, 39:800-807.
24. Cotmore SF, Tattersall P: Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res* 2007, 70:183-232.
25. Deleu L, Pujol A, Faisst S, Rommelaere J: Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* 1999, 73:3877-3885.
26. Rommelaere J, Cornelis JJ: Autonomous parvoviruses. *Monogr Virol* 2001, 22:100-129.
27. Cotmore SF, Tattersall P: The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 1987, 33:91-174.
28. Rhode SL, 3rd, Paradiso PR: Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J Virol* 1983, 45:173-184.
29. Astell CR, Chow MB, Ward DC: Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J Virol* 1985, 54:171-177.
30. Berns KI: Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 1990, 54:316-329.
31. Rommelaere J, GN, Cziepluch C, Cornelis JJ: Parvoviruses as anti-cancer agents. New York: Marcel Dekker; 2005; 627-675.
32. Vihinen-Ranta M, Suikkanen S, Parrish CR: Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J Virol* 2004, 78:6709-6714.
33. Bashir T, Horlein R, Rommelaere J, Willwand K: Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:5522-5527.
34. Cotmore SF, Tattersall P: An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J* 1994, 13:4145-4152.

35. Fuks F, Deleu L, Dinsart C, Rommelaere J, Faisst S: ras oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors. *J Virol* 1996, 70:1331-1339.
36. Cotmore SF, Sturzenbecker LJ, Tattersall P: The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virology* 1983, 129:333-343.
37. Tullis GE, Burger LR, Pintel DJ: The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* 1993, 67:131-141.
38. Lombardo E, Ramirez JC, Garcia J, Almendral JM: Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* 2002, 76:7049-7059.
39. Corbau R, Salom N, Rommelaere J, Nuesch JP: Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* 1999, 259:402-415.
40. Noteborn MH: Proteins selectively killing tumor cells. *Eur J Pharmacol* 2009, 625:165-173.
41. Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C: Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* 1998, 72:8893-8903.
42. Ran Z, Rayet B, Rommelaere J, Faisst S: Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* 1999, 65:161-174.
43. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J: Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol* 2007, 81:4186-4198.
44. Cornelis JJ, Becquart P, Duponchel N, Salome N, Avalosse BL, Namba M, Rommelaere J: Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J Virol* 1988, 62:1679-1686.
45. Op De Beeck A, Caillet-Fauquet P: The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? *J Virol* 1997, 71:5323-5329.
46. Eichwald V, Daeffler L, Klein M, Rommelaere J, Salome N: The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol* 2002, 76:10307-10319.
47. Kilham L, Olivier LJ: A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* 1959, 7:428-437.
48. Faisst S, Guittard D, Benner A, Cesbron JY, Schlehofer JR, Rommelaere J, Dupressoir T: Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. *Int J Cancer* 1998, 75:584-589.
49. Bergs VV: Rat virus-mediated suppression of leukemia induction by Moloney virus in rats. *Cancer Res* 1969, 29:1669-1672.
50. Yang TJ: Parvovirus-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Am J Vet Res* 1987, 48:799-800.
51. Moehler M, Blechacz B, Weiskopf N, Zeidler M, Stremmel W, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ: Effective infection, apoptotic cell killing and gene transfer of human hepatoma cells but not primary hepatocytes by parvovirus H1 and derived vectors. *Cancer Gene Ther* 2001, 8:158-167.
52. Salome N, van Hille B, Geuskens M, Rommelaere J: Partial reversion of conditional transformation correlates with a decrease in the sensitivity of rat cells to killing by the parvovirus minute virus of mice but not in their capacity for virus production: effect of a temperature-sensitive v-src oncogene. *J Virol* 1989, 63:4797-4807.
53. Tattersall P: Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J Virol* 1972, 10:586-590.
54. Cornelis JJ, Lang SI, Stroh-Dege AY, Balboni G, Dinsart C, Rommelaere J: Cancer gene therapy through autonomous parvovirus-mediated gene transfer. *Curr Gene Ther* 2004, 4:249-261.
55. Chiocca EA: Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:938-950.
56. Shaughnessy E, Lu D, Chatterjee S, Wong KK: Parvoviral vectors for the gene therapy of cancer. *Semin Oncol* 1996, 23:159-171.
57. Giese NA, Raykov Z, DeMartino L, Vecchi A, Sozzani S, Dinsart C, Cornelis JJ, Rommelaere J: Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther* 2002, 9:432-442.
58. Olijslagers S, Dege AY, Dinsart C, Voorhoeve M, Rommelaere J, Noteborn MH, Cornelis JJ: Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther* 2001, 8:958-965.
59. Haag A, Menten P, Van Damme J, Dinsart C, Rommelaere J, Cornelis JJ: Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther* 2000, 11:597-609.
60. Wetzel K, Menten P, Opdenakker G, Van Damme J, Grone HJ, Giese N, Vecchi A, Sozzani S, Cornelis JJ, Rommelaere J, Dinsart C: Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med* 2001, 3:326-337.
61. Russell SJ, Brandenburger A, Flemming CL, Collins MK, Rommelaere J: Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J Virol* 1992, 66:2821-2828.

62. Dupont F, Avalosse B, Karim A, Mine N, Bosseler M, Maron A, Van den Broeke AV, Ghanem GE, Burny A, Zeicher M: Tumor-selective gene transduction and cell killing with an oncotropic autonomous parvovirus-based vector. *Gene Ther* 2000, 7:790-796.
63. Kelly E, Russell SJ: History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* 2007, 15:651-659.
64. Hauses M, Schackert HK: [Gene therapy of malignant tumors]. *Zentralbl Chir* 2000, 125 Suppl 1:41-46.
65. Parato KA, Breitbach CJ, Le Boeuf F, Wang J, Storbeck C, et al: The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther* 2012, 20:749-758.
66. You L, He B, Xu Z, McCormick F, Jablons DM: Future directions: oncolytic viruses. *Clin Lung Cancer* 2004, 5:226-230.
67. Kirn DH, McCormick F: Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol Med Today* 1996, 2:519-527.
68. Ehrlich P: Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909, 5.
69. Burnet FM: Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1967, 1:1171-1174.
70. Thomas L: In: *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. New York: Hoeber and Harper; 1959; 529-533.
71. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA: A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001, 2:293-299.
72. Matzinger P: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002, 296:301-305.
73. Medzhitov R, Janeway CA, Jr.: Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 1998, 10:351-353.
74. Kaufman HL, Disis ML: Immune system versus tumor: shifting the balance in favor of DCs and effective immunity. *J Clin Invest* 2004, 113:664-667.
75. Mapara MY, Sykes M: Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004, 22:1136-1151.
76. Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG: Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1993, 690:42-49.
77. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B: Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997, 18:267-268.
78. Perales MA, Blachere NE, Engelhorn ME, Ferrone CR, Gold JS, Gregor PD, Noffz G, Wolchok JD, Houghton AN: Strategies to overcome immune ignorance and tolerance. *Semin Cancer Biol* 2002, 12:63-71.
79. Wiemann B, Starnes CO: Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994, 64:529-564.
80. Storch E, Kirchner H, Schirmacher V: Prolongation of survival of mice bearing the Eb and ESb lymphoma by treatment with interferon inducers alone or in combination with *Corynebacterium parvum*. *Cancer Immunol Immunother* 1986, 23:179-184.
81. Chyczewska E, Mroz RM: Cytokines in lung cancer. *Rocz Akad Med Bialymst* 1997, 42 Suppl 1:8-22.
82. Marchisone C, Pfeffer U, Del Grosso F, Noonan DM, Santi L, Albini A: Progress towards gene therapy for cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2000, 19:261-270.
83. Overwijk WW, Lee DS, Surman DR, Irvine KR, Touloukian CE, Chan CC, Carroll MW, Moss B, Rosenberg SA, Restifo NP: Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:2982-2987.
84. Renner C, Kubuschok B, Trumper L, Pfreundschuh M: Clinical approaches to vaccination in oncology. *Ann Hematol* 2001, 80:255-266.
85. Janeway CA, Jr.: How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 2001, 3:1167-1171.
86. Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003, 21:335-376.
87. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000, 343:37-49.
88. Medzhitov R, Janeway C, Jr.: Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000, 173:89-97.
89. Medzhitov R, Janeway CA, Jr.: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997, 9:4-9.
90. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY: Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002, 347:1151-1160.
91. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002, 20:197-216.
92. Janeway CA, Jr.: The role of self-recognition in receptor repertoire development. *Members of the Janeway Laboratory. Immunol Res* 1999, 19:107-118.
93. Altman JD, Lippolis JD: *Cytotoxic T-cell Function*. 2 edn. London: Mosby International Limited; 2001
94. Dranoff G: Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:11-22.
95. Janeway CA, Jr.: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992, 13:11-16.
96. Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996, 383:787-793.
97. Jankovic D, Liu Z, Gause WC: Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 2001, 22:450-457.
98. Langerhans, P.: Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch*, 1968, 44:325-327.

99. Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973, 137:1142-1162.
100. Schuler G, Romani N, Steinman RM: A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1985, 85:99s-106s.
101. Reis e Sousa C: Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 2004, 16:27-34.
102. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N: Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* 2005, 25:177-188.
103. Shortman K, Liu YJ: Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:151-161.
104. Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC: Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol* 1994, 152:5208-5219.
105. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000, 18:767-811.
106. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998, 392:86-89.
107. Comabella M, Montalban X, Munz C, Lunemann JD: Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2010, 6:499-507.
108. Wolfel T, Klehmann E, Muller C, Schutt KH, Meyer zum Buschenfelde KH, Knuth A: Lysis of human melanoma cells by autologous cytolytic T cell clones. Identification of human histocompatibility leukocyte antigen A2 as a restriction element for three different antigens. *J Exp Med* 1989, 170:797-810.
109. Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T: The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993, 178:489-495.
110. Schneider J, Brichard V, Boon T, Meyer zum Buschenfelde KH, Wolfel T: Overlapping peptides of melanocyte differentiation antigen Melan-A/MART-1 recognized by autologous cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B45.1 and HLA-A2.1. *Int J Cancer* 1998, 75:451-458.
111. Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Meyer zum Buschenfelde KH, Boon T: Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1994, 24:759-764.
112. Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001, 1:135-145.
113. Anderson KV, Nusslein-Volhard C: Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 1984, 311:223-227.
114. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005, 17:1-14.
115. Belvin MP, Anderson KV: A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996, 12:393-416.
116. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr.: MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998, 2:253-258.
117. Takeda K, Akira S: [Role of toll-like receptor in innate immunity]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2002, 47:2097-2102.
118. Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010, 11:373-384.
119. Schwartz DA, Quinn TJ, Thorne PS, Sayeed S, Yi AK, Krieg AM: CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1997, 100:68-73.
120. Krieg AM: Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc Am Thorac Soc* 2007, 4:289-294.
121. Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ: Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sci* 2000, 68:241-258.
122. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, et al: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998, 282:2085-2088.
123. Beutler B, Rietschel ET: Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:169-176.
124. Amith SR, Jayanth P, Finlay T, Franchuk S, Gilmour A, Abdulkhalek S, Szewczuk MR: Detection of Neu1 sialidase activity in regulating Toll-like receptor activation. *J Vis Exp*.
125. Blasius AL, Beutler B: Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010, 32:305-315.
126. Medzhitov R: CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol* 2001, 2:15-16.
127. Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000, 406:782-787.
128. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:13766-13771.
129. Su B, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H, Sherman PM: *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003, 71:3496-3502.
130. Kawai T, Akira S: Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005, 17:338-344.
131. Caron G, Duluc D, Fremaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y: Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 2005, 175:1551-1557.
132. Takeuchi O, Akira S: Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001, 1:625-635.

133. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004, 303:1529-1531.
134. Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M: TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004, 21:107-119.
135. Blasius AL, Beutler B: Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32:305-315.
136. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM: Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol* 2011, 29:185-214.
137. Pulko V, Liu X, Krco CJ, Harris KJ, Frigola X, Kwon ED, Dong H: TLR3-stimulated dendritic cells up-regulate B7-H1 expression and influence the magnitude of CD8 T cell responses to tumor vaccination. *J Immunol* 2009, 183:3634-3641.
138. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S: The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol* 2003, 170:3059-3064.
139. Wagner H: Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 2001, 14:499-502.
140. Akira S: TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, 311:1-16.
141. Akira S: Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003, 15:5-11.
142. Rahman MM, McFadden G: Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog* 2006, 2:e4.
143. Stein C, Caccamo M, Laird G, Leptin M: Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol* 2007, 8:R251.
144. Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11:373-384.
145. Bustin M: Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999, 19:5237-5246.
146. Goodwin GH, Johns EW: The isolation and purification of the high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins. *Methods Cell Biol* 1977, 16:257-267.
147. Bianchi ME, Manfredi AA: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007, 220:35-46.
148. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME: Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002, 418:191-195.
149. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, et al: Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007, 8:487-496.
150. Erlandsson Harris H, Andersson U: Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* 2004, 34:1503-1512.
151. Mitsouras K, Wong B, Arayata C, Johnson RC, Carey M: The DNA architectural protein HMGB1 displays two distinct modes of action that promote enhanceosome assembly. *Mol Cell Biol* 2002, 22:4390-4401.
152. Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999, 18:6853-6866.
153. Messer GR, R.A.: Nuklearfaktor-kappa-B (NF-kB) Teil 1: Funktion und Regulation. *Der Hautarzt* 2001, 52:677-685.
154. Tripathi P, Aggarwal A: NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Science* 2006, 90:519-531.
155. Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998, 16:225-260.
156. Baeuerle PA, Baltimore D: I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 1988, 242:540-546.
157. Bonizzi G, Karin M: The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004, 25:280-288.
158. Abujamra AL, Spanjaard RA, Akinsheye I, Zhao X, Faller DV, Ghosh SK: Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology* 2006, 345:390-403.
159. Hellman P, Eriksson H: Early activation markers of human peripheral dendritic cells. *Hum Immunol* 2007, 68:324-333.
160. Huang LY, Dumontelle JL, Zolodz M, Deora A, Mozier NM, Golding B: Use of toll-like receptor assays to detect and identify microbial contaminants in biological products. *J Clin Microbiol* 2009, 47:3427-3434.
161. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK: Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000, 164:966-972.
162. Wolfel T, Hauer M, Klehmann E, Brichard V, Ackermann B, Knuth A, Boon T, Meyer Zum Buschenfelde KH: Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL). *Int J Cancer* 1993, 55:237-244.
163. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977, 36:59-74.
164. Hayashi F, Means TK, Luster AD: Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003, 102:2660-2669.
165. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65:55-63.

166. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A: Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 2003, 170:4069-4076.
167. Chen CA, Okayama H: Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 1988, 6:632-638.
168. Cooper GM: *The Cell - A Molecular Approach*. 2 edn. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000
169. Inouye S, Shimomura O: The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 233:349-353.
170. Helling RB, Goodman HM, Boyer HW: Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambda-doid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 1974, 14:1235-1244.
171. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG: Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971, 56:341-361.
172. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239:487-491.
173. Temin HM, Mizutani S: RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970, 226:1211-1213.
174. Moehler MH, Zeidler M, Wilsberg V, Cornelis JJ, Woelfel T, Rommelaere J, Galle PR, Heike M: Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response in vitro via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther* 2005, 16:996-1005.
175. Geletneky K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, Herrero YCM, Deleu L, Sommer C, Thomas N, Rommelaere J, Schlehofer JR: Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro Oncol* 2010, 12:804-814.
176. Raykov Z, Grekova S, Galabov AS, Balboni G, Koch U, Aprahamian M, Rommelaere J: Combined oncolytic and vaccination activities of parvovirus H-1 in a metastatic tumor model. *Oncol Rep* 2007, 17:1493-1499.
177. Lee JH, Koo TH, Yoon H, Jung HS, Jin HZ, Lee K, Hong YS, Lee JJ: Inhibition of NF-kappa B activation through targeting I kappa B kinase by celastrol, a quinone methide triterpenoid. *Biochem Pharmacol* 2006, 72:1311-1321.
178. Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Aggarwal BB: Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF-kappaB-regulated gene products and TAK1-mediated NF-kappaB activation. *Blood* 2007, 109:2727-2735.
179. Ghosh S, Baltimore D: Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 1990, 344:678-682.
180. Vile R, Ando D, Kim D: The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer: unique biological and biosafety points to consider. *Cancer Gene Ther* 2002, 9:1062-1067.
181. Ball-Goodrich LJ, Leland SE, Johnson EA, Paturzo FX, Jacoby RO: Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup. *J Virol* 1998, 72:3289-3299.
182. McKisic MD, Paturzo FX, Smith AL: Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions. *Transplantation* 1996, 61:292-299.
183. Raykov Z, Balboni G, Aprahamian M, Rommelaere J: Carrier cell-mediated delivery of oncolytic parvoviruses for targeting metastases. *Int J Cancer* 2004, 109:742-749.
184. Lundberg P, Welander P, Han X, Cantin E: Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J Virol* 2003, 77:11158-11169.
185. Bridle BW, Hanson S, Lichty BD: Combining oncolytic virotherapy and tumour vaccination. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010, 21:143-148.
186. El Bakkouri K, Servais C, Clement N, Cheong SC, Franssen JD, Velu T, Brandenburger A: In vivo anti-tumour activity of recombinant MVM parvoviral vectors carrying the human interleukin-2 cDNA. *J Gene Med* 2005, 7:189-197.
187. Liu TC, Kim D: Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther* 2008, 15:877-884.
188. Steele L, Errington F, Prestwich R, Ilett E, Harrington K, Pandha H, Coffey M, Selby P, Vile R, Melcher A: Pro-inflammatory cytokine/chemokine production by reovirus treated melanoma cells is PKR/NF-kappaB mediated and supports innate and adaptive anti-tumour immune priming. *Mol Cancer* 2011, 10:20.
189. Fournier P, Arnold A, Wilden H, Schirmacher V: Newcastle disease virus induces pro-inflammatory conditions and type I interferon for counter-acting Treg activity. *Int J Oncol* 2012, 40:840-850.
190. Raykov Z, Grekova S, Leuchs B, Aprahamian M, Rommelaere J: Arming parvoviruses with CpG motifs to improve their oncosuppressive capacity. *Int J Cancer* 2008, 122:2880-2884.
191. Raykov Z, Georgieva PB, Angelova A, Galabov AS, Rommelaere J: Anticancer effects of an oncolytic parvovirus combined with non-conventional therapeutics on pancreatic carcinoma cell lines. *Acta Virol* 2009, 53:57-60.
192. Angelova AL, Aprahamian M, Grekova SP, Hajri A, Leuchs B, Giese NA, Dinsart C, Herrmann A, Balboni G, Rommelaere J, Raykov Z: Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV. *Clin Cancer Res* 2009, 15:511-519.
193. Angelova AL, Aprahamian M, Balboni G, Delecluse HJ, Feederle R, et al: Oncolytic rat parvovirus H-1PV, a candidate for the treatment of human lymphoma: In vitro and in vivo studies. *Mol Ther* 2009, 17:1164-1172.

194. Moehler M, Sieben M, Roth S, Springsguth F, Leuchs B, Zeidler M, Dinsart C, Rommelaere J, Galle PR: Activation of the human immune system by chemotherapeutic or targeted agents combined with the oncolytic parvovirus H-1. *BMC Cancer* 2011, 11:464.
195. Moehler M, Zeidler M, Schede J, Rommelaere J, Galle PR, Cornelis JJ, Heike M: Oncolytic parvovirus H1 induces release of heat-shock protein HSP72 in susceptible human tumor cells but may not affect primary immune cells. *Cancer Gene Ther* 2003, 10:477-480.
196. Sieben M, Herzer K, Zeidler M, Heinrichs V, Leuchs B, Schuler M, Cornelis JJ, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M: Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein. *World J Gastroenterol* 2008, 14:3819-3828.
197. Muharram G, Le Rhun E, Loison I, Wizla P, Richard A, et al: Parvovirus H-1 induces cytopathic effects in breast carcinoma-derived cultures. *Breast Cancer Res Treat* 2010, 121:23-33.
198. Geletneký K, Hartkopf AD, Krempien R, Rommelaere J, Schlehofer JR: Improved killing of human high-grade glioma cells by combining ionizing radiation with oncolytic parvovirus H-1 infection. *J Biomed Biotechnol*, 2010:350748.
199. Kiprianova I, Thomas N, Ayache A, Fischer M, Leuchs B, Klein M, Rommelaere J, Schlehofer JR: Regression of glioma in rat models by intranasal application of parvovirus h-1. *Clin Cancer Res* 2011, 17:5333-5342.
200. Bhat R, Dempe S, Dinsart C, Rommelaere J: Enhancement of NK cell antitumor responses using an oncolytic parvovirus. *Int J Cancer* 2011, 128:908-919.
201. Grekova S, Aprahamian M, Giese N, Schmitt S, Giese T, Falk CS, Daeffler L, Cziepluch C, Rommelaere J, Raykov Z: Immune cells participate in the oncosuppressive activity of parvovirus H-1PV and are activated as a result of their abortive infection with this agent. *Cancer Biol Ther* 2011, 10:1280-1289.
202. Grekova SP, Aprahamian M, Daeffler L, Leuchs B, Angelova A, Giese T, Galabov A, Heller A, Giese NA, Rommelaere J, Raykov Z: Interferon gamma improves the vaccination potential of oncolytic parvovirus H-1PV for the treatment of peritoneal carcinomatosis in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2011, 12:888-895.
203. Morita E, Nakashima A, Asao H, Sato H, Sugamura K: Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J Virol* 2003, 77:2915-2921.
204. Kiemer AK: Angeborenes Immunsystem: TLR eröffnen neue Möglichkeiten. In *Pharmazeutische Zeitung*. Eschborn: Govi-Verlag; 2008.
205. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007, 13:552-559.
206. Razonable RR, Henault M, Lee LN, Laethem C, Johnston PA, Watson HL, Paya CV: Secretion of proinflammatory cytokines and chemokines during amphotericin B exposure is mediated by coactivation of toll-like receptors 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:1617-1621.
207. Hristov G, Kramer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A: Through its nonstructural protein NS1, parvovirus H-1 induces apoptosis via accumulation of reactive oxygen species. *J Virol*, 84:5909-5922.
208. Schulz O, Diebold SS, Chen M, Naslund TI, Nolte MA, Alexopoulou L, Azuma YT, Flavell RA, Liljestrom P, Reis e Sousa C: Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005, 433:887-892.
209. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriu N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M: Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 2005, 280:5571-5580.
210. Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL: Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol* 2005, 79:12273-12279.
211. Zipris D, Lien E, Nair A, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA: TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat. *J Immunol* 2007, 178:693-701.
212. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H: Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:11416-11421.
213. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A: Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003, 198:513-520.
214. Zhu J, Huang X, Yang Y: The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest* 2009, 119:2388-2398.
215. Lore K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Perfetto S, Roederer M, Seder RA, Koup RA: Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol* 2003, 171:4320-4328.
216. Cerullo V, Seiler MP, Mane V, Brunetti-Pierrri N, Clarke C, Bertin TK, Rodgers JR, Lee B: Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* 2007, 15:378-385.
217. Hsu GJ, Tzang BS, Tsai CC, Chiu CC, Huang CY, Hsu TC: Effects of human parvovirus B19 on expression of defensins and Toll-like receptors. *Chin J Physiol*, 54:367-376.
218. Wille-Reece U, Wu CY, Flynn BJ, Kedl RM, Seder RA: Immunization with HIV-1 Gag protein conjugated to a TLR7/8 agonist results in the generation of HIV-1 Gag-specific Th1 and CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2005, 174:7676-7683.

219. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L: Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 2000, 408:111-115.
220. Barkett M, Gilmore TD: Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999, 18:6910-6924.
221. Garcia MA, Gallego P, Campagna M, Gonzalez-Santamaria J, Martinez G, Marcos-Villar L, Vidal A, Esteban M, Rivas C: Activation of NF-kB pathway by virus infection requires Rb expression. *PLoS One* 2009, 4:e6422.
222. Melotti P, Nicolis E, Tamanini A, Rolfini R, Pavirani A, Cabrini G: Activation of NF-kB mediates ICAM-1 induction in respiratory cells exposed to an adenovirus-derived vector. *Gene Ther* 2001, 8:1436-1442.
223. Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, Bartlett NW, Smith GL, Bowie A, O'Neill LA: The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* 2003, 197:343-351.
224. DiPerna G, Stack J, Bowie AG, Boyd A, Kotwal G, Zhang Z, Arvikar S, Latz E, Fitzgerald KA, Marshall WL: Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* 2004, 279:36570-36578.
225. Chang S, Dolganiuc A, Szabo G: Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J Leukoc Biol* 2007, 82:479-487.
226. Hiscott J, Kwon H, Genin P: Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 2001, 107:143-151.
227. Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F: West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol* 2008, 82:8262-8271.
228. Appledorn DM, Patial S, McBride A, Godbehere S, Van Rooijen N, Parameswaran N, Amalfitano A: Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol* 2008, 181:2134-2144.
229. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, et al: The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007, 220:47-59.
230. Jiang W, Li J, Gallowitsch-Puerta M, Tracey KJ, Pisetsky DS: The effects of CpG DNA on HMGB1 release by murine macrophage cell lines. *J Leukoc Biol* 2005, 78:930-936.
231. Jung JH, Park JH, Jee MH, Keum SJ, Cho MS, Yoon SK, Jang SK: Hepatitis C virus infection is blocked by HMGB1 released from virus-infected cells. *J Virol* 2011, 85:9359-9368.
232. Huang B, Sikorski R, Kirn DH, Thorne SH: Synergistic anti-tumor effects between oncolytic vaccinia virus and paclitaxel are mediated by the IFN response and HMGB1. *Gene Ther* 2011, 18:164-172.
233. Bell CW, Jiang W, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS: The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006, 291:C1318-1325.
234. Beyer C, Stearns NA, Giessl A, Distler JH, Schett G, Pisetsky D: The extracellular release of DNA and HMGB1 from Jurkat T cells during in vitro necrotic cell death. *Innate Immun* 2012.
235. Barlan AU, Griffin TM, McGuire KA, Wiethoff CM: Adenovirus membrane penetration activates the NLRP3 inflammasome. *J Virol* 2011, 85:146-155.
236. Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, et al: HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med* 2009, 6:e10.
237. Schierer S, Hesse A, Muller I, Kampgen E, Curjel DT, Schuler G, Steinkasserer A, Nettelbeck DM: Modulation of viability and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by oncolytic adenoviruses. *Int J Cancer* 2008, 122:219-229.
238. Schnorr JJ, Xanthakos S, Keikavoussi P, Kampgen E, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S: Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:5326-5331.
239. Jenne L, Hauser C, Arrighi JF, Saurat JH, Hugin AW: Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function. *Gene Ther* 2000, 7:1575-1583.
240. Cervantes-Barragan L, Zust R, Maier R, Sierro S, Janda J, Levy F, Speiser D, Romero P, Rohrlisch PS, Ludewig B, Thiel V: Dendritic cell-specific antigen delivery by coronavirus vaccine vectors induces long-lasting protective antiviral and antitumor immunity. *MBio* 2010, 1.
241. Errington F, White CL, Twigger KR, Rose A, Scott K, et al: Inflammatory tumour cell killing by oncolytic reovirus for the treatment of melanoma. *Gene Ther* 2008, 15:1257-1270.
242. Verdijk RM, Mutis T, Esendam B, Kamp J, Melief CJ, Brand A, Goulmy E: Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* 1999, 163:57-61.
243. Hoene V, Peiser M, Wanner R: Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J Leukoc Biol* 2006, 80:1328-1336.
244. Frankenberger B, Schendel DJ: Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *Eur J Cell Biol* 2012, 91:53-58.
245. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S: Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004, 34:2541-2550.
246. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT: TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004, 5:190-198.
247. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R: Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001, 2:947-950.

248. Fragale A, Stellacci E, Ilari R, Remoli AL, Lanciotti A, et al: Critical role of IRF-8 in negative regulation of TLR3 expression by Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2 activity in human myeloid dendritic cells. *J Immunol* 2011, 186:1951-1962.
249. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001, 194:863-869.
250. Guerra S, Najera JL, Gonzalez JM, Lopez-Fernandez LA, Climent N, Gatell JM, Gallart T, Esteban M: Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J Virol* 2007, 81:8707-8721.
251. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, et al: TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007, 317:1522-1527.
252. Zhengwu L: Potential therapeutic interventions on toll like receptors for clinical applications. *Pharmaceutical Biotechnology* 2010, 2 (1):007-013.
253. Ramirez MC, Sigal LJ: Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol* 2002, 169:6733-6742.
254. Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, et al: Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2009, 27:5763-5771.
255. Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, et al: Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* 2002, 218:74-86.
256. Goodchild A, Nopper N, Craddock A, Law T, King A, Fanning G, Rivory L, Passioura T: Primary leukocyte screens for innate immune agonists. *J Biomol Screen* 2009, 14:723-730.
257. Speiser DE, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P: Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 2005, 115:739-746.
258. Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994, 12:141-179.
259. Carmody RJ, Maguschak K, Chen YH: A novel mechanism of nuclear factor-kappaB regulation by adenoviral protein 14.7K. *Immunology* 2006, 117:188-195.
260. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001, 413:732-738.
261. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, 408:740-745.
262. Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D: mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004, 279:12542-12550.
263. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001, 410:1099-1103.
264. Boehme KW, Guerrero M, Compton T: Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* 2006, 177:7094-7102.
265. Campa VM, Iglesias JM, Carcedo MT, Rodriguez R, Riera J, Ramos S, Lazo PS: Polyinosinic acid induces TNF and NO production as well as NF-kappaB and AP-1 transcriptional activation in the monocytemacrophage cell line RAW 264.7. *Inflamm Res* 2005, 54:328-337.
266. Morales O, Richard A, Martin N, Mrizak D, Senechal M, Miroux C, Pancre V, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P, de Launoit Y, Delhem N: Activation of a helper and not regulatory human CD4+ T cell response by oncolytic H-1 parvovirus. *PLoS One* 2012, 7:e32197.
267. Prestwich RJ, Harrington KJ, Pandha HS, Vile RG, Melcher AA, Errington F: Oncolytic viruses: a novel form of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008, 8:1581-1588.
268. Jenne L, Thumann P, Steinkasserer A: Interaction of large DNA viruses with dendritic cells. *Immunobiology* 2001, 204:639-648.
269. Liu TC, Thorne SH, Kirn DH: Oncolytic adenoviruses for cancer gene therapy. *Methods Mol Biol* 2008, 433:243-258.
270. Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M: Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther* 2006, 5:10-19.
271. Lacroix J, Leuchs B, Li J, Hristov G, Deubzer HE, Kulozik AE, Rommelaere J, Schlehofer JR, Witt O: Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2010, 127:1230-1239.
272. Dempe S, Stroh-Dege AY, Schwarz E, Rommelaere J, Dinsart C: SMAD4: a predictive marker of PDAC cell permissiveness for oncolytic infection with parvovirus H-1PV. *Int J Cancer* 2010, 126:2914-2927.
273. Alkassar M, Gartner B, Roemer K, Graesser F, Rommelaere J, Kaestner L, Haeckel I, Graf N: The combined effects of oncolytic reovirus plus Newcastle disease virus and reovirus plus parvovirus on U87 and U373 cells in vitro and in vivo. *J Neurooncol* 2011, 104:715-727.
274. Matijevic T, Pavelic J: Toll-like receptors: cost or benefit for cancer? *Curr Pharm Des* 2010, 16:1081-1090.

Danksagung

Ich danke Herrn [REDACTED] für die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, sowie die fachkundige Betreuung meiner Arbeit und das motivierende Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Herrn [REDACTED] danke ich für die Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Frau [REDACTED] danke ich für die fachkundige Beratung während meiner Doktorarbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre. Die Pausen mit Euch haben viel Spaß gemacht.

Ein großes Dankeschön geht an [REDACTED], die mir im Labor und auch Privat eine große Stütze war.

Meinen Freunden danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mich immer wieder aufgebaut haben.

Meiner ganzen Familie, vor allem der Marienborner und Bechtolsheimer Fraktion, danke ich für die Unterstützung in der Zeit!

Ein spezieller Dank geht an meine Schwester [REDACTED], für die immer wieder aufmunternden Worte und vielen kleinen Unterstützungen! Und natürlich für das Korrekturlesen der „kleinen“ Lektüre.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine Eltern. Danke für alles! Ihr seid einfach die Besten! Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen! Danke, dass ihr immer an mich glaubt!

Und mein ganz besonderer Dank geht an [REDACTED]. Danke für deine Geduld! Du hast mir während der ganzen Zeit immer zu Seite gestanden und mich immer wieder neu motiviert! Danke, dass ich mein Leben mit Dir teilen kann! Ich freue mich auf alles, was wir in Zukunft zusammen erleben werden!

Abbildungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des Parvoviridaestammbaums | 9 |
| Abbildung 2: Klassifikationskriterien der Viren | 10 |
| Abbildung 3: Das parvovirale Genom..... | 13 |
| Abbildung 4: Parvoviraler Lebenszyklus | 14 |
| Abbildung 6: Organe des Immunsystems | 23 |
| Abbildung 7: Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems..... | 27 |
| Abbildung 8: Die Säulen des Immunsystems..... | 28 |
| Abbildung 9: Aufnahme einer dendritischen Zelle bei Kontaktaufnahme mit einer T-Zelle..... | 30 |
| Abbildung 10: Interaktion dendritischer Zellen mit T-Zellen | 31 |
| Abbildung 11: Melanommodell..... | 32 |
| Abbildung 12: TLRs und ihre Liganden..... | 33 |
| Abbildung 13: TLR-Signalkaskade | 37 |
| Abbildung 14: TLR-Signalweg mit anschließender NFκB-Aktivierung | 39 |
| Abbildung 15: DNA-Leiter..... | 46 |
| Abbildung 16: Protein-Leiter..... | 46 |
| Abbildung 17: Prinzip des MTT-Assays | 54 |
| Abbildung 18: Kennzeichnung der Fraktionsschichten nach Zentrifugation | 55 |
| Abbildung 19: Calcium-Phosphat-Präzipitation | 59 |
| Abbildung 20: Schematische Darstellung des Luciferase-Assays | 61 |
| Abbildung 21: Schematische Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 64 |
| Abbildung 22: Schematische Darstellung der Reaktion einer reversen Transkriptase | 66 |
| Abbildung 23: Schematische Darstellung eines Western Blot nach dem Semi-Dry Verfahren..... | 69 |
| Abbildung 24: Prinzip der FACS-Analyse..... | 71 |
| Abbildung 25: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Methode | 73 |
| Abbildung 26: Agarosegelbilder nach Durchführung der unterschiedlichen TLR-PCRs | 76 |
| Abbildung 27: Restriktionsanalyse der TLR-transfizierten HEK293 Zellen | 78 |
| Abbildung 28: TLR-PCR zur Überprüfung der TLR-Expression..... | 79 |
| Abbildung 29: Viabilität H-1PV-infizierter transfizierter und wt HEK293 Zellen..... | 82 |
| Abbildung 30: Zellvitalität nach H-1PV-Infektion und TLR-Ligandenzugabe | 83 |
| Abbildung 31: Zellvitalität der TLR9-transfizierten HEK293 Zellen | 83 |
| Abbildung 32: Überprüfung der TLR-Expression durch entsprechende TLR-PCR..... | 85 |
| Abbildung 33: TLR-PCRs mit transfizierten HEK293, wt HEK293 und Positivkontrollzelllinien | 86 |
| Abbildung 34: TLR-PCRs mit wt HEK293, SK29Mel und Positivkontrollzelllinien | 87 |
| Abbildung 35: TLR9-Expression nach Stimulation mit dem TLR9-Liganden CpG..... | 88 |
| Abbildung 36: TLR2- und TLR4-PCR in transfizierten HEK293 Zellen | 88 |
| Abbildung 37: TLR3- und TLR9-PCR in transfizierten HEK293 Zellen | 89 |
| Abbildung 38: FACS-Analyse zum Nachweis der Expression von TLR3, TLR9 und TLR2 | 90 |
| Abbildung 39: FACS-Analyse der TLR-Expression wildtyp HEK293 Zellen | 91 |
| Abbildung 40: FACS-Analyse der TLR3- und TLR9-Expression in SK29Mel Zellen | 92 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 41: NFκB-Expression | 93 |
| Abbildung 42: NFκB-Translokation der TLR3- und TLR9-Transfektanten | 94 |
| Abbildung 43: NFκB-Translokation der TLR2- und TLR2/6-Transfektanten | 94 |
| Abbildung 44: NFκB-Expression der TLR3- und TLR9-Transfektanten | 96 |
| Abbildung 45: NFκB-Expression der wt HEK293 Zellen | 97 |
| Abbildung 46: NFκB-Aktivierung über TLR | 98 |
| Abbildung 47: IκB-Expression | 99 |
| Abbildung 48: CD86-Expression von mit TLR-Liganden stimulierten DCs | 101 |
| Abbildung 49: Expression des Oberflächenmoleküls CD86..... | 102 |
| Abbildung 50: TLR3- und TLR9-Expression in unterschiedlich behandelten DCs | 103 |
| Abbildung 51: TLR3- und TLR9-Expressionsanalyse | 105 |
| Abbildung 52: NFκB-Expressionsanalyse | 106 |
| Abbildung 53: TNF-α-Produktion unterschiedlich behandelter DCs | 107 |
| Abbildung 54: HMGB1-Expressionsanalyse | 108 |
| Abbildung 55: IκB | 117 |
| Abbildung 56: HMGB1-Signalgebung | 118 |
| Abbildung 57: Onkolytische Viren und deren Wirkung auf Tumorzellen | 125 |
| Abbildung 58: TLRs als Verbindungsstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität | 129 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 1: Tumor-Escape-Mechanismen: Mechanismen und Wirkung der einzelnen Zelltypen | 20 |
| Tabelle 2: Zytokine und deren Entstehung und Funktion..... | 21 |
| Tabelle 3: Unterschiede des angeborenen und des adaptiven Immunsystems..... | 26 |
| Tabelle 4: Charakteristika von unreifen und reifen dendritischen Zellen | 29 |
| Tabelle 5: Überblick über TLRs mit jeweiligen Liganden, Lokalisation und Vorkommen | 35 |
| Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zelllinien..... | 43 |
| Tabelle 7: TLR-Primer mit jeweiliger Bandengröße | 63 |
| Tabelle 8: Pipettier-Ansatz für eine TLR-PCR (beispielhaft für TLR3 und TLR9) | 65 |
| Tabelle 9: Pipettier-Ansatz für eine GAPDH-PCR..... | 65 |
| Tabelle 10: Pipettier-Ansatz für eine RT-PCR..... | 66 |
| Tabelle 11: Auflistung der benötigten Reagenzien und Mengen zum Herstellen eines SDS-Gels | 68 |
| Tabelle 12: Komponenten der TLR-PCR | 77 |
| Tabelle 13: Auflistung der TLR-Plasmide..... | 78 |
| Tabelle 14: TLR-Plasmide mit jeweiliger Basenpaargröße des TLR-Abschnittes..... | 79 |
| Tabelle 15: Onkolytische Viren und deren Effektivität..... | 110 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|
| A | Ampere |
| AAV | Adenovirus-assoziiertes Virus |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AK | Adenylatkinase |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATPase | ATP-spaltendes Enzym |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CC | Zytokincocktail (cytokine cocktail) |
| C° | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CpG-ODN | CpG-Oligodesoxynukleotide |
| CTL | Zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T-cells) |
| d | Tag(e) |
| Da | Dalton |
| DC | Dendritische Zelle/n |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DKFZ | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELAM | Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 |
| ELISA | Enzym-gekoppelter Immuno-assay (enzyme-linked immunosorbent assay) |
| FACS | Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell-sorting) |
| FCS | fetales Kälberserum (fetal calf serum) |
| FITC | Fluoreszein-Isothiozyanat (fluoresceinisothiocyanate) |
| g | Gramm; g-Zahl |
| h | Stunde(n) |
| HBSS | Hank's Balanced Salt Solution |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HCl | Salzsäure |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| HEPES | N-2-Hydroxymethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| hv | bei einer Reaktion freigesetztes Licht |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase) |
| HSV | Herpes Simplex Virus |
| IgG | Immunglobulin G |
| k | 10 ³ |
| kB | Basenpaare x 10 ³ |
| Konz. | Konzentration |
| l | Liter |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| luc | Luciferase-Gen |
| M | Mol (molare Masse) |
| m | Meter/ 10^{-3} |
| μ | 10^{-6} |
| MEM | Minimun Essential Medium |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| Min. | Minute(n) |
| Mind. | Mindestens |
| Mio. | 10^6 |
| MOI | Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection) |
| n | 10^{-9} |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| Na ₂ HPO ₄ | Natriumhydrogenphosphat |
| NaOH | Natronlauge |
| NS1/2 | Nichtstrukturproteine 1/2 |
| ORF | offener Leserahmen (open reading frame) |
| P4/38 | Promotor 4/38 |
| PAGE | Polyacrylamid- Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pfu | Plaque-bildende Einheiten (plaque forming units) |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| Poly(I:C) | Polyinosin-Polycytidyl-Säure |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | RNA-spaltendes Enzym |
| RLU | relative Lichteinheiten (relative light units) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde(n) / Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate) |
| SV40 | Simian Virus 40 |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TCL | Tumor-Zelllysate (tumor cell lysates) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin |
| TGF- β | Tumorstromungsfaktor- β (tumor growth factor- β) |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid |
| U | Unit (Einheit) / Umdrehungen |
| V | Volt |
| u.a. | und andere |
| VP1/2 | Verpackungsproteine 1/2 |
| wt | wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| Δ | Deletion |
| % | Prozentangabe |

Veröffentlichungen

Publikationen

Maike Sieben*, Kerstin Herzer*, Maja Zeidler, Vera Heinrichs, Barbara Leuchs, Martin Schuler, Jan J. Cornelis, Peter R. Galle, Jean Rommelaere, Markus Moehler

Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein

World J Gastroenterol 2008 June 28; 14(24): 3819-3828 PMID: 18609705

Markus Moehler*, Maike Sieben*, Susanne Roth, Franziska Springsguth, Barbara Leuchs, Maja Zeidler, Christiane Dinsart, Jean Rommelaere, Peter R Galle

Activation of the human immune system by chemotherapeutic or targeted agents combined with the oncolytic parvovirus H-1

BMC Cancer 2011 Oct 26;11:464 PMID: 22029859

Eingereichte Publikation:

Maike Sieben, Petra Schaefer, Christiane Dinsart, Peter R. Galle, Markus Moehler

Activation of the human immune system via Toll-like receptors by the oncolytic parvovirus H-1

Int J Cancer. 2012 April

Poster und Vorträge

XIth Parvovirus-Workshop 2006, Les Diablerets, Switzerland

Cell killing and gene transfer by parvovirus H-1 and derived vector in different human tumor cells that lack

Sieben M, Zeidler M, Schäfer P, Oren M, Schuler M, Cornelis JJ, Rommelaere J, Galle PR, Moehler M

DG-GT Deutsche Gesellschaft für Genterapie 13. Jahrestagung 2006, Düsseldorf

Cell killing and gene transfer by parvovirus H-1 and derived vector in different human tumor cells that lack

Sieben M, Zeidler M, Schäfer P, Oren M, Schuler M, Cornelis JJ, Rommelaere J, Galle PR, Moehler M

XIIth Parvovirus-Workshop 2008, Cordoba, Spain

Synergistic targeting and killing of human hepatocellular carcinoma cells lacking p53 by parvovirus H-1 with chemotherapeutic agents is dependent on functional PML

Sieben M, Herzer K, Zeidler M, Heinrichs V, Leuchs B, Schuler M, Cornelis JJ, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M

DG-GT Deutsche Gesellschaft für Genterapie 15. Jahrestagung 2008, Berlin

Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein

Sieben M, Zeidler M, Schäfer P, Oren M, Schuler M, Cornelis JJ, Rommelaere J, Galle PR, Moehler M

24. Jahrestagung der Gastroenterologische Arbeitsgemeinschaft Rheinland-Pfalz/Saarland (GARPS) 2009, Bad Kreuznach

Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein

Sieben M, Herzer K, Zeidler M, Heinrichs V, Leuchs B, Schuler M, Cornelis JJ, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M

EACR Special Conference on Inflammation and Cancer 2009, Berlin

Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein

Sieben M, Herzer K, Zeidler M, Heinrichs V, Leuchs B, Schuler M, Cornelis JJ, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M

29. Deutscher Krebskongress 2010, Berlin

Kombination von Chemotherapeutika mit Parvovirus H-1 zur Verstärkung der Immunantwort bei Tumorzellen

Sieben M, Zeidler M, Heinrichs V, Roth S, Leuchs B, Schuler M, Cornelis JJ, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M

XIIIth Parvovirus Workshop 2010, Helsinki, Finnland

Characterisation of parvovirus H-1-induced human immune activation via Toll-like receptors and parvovirus H-1 infection in combination with chemotherapeutic or targeted agents

Sieben M, Roth S, Springsguth F, Cornelis JJ, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M

9th Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy - CIMT 2011, Mainz

Activation of the human immune system via Toll-like receptors by the oncolytic parvovirus H-1 and its combination with chemotherapeutic or targeted agents

Sieben M, Roth S, Springsguth F, Dinsart C, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M

30. Deutscher Krebskongress 2012, Berlin

Aktivierung des humanen Immunsystems über Toll-like Rezeptoren durch das onkolytische Parvovirus H-1 und dessen Kombination mit Targeted Agents

Sieben M, Roth S, Springsguth F, Dinsart C, Galle PR, Rommelaere J, Moehler M

Perspectives in Cell- and Gene-Based Medicines, a joint Conference of the 18th Annual Meeting of the German Society for Gene Therapy (DG-GT) 2012, Frankfurt

Activation of the human immune system via Toll-like receptors by the oncolytic parvovirus H-1 and its combination with targeted agents

Sieben M, Roth S, Springsguth F, Schaefer P., Dinsart C, Galle PR, Moehler M

Preis:

Dagmar Eißner-Förderpreis für Nachwuchswissenschaftlerinnen 2009

„Killing of p53-deficient hepatoma cells by parvovirus H-1 and chemotherapeutics requires promyelocytic leukemia protein“

Teilnahme an:

Aktive Teilnahme am Graduiertenkolleg Mainz „Antigenspezifische Immuntherapie“ 2005-2007

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder an einem anderen Fachbereich als Dissertation, Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht.

Bischofsheim, Mai 2012