

Christine Richter

Aufklärung der
Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-A-
und CpG-C-Oligodesoxynukleotiden als
Grundlage für die Entwicklung
immunstimulatorischer Nanopartikel

Doktorarbeit / Dissertation

BEI GRIN MACHT SICH IHR WISSEN BEZAHLT



- Wir veröffentlichen Ihre Hausarbeit, Bachelor- und Masterarbeit
- Ihr eigenes eBook und Buch - weltweit in allen wichtigen Shops
- Verdienen Sie an jedem Verkauf

Jetzt bei www.GRIN.com hochladen
und kostenlos publizieren



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Impressum:

Copyright © 2006 GRIN Verlag
ISBN: 9783638858946

Dieses Buch bei GRIN:

<https://www.grin.com/document/82264>

Christine Richter

**Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von
CpG-A- und CpG-C-Oligodesoxynukleotiden als Grundlage
für die Entwicklung immunstimulatorischer Nanopartikel**

GRIN - Your knowledge has value

Der GRIN Verlag publiziert seit 1998 wissenschaftliche Arbeiten von Studenten, Hochschullehrern und anderen Akademikern als eBook und gedrucktes Buch. Die Verlagswebsite www.grin.com ist die ideale Plattform zur Veröffentlichung von Hausarbeiten, Abschlussarbeiten, wissenschaftlichen Aufsätzen, Dissertationen und Fachbüchern.

Besuchen Sie uns im Internet:

<http://www.grin.com/>

<http://www.facebook.com/grincom>

http://www.twitter.com/grin_com

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Medizinische Klinik Innenstadt
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-A- und
CpG-C-Oligodesoxynukleotiden als Grundlage für die
Entwicklung immunstimulatorischer Nanopartikel**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christine Richter

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

1	EINLEITUNG	8
1.1	Das humane Immunsystem	8
1.1.1	Die angeborene und die adaptive Immunität.....	8
1.1.2	<i>Toll-like</i> Rezeptoren - Erkennungssysteme der angeborenen Immunität.....	9
1.1.3	Typ-I Interferon - ein Effektor der angeborenen Immunität	13
1.1.4	Dendritische Zellen - Mittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität.....	14
1.1.5	B-Zellen - Effektorzellen der adaptiven Immunität.....	16
1.2	CpG-Oligodesoxynukleotide	17
1.2.1	Geschichtlicher Hintergrund: Von bakteriellen Lysaten zu synthetischer CpG-DNA	17
1.2.2	Wirkung und Wirkmechanismen von CpG-DNA.....	19
1.2.3	Definition von drei Klassen synthetischer CpG-ODN: CpG-A, CpG-B und CpG-C	21
1.2.4	Therapeutischer Einsatz von CpG-Oligodesoxynukleotiden	22
1.3	Ziele dieser Arbeit	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Geräte, Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.1	Geräte.....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3	Chemikalien.....	28
2.1.4	Reagenziensätze.....	28
2.1.5	Materialien für die Zellkultur	28
2.1.6	Zytokine	29
2.1.7	Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....	29
2.1.7.1	Medien und Puffer für die Zellkultur.....	29
2.1.7.2	Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese.....	29
2.1.8	Antikörper für die Durchflusszytometrische Analyse	30
2.2	Oligodesoxynukleotide	30
2.2.1	Zur Zellstimulation eingesetzte Sequenzen.....	30
2.2.2	Zur Gelelektrophorese eingesetzte Sequenzen	31
2.2.3	Temperatur-Präinkubation von ODN 2216	34
2.2.4	Temperatur-Präinkubation von ODN M362	34

2.3 Polyvalente Linker	35
2.3.1 Polyvalente Linker - CpG-DNA.....	35
2.3.2 Trivalente Linker - palindromische RNA.....	36
2.3.3 Poly-L-Arginine als Transfektionsreagenzien.....	36
2.3.3.1 Herstellung des ‚Master-Mixes‘ zur Transfektion.....	36
2.4 Zellulär – immunologische Methoden	37
2.4.1 Isolation der gewünschten Zellpopulation	37
2.4.1.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	37
2.4.1.2 Plasmazytoide dendritische Zellen	38
2.4.1.3 Gesamt B-Zellen (CD19 ⁺).....	39
2.4.2 Herstellung autologen Serums	39
2.4.3 Zellkultur	39
2.4.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	40
2.4.4.1 Grundprinzip der FACS-Analyse	40
2.4.4.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Reinheit von plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen	41
2.4.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	42
2.4.5.1 Zytokine	42
2.4.5.2 Proliferation (BrdU-ELISA)	42
2.5 Molekularbiologische Methoden	43
2.5.1 Gelelektrophorese	43
2.5.1.1 Prinzip der Gelelektrophorese	43
2.5.1.2 Prinzip der Detektion von Digoxigenin-markierten Oligodesoxynukleotiden	44
2.5.1.3 Prinzip der Detektion von DNA durch Ethidiumbromidfärbung.....	45
2.5.1.4 Durchführung der Gelelektrophorese	45
2.5.1.5 Blotting und Detektion Digoxigenin-markierter Oligodesoxynukleotide	45
2.5.1.6 Färbung mit Ethidiumbromid	46
2.5.1.7 Auswertung der Gelbilder	47
2.5.2 Partikelgrößenbestimmung durch Zetapotenzialmessung	47
2.5.2.1 Grundprinzip	47
2.5.2.2 Durchführung der Messung	48
2.6 Statistische Analyse	48
2.7 Software	48

3	ERGEBNISSE	49
3.1	Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von CpG-A und CpG-C	49
3.1.1	Untersuchung des Klasse A Oligodesoxynukleotids 2216	49
3.1.1.1	CpG-A bildet Nanopartikel im Größenbereich von Viren	49
3.1.1.2	Entwicklung der Temperatur-Präinkubationsmethode zur experimentellen Kontrolle der Multimerisierungen	50
3.1.1.3	Strukturelle Analyse: CpG-A multimerisiert im physiologischen Milieu	51
3.1.1.4	Identifizierung des zentralen Palindroms als notwendiges Element zum Aufbau größerer Partikel aus G-Tetraden	53
3.1.1.5	Identifizierung der Natriumionen als wichtiges stabilisierendes Element zum Aufbau der G-Tetraden.....	54
3.1.1.6	Große Partikel sind die Voraussetzung zur raschen Induktion hoher Mengen von Interferon-alpha in plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	55
3.1.1.7	Die Präinkubation von PDCs mit Interferon-beta verstärkt die Induktion von Interferon-alpha durch Einzelstränge	57
3.1.1.8	B-Zellen werden von kleinen Partikeln und Einzelsträngen des ODN 2216 nicht aktiviert.....	58
3.1.1.9	Strukturelle Analyse: Die Multimere öffnen ihre Bindungen bei pH < 6	59
3.1.2	Untersuchung des Klasse C Oligodesoxynukleotids M362	60
3.1.2.1	Strukturelle Analyse bei 4 °C: Die Stabilität der Duplices hängt von den anwesenden Natrium- oder Magnesiumionen ab	61
3.1.2.2	Strukturelle Analyse bei 37°C: Weder Duplices noch Hairpins sind im physiologischen Milieu stabil	62
3.1.2.3	Übertragung der Ergebnisse der strukturellen Analyse auf den Zellversuch	65
3.2	Design immunstimulatorischer Partikel unter Einsatz wirksamer Strukturelemente von CpG-A und CpG-C	66
3.2.1	Polyvalente Linker - palindromische CpG-DNA.....	66
3.2.1.1	Strukturelle Analyse.....	67
3.2.1.2	Starke Induktion von Interferon-alpha in PBMCs nach Transfektion mit Poly-L-Arginin	68
3.2.1.3	Screening verschieden langer Poly-L-Arginine als Transfektionsreagenzien	69

3.2.1.4	Poly-L-Arginin verbessert die endozytotische Aufnahme der Polyvalenten Linker	70
3.2.1.5	Untersuchung der CpG-Abhängigkeit des immunstimulatorischen Effektes.....	71
3.2.1.6	Wirkung der transfizierten Polyvalenten Linker auf plasmazytoide dendritische Zellen und B-Zellen	71
3.2.2	Trivalente Linker - palindromische RNA	73
3.2.2.1	Strukturelle Analyse: PVL-RNA multimerisieren zu definiert aufgebauten, großen Strukturen.....	74
3.2.2.2	Induktion von Interferon-alpha in PBMCs nach Transfektion mit Poly-L-Arginin	75
4	DISKUSSION	77
4.1	Methodendiskussion	77
4.1.1	Möglichkeiten und Grenzen der Gelelektrophorese zur Simulation physiologischen Milieus.....	77
4.1.2	Wahrscheinlichkeit von strukturellen Veränderungen der PVL-Partikel durch die Inkubation mit Poly-L-Arginin.....	77
4.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen von ODN 2216 (CpG-A)	80
4.2.1	Zusammenspiel aus Poly-Guanin-Sequenzen, Palindrom und monovalenten Kationen (Na^+/K^+) zur Strukturbildung im physiologischen Milieu	80
4.2.1.1	Bildung von G-Tetraden aus Poly-Guanin-Motiven	81
4.2.1.2	Multimerisierungen von G-Tetraden-Grundstrukturen zu größeren Partikeln mit Hilfe des zentralen Palindroms	81
4.2.1.3	Stabilisierung der G-Tetraden durch zentral eingelagerte monovalente Kationen (Na^+/K^+).....	82
4.2.2	Definierter Partikelbau trotz konzentrationsabhängiger Umlagerungen ..	83
4.2.3	Die Multimerisierung zu höhermolekularen Strukturen ist die Voraussetzung für die hohe Induktion von Interferon-alpha in plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	84
4.2.4	Erklärungsmodelle für die hohe Induktion von Interferon-alpha durch große 2216-Partikel	85
4.2.4.1	Aktivierung eines autokrinen <i>feedback-loops</i> für Interferon-alpha durch CpG-A.....	86
4.2.4.2	<i>Clustering</i> und <i>Crosslinking</i> von TLR 9	87
4.2.5	TLR 9-Bindung einzelsträngiger ODN 2216 während der endosomalen Azidifizierung	88

4.2.6 Interpretation der geringen B-Zell-Aktivierung durch CpG-A.....	88
4.3 Das Palindrom als zentrales Element in den Struktur-Wirkungsbeziehungen von ODN M362 (CpG-C)	89
4.3.1 Eigenschaften Palindrom-basierter Strukturen von ODN M362	89
4.3.2 Differenzielles Verhalten Palindrom-basierter Duplices im physiologischen Milieu: Aktivität trotz Strukturlabilität.....	91
4.3.3 Palindrom-basierte (Einzelstrang-) Effekte?.....	95
4.4 Design immunstimulatorischer Partikel unter Einsatz wirksamer Strukturelemente von CpG-A und CpG-C	96
4.4.1 Interpretation der strukturellen Analyse.....	97
4.4.2 Modelle der durch die palindromischen Nukleinsäuren ermöglichten Multimerisierungen trivalenter Linker.....	98
4.4.3 Differenzielles Aufnahmevermögen für große Partikel bei plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen	99
4.4.4 Verbesserte Aufnahme oder wirkungssteigernde Umlagerungen durch Poly-L-Arginin?	100
4.4.5 Palindromische RNA als partikelaufbauendes Element	101
4.5 Ausblick	101
4.5.1 G-Tetraden-basierter Strukturaufbau immunstimulatorischer Partikel	102
4.5.2 Palindrom-basierter Strukturaufbau immunstimulatorischer Partikel.....	103
5 ZUSAMMENFASSUNG	105
6 LITERATURVERZEICHNIS	108
Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	116
Veröffentlichungen	118
Danksagung	119

1 EINLEITUNG

1.1 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem (lateinisch: *immunis* = frei, unberührt) ist ein komplexes System aus Zellen, Molekülen und Mechanismen, dessen Hauptaufgabe darin besteht, den Körper vor Infektionen durch fremde Substanzen und Organismen, aber auch vor entarteten eigenen Zellen z. B. Tumoren zu schützen. Dieser Unterscheidung zwischen ‚selbst‘ und ‚fremd‘, wie auch ‚harmlos‘ und ‚gefährlich‘, folgen die direkte Bekämpfung der Krankheitserreger und der Aufbau eines wirkungsvollen Schutzsystems gegen das erneute Eindringen des Pathogens.

1.1.1 Die angeborene und die adaptive Immunität

Der Ablauf dieser Immunantwort kann grundsätzlich über zwei unterschiedlich aufgebaute immunologische Effektorsysteme erfolgen: 1) die angeborene (unspezifische) und 2) die adaptive (spezifische) Immunität. Die angeborene Immunität ist bereits auf der Entwicklungsstufe der Eukaryoten entstanden und dient der initialen Abwehr von Krankheitserregern. Sie kann diese jedoch nicht spezifisch erkennen und daher auch keinen Schutz gegen eine erneute Infektion (ein immunologisches Gedächtnis) entwickeln. Der Erkennungsprozess der angeborenen Immunität erfolgt über Rezeptoren, die in der sog. Keimbahn kodiert sind, wodurch ihre Spezifität genetisch festgelegt ist. Dies ist von großem Vorteil, weil gerade diese Rezeptoren, deren Spezifität sich unter dem Selektionsdruck der Evolution herausgebildet hat, nun von Generation zu Generation weiter gegeben werden. Sie werden *pattern recognition receptors* (PRRs) genannt und erkennen evolutiv hoch-konservierte Strukturen, die viele Mikroorganismen gemeinsam haben. Diese Strukturen werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet und sind nicht im Wirtsorganismus zu finden. Sie sind jedoch essentiell für das Überleben der Erreger oder manchmal deren Pathogenitätsdeterminanten.

Eine erste Barrierefunktion gegen extrazelluläre Erreger erfüllen die Epithelien, welche die inneren und äußeren Oberflächen des Körpers bedecken, die Opsonisierung durch Komplementaktivierung sowie die Erkennung und Beseitigung der Mikroorganismen durch Makrophagen. Bei intrazellulären Erregern gestaltet sich die Abwehr schwieriger. Eine wichtige Rolle spielen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die die befallenen Zellen erkennen und vernichten, und Interferone (IFN) - Zytokine, die den Körper in eine Art