

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck
Direktor: PD Dr. med. Siegfried Görg
vertreten in der
Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
durch das Institut für Virologie und Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz

TLR9 abhängige IFN- α Aktivierung durch apoptotische
DNA *in vivo*: Bedeutung für die Entstehung des
Systemischen Lupus Erythematoses bei
Komplementdefizienz

INAUGURALDISSERTATION ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

vorgelegt von
Katharina Randers
aus Lübeck

Lübeck 2009

1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz

2. Berichtstatter: PD Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2009

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 13.07.2009

INHALTSVERZEICHNIS

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1	EINLEITUNG.....	11
1.1.	Das Immunsystem und die Balance zwischen Toleranz und Abwehr	12
1.1.1.	Angeborene und adaptive Mechanismen des Immunsystems	12
1.1.2.	Mechanismen der Toleranz	14
1.1.2.1.	Toleranzentwicklung der B-Zellen.....	15
1.1.2.2.	Apoptose.....	16
1.1.3.	Angeborene Mechanismen zur Erkennung von Fremd und Eigen	17
1.1.3.1.	Das Komplementsystem	17
1.1.3.2.	Toll like Rezeptoren	19
1.2.	Systemischer Lupus Erythematodes	22
1.2.1.	Komplement und SLE.....	23
1.2.2.	IFN- α und SLE.....	25
1.2.3.	Immunogenität körpereigener Nukleinsäuren.....	27
1.2.4.	Hypothese und Arbeitsprogramm.....	28
1.3.	Zielsetzung.....	30
2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	Material.....	32
2.1.1.	Mäuse.....	32
2.1.2.	Geräte.....	32
2.1.3.	Labormaterial.....	33
2.1.4.	Zellkulturmedien und Zusätze	34
2.1.5.	Reagenzien	34
2.1.6.	Antikörper	36
2.1.7.	Primer und Sonden.....	36
2.1.7.1.	Primersequenzen (TIB Molbiol, Berlin)	36
2.1.7.2.	Sondensequenzen (ABI Applied Biosystems, Weiterstadt)	36
2.1.7.3.	Sonden/Primer-Kits (ABI Applied Biosystems, Weiterstadt)	36
2.1.8.	Lösungen und Kits.....	37

2.1.9.	Substrate	37
2.1.10.	Zelllinien	37
2.1.10.1.	WEHI-231	37
2.1.10.2.	HEp2-Zellen.....	37
2.2.	Methoden	38
2.2.1.	Materialgewinnung	38
2.2.1.1.	Intravenöse und intraperitoneale Immunisierung von Mäusen	38
2.2.1.2.	Blutentnahme und Serumgewinnung.....	38
2.2.1.3.	Isolierung von DNA (aus Zellkultur, Gewebe und Serum)	38
2.2.1.4.	Gewinnung apoptotischer und US-fragmentierter DNA.....	38
2.2.1.5.	DNA/RNA-Bestimmung am Spektralphotometer	38
2.2.2.	Herstellung von Gewebeschnitten	39
2.2.2.1.	Beschichtung von Objektträgern.....	39
2.2.2.2.	Fixierung von Gewebeschnitten.....	39
2.2.3.	Nachweis von endogener DNA	39
2.2.3.1.	Nachweis von Serum-DNA mittels GAPDH-PCR	39
2.2.3.2.	Nachweis von Serum-DNA mittels Gelelektrophorese	40
2.2.4.	Nachweis von apoptotischer DNA	41
2.2.4.1.	Durchflusszytometrie-TUNEL	41
2.2.4.2.	Gelelektrophorese.....	42
2.2.4.3.	Immunfluoreszenz.....	42
2.2.4.3.1	TUNEL/CD11b+ Färbung	42
2.2.4.3.2	PicoGreen-Färbung	43
2.2.5.	Immuneffekte von DNA	44
2.2.5.1.	Isolierung von mononukleären Zellen aus der Milz.....	44
2.2.5.2.	Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen	45
2.2.5.3.	Reinheitsmessung am Durchflusszytometer.....	46
2.2.5.4.	Isolierung von RNA	46
2.2.5.5.	DNA-Verdau.....	46
2.2.5.6.	PCR und Real-time RT-PCR	47
2.2.5.7.	Relative Quantifizierung.....	51
2.2.5.8.	Vergleichende C _T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode).....	51
2.2.6.	Nachweis von Autoantikörpern	51
2.2.6.1.	Maus anti-dsDNA-Antikörper ELISA.....	51
2.2.6.2.	HEp2/ANA-Test	52
3	ERGEBNISSE.....	53

3.1. Untersuchung zum Komplementmangel bedingten Abräumdefekt endogener apoptotischer DNA auf die Induktion von IFN-α	53
3.1.1. Nachweis von endogener apoptotischer DNA im Serum	53
3.1.2. Deposition von apoptotischer DNA an der marginalen Zone der Milz	57
3.1.3. Induktion von Lupus-assoziierten Zytokinen durch DNA.....	59
3.1.3.1. Kontrolle der Apoptoserate von PBS-induzierter Apoptose bei WEHI-231 Zellen im Durchflussfluoreszenzzytometer	59
3.1.3.2. Elektrophoretische Darstellung der Fragmentierung von DNA von WEHI-231 Zellen durch Apoptose oder Ultraschall	60
3.1.3.3. Reinheitskontrolle der CD11b+ Zellfraktion	61
3.1.3.4. Expression der mRNA von IFN- α , IL-6, IL-12 und IRF-7 in CD11b+ Zellen der Milz nach <i>in vivo</i> Applikation von DNA	62
3.1.4. Untersuchung zur Induzierbarkeit von Autoantikörpern durch apoptotische DNA.....	73
3.2. Untersuchung zum Mechanismus der IFN-α Induktion durch apoptotische DNA <i>in vivo</i>	78
3.2.1. Die Bedeutung des TLR9-Rezeptors für die durch apoptotische DNA vermittelte IFN- α Induktion	78
3.2.2. Der Einfluss von apoptotischer DNA auf die Expression des TLR9 ...	81
3.2.3. Der Einfluss von IFN- α bei Komplementdefizienz auf die TLR9 mRNA-Expression.....	84
3.2.4. Untersuchung zur Interferenz des IFN- α Induktionsmechanismus	89
4 DISKUSSION	95
4.1. Untersuchung zum Komplementmangel bedingten Abräumdefekt endogener apoptotischer DNA auf die Induktion von IFN-α	96
4.1.1. Nachweis von endogener apoptotischer DNA im Serum	96
4.1.2. Deposition von apoptotischer DNA in der marginalen Zone der Milz .	98
4.1.3. Die Immunogenität apoptotischer DNA	99
4.1.3.1. Der Einfluss apoptotischer DNA auf IL-6, IL-12 und IRF-7	99
4.1.3.2. Apoptotische DNA induziert die Aktivierung von IFN- α	102
4.1.4. Die Induktion Lupus-spezifischer Autoantikörper durch apoptotische DNA	104
4.2. Untersuchung zum Mechanismus der IFN-α Induktion durch apoptotische DNA <i>in vivo</i>	107

4.2.1.	Die Bedeutung des TLR9-Rezeptors für die durch apoptotische DNA vermittelte IFN- α Induktion	107
4.2.2.	Der Einfluss von apoptotischer DNA auf die Expression von Toll like Rezeptoren	110
4.2.3.	Der Einfluss der Komplement C4-Defizienz auf die TLR9 mRNA-Expression	111
4.2.4.	Untersuchung zur Interferenz des IFN- α Induktionsmechanismus durch Chloroquin	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
II	REFERENZEN	117
III	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	156
IV	DANKSAGUNG	159

I Abkürzungsverzeichnis

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>Antigen-Presenting Cell</i>)
ANA	Antikörper gegen nukleäre Antigene
Ak	Antikörper
BE	Blutentnahme
bio	Biotin
bp	Basenpaare
C	Komplementkomponente
CD	Differenzierungsantigene (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD11b+	CD11b-positiv
CD11b-	CD11b-negativ
CMV	Cytomegalie-Virus
CpG-DNA	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin reiche DNA
CR	Komplementrezeptor (<i>Complement Receptor</i>)
CRP	C-reaktives Protein
C4-/-	C4-defizient (Mäuse)
C4-/-IFNAR-/-	C4-und IFN- α/β Rezeptordefizient (Mäuse)
DC	dendritische Zellen (<i>Dendritic cells</i>)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dsDNA	Doppelstrang-DNA (<i>double stranded DNA</i>)
dsRNA	Doppelstrang-RNA
ssDNA	Einzelstrang-DNA (<i>single stranded DNA</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ENA	Extrahierbare Nukleäre Antigene
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FDC	Follikulär dendritische Zellen (<i>Follicular Dendritic Cell</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>Human Leucocyte Antigen</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
IC	Immunkomplex (<i>Immune Complex</i>)
IFN	Interferone

IFN- α	Interferon-alpha
IFN- α/β Rezeptor	Interferon-alpha/beta Rezeptor
IFNAR-/-	Interferon- α/β Rezeptordefizient (Mäuse)
Ig	Immunglobulin (z.B. Immunglobulin G oder M)
IgM anti-dsDNA Ak	IgM-Antikörper gegen dsDNA
IL	Interleukine
i.p.	Intraperitoneal
IRF7	Interferon-regulierender Faktor 7 (<i>Interferon Regulatory Factor 7</i>)
i.v.	intravenös
LTA	Lipoteichonsäuren (<i>Lipoteichon Acid</i>)
Lprlpr	Lupus-Modell Mausstamm (Lymphoproliferationsmutation)
LPS	Lipopolysaccharide
mDC	Myelozytäre dendritische Zellen (<i>myeloid Dendritic Cell</i>)
MAC	Membranangriffskomplex (<i>Membrane Attack Complex</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MBL	Mannanbindendes Lektin
MM	Mastermix
mRNA	messenger RNA
MxA	Gen, das Myxovirus-Protein A kodiert
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88
MZ	Marginalzone
MZ B-Zellen	Marginalzonen B-Zellen
MZ Makrophagen	Marginalzonen Makrophagen
NF κ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIPC	Natürliche Interferonproduzierende Zellen (<i>Natural Interferon-producing cells</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NZB/NZW	<i>New Zealand Black/New Zealand White</i> (Mausmodell für
SLE)	
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pDC	Plasmazytoide dendritischen Zellen (<i>plasmacytoid Dendritic Cell</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd

PG	Peptidoglykane
Poly (I:C)	Immunstimulans (<i>polyinosinic polycytidylic acid</i>)
PM-1	extrahierbares nukleäres Polymyositis-Antigen
PRRs	<i>PAMPs Recognition Receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SAP	Serum Amyloid P Komponente
Sm	Nicht-Histon-Protein (<i>Smith Antigen</i>)
snRNPs	<i>small nuclear Ribonucleoproteins</i>
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i>
TIR-Domäne	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
TLR	Toll like Rezeptoren
TNP	2,4,6-Trinitrophenyl
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP Nick End Labeling</i>
U/min	Umdrehung pro Minute
US	Ultraschall
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

Der SLE ist eine systemische Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie aus der Gruppe der Kollagenosen mit chronisch-rheumatischem Verlauf. Charakteristisch ist der Verlust der B-Zell Toleranz, der zu einer Generierung von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) und doppelsträngige DNA (dsDNA) führt, deren Nachweis das wichtigste diagnostische Merkmal darstellt. Immunkomplexe, die solche Autoantikörper enthalten, lagern sich im Bindegewebe von Haut und Gefäßen verschiedener Organe ab, wodurch chronische Entzündungen der Organe und konsekutive Arthritiden entstehen können. Auf genetischer Ebene beobachtet man eine Assoziation von SLE mit einer Defizienz von Faktoren des klassischen Komplementaktivierungsweges (C1q, C4 und C2), die sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell zu beobachten ist, wobei die Schwere der Erkrankung von der Position des betreffenden Faktors in der Komplementkaskade abhängig zu sein scheint. Sowohl eine ungenügende B-Zellregulation bei Komplementmangel als auch eine reduzierte Clearance apoptotischer Zellen, welche zu einer Akkumulation autoreaktiver Antigene führt, werden zur Zeit als Erklärungsmodelle diskutiert. Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher noch nicht vollständig geklärt. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Komplementmangel und eine Aktivierung des Interferonsystems vom Typ I ursächlich miteinander zusammenhängen. Insbesondere während akuter Krankheitsschübe konnte bei SLE-Patienten erhöhte Spiegel von FN- α im Serum nachgewiesen werden.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem Verlust der Toleranz am Beispiel von SLE im Mausmodell. In diesem Rahmen soll die Rolle von Komplementmangel, unter dem Aspekt der verminderten Clearance apoptotischer DNA, für die Aktivierung des IFN- α Systems geklärt werden. Im Zentrum der Untersuchungen steht dabei die TLR9-vermittelte Signaltransduktion als möglicher IFN- α Aktivierungsmechanismus und die Möglichkeit der Inhibierung desselben.

1.1. Das Immunsystem und die Balance zwischen Toleranz und Abwehr

Das Immunsystems eines Organismus' hat die Aufgabe, schädliche Einflüsse der belebten Umwelt von außen in Gestalt von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten, abzuwehren. Es spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Gewährleistung der Toleranz des körpereigenen Gewebes. Es überwacht körpereigene Veränderungen und sorgt für den Erhalt der zellulären Funktionen durch Eliminierung von alten oder mutierten Zellen.

Seine Abwehr basiert auf zwei Verteidigungslinien. Eine erste unspezifische Abwehr, die innerhalb von Minuten reagiert wird durch das angeborene Immunsystem gebildet. Das adaptive Immunsystem dagegen hat zwar eine Reaktionszeit von mehreren Tagen, ist dafür aber so spezifisch, dass es Unterschiede von Pathogenen molekulargenau erkennt und diese dann gezielt und effektiv bekämpft. Es besitzt ausserdem die Fähigkeit zum Gedächtnis, so dass bei einem späteren Kontakt mit demselben Erreger eine spezifische Immunantwort mit erhöhter Reaktivität erfolgt.

Abhängig von den Effektormechanismen, derer sich die angeborene oder die adaptive Immunantwort bedienen, kann die Abwehr auf einer zellulären oder einer humoralen (lat. *humor*, Flüssigkeit) Ebene stattfinden.

Das Immunsystem ist jedoch störanfällig. Angeborene oder spontane Mutationen oder Infektionen können einen weitreichenden Einfluss auf den Ablauf der Immunantwort haben, bis hin zu einem Versagen der Abwehr oder der Toleranz. Eine beeinträchtigte Regulation kann in einer unzureichenden Immunantwort resultieren (z.B. Tumorentstehung, AIDS) oder in der überschüssigen Reaktion auf harmlose exogene Faktoren (Allergie) oder auf körpereigene Strukturen (Autoimmunität).

1.1.1. Angeborene und adaptive Mechanismen des Immunsystems

Die angeborene Immunantwort ist evolutionsgeschichtlich gesehen die ältere Form der Immunabwehr komplexer Organismen. Hat ein Pathogen die natürlichen Barrieren, die anatomischer, physiologischer oder mikrobieller Art sein können, überwunden, stellt sie die erste unspezifische Verteidigung auf zellulärer und/oder auf humoraler Ebene dar. Jedoch erlauben die Komponenten der angeborenen Immunantwort eine Unterscheidung verschiedener Pathogengruppen, so dass die Reaktion aus gruppenspezifischen Effektormechanismen zusammengesetzt ist.

Zu den humoralen Faktoren gehört das Komplementsystem, welches aus Serumproteinen mit proteolytischer Aktivität besteht, die Pathogene zerstören, eine

Einleitung

Entzündungsreaktion herbeiführen oder mittels Oponisierung die Erkennung und Aufnahme durch Phagozyten vermitteln. Das Komplementsystem spielt mit der Bildung von Peptidmediatoren, welche Chemokine für inflammatorische Zellen sind, eine zentrale Rolle in der antibakteriellen Immunabwehr¹. Es ist auch Bestandteil des adaptiven Immunsystems und fungiert somit als Bindeglied und Transmitter beider Abwehrsysteme.

Für die zelluläre Abwehr steht dem Immunsystem eine Reihe von Zellen zur Verfügung, die in den Blutgefäßen und Lymphbahnen zirkulieren oder in bestimmten Kompartimenten residieren. Dies sind Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DZ), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten.

Phagozytierende Zellen nehmen körperfremde Partikel und Erreger auf, prozessieren sie und können zusätzlich als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) fungieren und die adaptive Immunantwort aktivieren. Makrophagen sind hierfür ein Beispiel, sie differenzieren sich aus Monozyten, die nach Verlassen der Blutbahn ins Gewebe eingewandert sind.

Natürliche Killerzellen dagegen töten Zellen, die kein MHC-Klasse I Molekül auf der Oberfläche tragen. Dabei handelt es sich um einen Proteinkomplex, der sich auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers befindet, bei virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen jedoch herunterreguliert wird. Bei der Kontrolle solcher Zellen erhält die schon per se aktive Killerzelle kein inhibitorisches Signal und löst die Lyse durch Freisetzung von zytotoxischen Granula aus. Die Granula der Granulozyten enthalten abhängig von der Zellsubpopulation unterschiedliche Effektormoleküle und vermitteln somit vielfältige Immunantworten. Granula, die Integrine enthalten vermitteln Chemotaxis oder Adhärenz. Bakteriostatisch wirkende Granula enthalten Lysozym oder Laktoferrin. Zytotoxizität wird durch Proteasen und Defensine erreicht. Die Effektormechanismen werden verstärkt durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Interleukinen, die weitere Immunzellen rekrutieren und aktivieren.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren konstitutiv Rezeptoren, die spezifische und konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs) erkennen. Ein Beispiel von PAMPs-erkennenden Rezeptoren ist die Familie der Toll-like Rezeptoren, von denen bisher ca. 11 bekannt sind und die unspezifisch Strukturen u.a. wie LPS (TLR 4), CpG-DNA (TLR 9) und dsRNA (TLR 3) erkennen². Das Zusammenspiel dieser zellulären und humoralen Faktoren ist so effektiv, dass das angeborene Immunsystem die meisten Infektionen unter Kontrolle bringen kann.

Die adaptive Immunantwort entwickelte sich phylogenetisch nach der angeborenen Immunantwort als Anpassung des Organismus an widerstandsfähige oder mutierte Erreger. Im Gegensatz zur wenig spezifischen angeborenen Immunantwort agiert die erworbene Immunantwort sehr spezifisch mit einer zeitlichen Verzögerung von 7-8 Tagen. Seine zellulären Komponenten sind antigenpräsentierende dendritische Zellen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Letztere ermöglichen eine Reaktion auf eine fast unbegrenzte Anzahl möglicher Antigene, da jeder Lymphozyt einen monospezifischen Antigen-Rezeptor exprimiert. Nach der Pathogenerkennung gewährleistet die klonale Expansion eine höchst effiziente Immunabwehr. B-Lymphozyten produzieren Antikörper, mit denen sie das Antigen für Phagozyten markieren (Opsonisierung) und die Aktivierung des Komplementsystems initiieren können. T-Lymphozyten vermitteln die zelluläre Abwehr mittels Zytotoxizität und unterstützen die humorale Immunantwort der B-Lymphozyten.

Beide Systeme, das angeborene und das adaptive Immunsystem, werden mittlerweile nicht mehr getrennt voneinander betrachtet. Das Komplementsystem und die TLR können funktionell als verbindende Elemente zweier Abwehrsysteme angesehen werden, die sich gegenseitig beeinflussen und unterstützen.

1.1.2. Mechanismen der Toleranz

Das Immunsystem muss tolerant gegenüber körpereigenen Antigenen sein, denn potentiell wären B-Zellen in der Lage, Antikörper gegen Selbst-Antigene zu bilden. Dies wird verhindert durch verschiedene Toleranzmechanismen, die im folgenden erläutert werden:

Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen wird schon bei der Entstehung von T-Zellen und B-Zellen angelegt. Bei der Reifung der Lymphozyten im Knochenmark (B-Zellen) und im Thymus (T-Zellen) entstehen auch solche, die funktionelle Rezeptoren mit einer Spezifität für Selbst-Antigene exprimieren. Diese werden hinsichtlich ihrer potentiellen Autoreaktivität selektiert und nur im negativen Falle in die Peripherie entlassen. Auch in der Peripherie kann noch ein Selektionsprozess stattfinden, der für die Eliminierung autoreaktiver Zellen sorgt. Dennoch versagt in einigen Fällen die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und das Immunsystem wird autoreaktiv. Ein umfassenderes Verständnis der zellulären und molekularen Abläufe, die allgemein an der Entstehung von Autoimmunität und speziell an der jeweiligen Autoimmunerkrankung beteiligt sind, könnten neue Therapie-Optionen bieten, die bisher begrenzt sind und oft nur Symptome behandeln.

1.1.2.1. Toleranzentwicklung der B-Zellen

Das adaptive Immunsystem benötigt ein großes Repertoire an B-Zellen mit hoch diverser Spezifität ihrer Antigenrezeptoren, um auf die hohe Anzahl an möglichen Fremdanitigenen reagieren zu können. Bei einer adaptiven Immunantwort dient der Immunglobulinrezeptor dann als Vorlage für die klonale Selektion.

Die hohe Diversität der Spezifität der Oberflächenimmunglobuline entsteht bei der Zusammensetzung ihrer variablen Regionen während der B-Zellreifung im Knochenmark. Für die Bildung des Rezeptors werden die Gene der leichten und schweren Immunglobulinketten für jede B-Zelle durch somatische Rekombination verschiedener Gensegmente in der Keimbahn neu gebildet. Damit ergeben sich sehr viele Kombinationsmöglichkeiten für den anschließenden Zusammenbau der leichten und schweren Ketten zu einem Rezeptor. Zuerst werden die Gene für die schwere Kette des B-Zellrezeptors rekombiniert. Die Aktivierung der Zelle durch die Bindung eines unbekanntes Liganden auf den Stromazellen stoppt ein weiteres Gen-Arrangement für schwere Ketten auf dem anderen Chromosom, sodass von einer Zelle nur ein Gen von einem der beiden elterlichen Allele exprimiert wird (Allelische Exklusion). Damit wird die Monospezifität der B-Zelle gewährleistet. Nach dem anschließenden Proliferationszyklus beginnt die Umordnung der Gene für die leichte Kette. Mit der Expression eines kompletten IgM-Moleküls ist die Entwicklung zu einer unreifen B-Zelle abgeschlossen.

Dabei können auch Rezeptoren mit einer Spezifität für Autoantigene entstehen. Diese werden im Knochenmark aussortiert. Das Knochenmark vermittelt die zentrale Toleranzinduktion³, indem es für B-Zellen ein molekulares Milieu aus Autoantigenen darstellt. B-Zellen, die dort ein Antigen binden, werden eliminiert oder inaktiviert^{4:5}. Es gibt drei antigeninduzierte Mechanismen, die dafür sorgen, dass nur selbst-tolerante B-Zellen in die Peripherie gelangen. Die klonale Deletion beschreibt die Eliminierung autoreaktiver Zellen, deren Rezeptoren durch die Bindung an multivalente membranständige Selbst-Antigene auf den Stromazellen kreuzvernetzt werden (z.B. MHC-Moleküle), mittels Apoptose. Die Anergie dagegen ist ein Zustand verminderter Lebensdauer und reduzierter Aktivierbarkeit der Zelle, der nach der Erkennung von löslichen, nicht Rezeptoren kreuzvernetzenden, Selbst-Antigenen induziert wird⁶. Das Rezeptor-Editing schließlich ist ein Mechanismus, bei dem die Gensegmente der leichten Ketten umgeordnet werden, so dass der Rezeptor eine andere Antigenpezifität erhält⁷.

Autoreaktive B-Zellen können der zentralen Toleranzinduktion entgehen oder im Rahmen einer Immunantwort, während der Proliferation in den Keimzentren durch somatische Hypermutation, entstehen^{6:8:9}. Diese können auch in der Peripherie noch

selektiert werden. Die Erkennung eines löslichen Selbst-Antigens oder eines Antigens ohne zusätzliche Kostimulation durch T-Helferzellen^{10;11} oder Follikulär-Dendritische Zellen^{12;13} führt zur Anergie und zum Ausschluss aus dem Lymphfollikel (follikuläre Exklusion). Autoreaktive B-Zellen werden aber auch durch Induktion von Apoptose durch Stimulation des Todesrezeptors Fas (CD95) durch cytotoxische T-Zellen eliminiert¹⁴⁻¹⁷. Ein beliebtes Mausmodell für Autoimmunität weist eine Mutation im Fas-Gen (lpr Mutation)¹⁸ auf, welche zu einer intensiven Lymphoproliferation führt und mit der Generierung von Antikörpern gegen doppelsträngige DNA (dsDNA), dem klinischen Phänotyp des SLE sehr ähnlich ist.

Obwohl die Toleranz gegen Selbst auf zentraler und peripherer Ebene sichergestellt wird, kommt es dennoch dazu, dass autoreaktive Zellen in die Peripherie gelangen, dort überleben und aktiviert werden können und letztendlich Autoimmunerkrankungen initiieren.

1.1.2.2. Apoptose

Die Apoptose ist ein programmierter, kontrolliert ablaufender, Zelltod. Sie ist ein wichtiger physiologischer Prozess zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase eines Organismus'. Sie spielt schon bei der Embryogenese eine Rolle, bei der sie unter anderem dafür sorgt, dass sich aus einer paddelförmigen Handanlage Finger ausbilden oder dass Zellen mit DNA-Schäden an ihrer Teilung gehindert werden. Später hält sie die zellulären Homöostase aufrecht, sorgt für einen physiologischen Ablauf der Immunantwort, eliminiert Zellen mit DNA-Schäden und ist ein wichtiger Mechanismus der Toleranzinduktion von B- und T-Zellen.

Die Apoptose ist, im Gegensatz zu einer anderen Form des Zelltodes, der durch Bakterien oder Sauerstoffmangel induzierten, passiv ablaufenden Nekrose, ein programmatisch ablaufendes, durch die Zelle kontrolliert durchgeführtes Absterben. Anders als bei der Nekrose sorgt ein spezielles antiinflammatorisches Zytokinmilieu dafür, dass es nicht zu einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes kommt. Apoptose kann in der Zelle auf zweierlei Arten induziert werden. Auf dem intrinsischen Weg, initiiert durch z.B. Nährstoffmangel, UV-Strahlung oder einer T-Zell-unabhängigen Stimulation des Antigenrezeptors, wird ein Zusammenbruch des transmembranen Potentials der Mitochondrienmembran induziert, die zu einer Freisetzung von Cytochrom C führt. Auf dem extrinsischen Weg werden z.B. die Fas-Rezeptoren, die Todesdomänen enthalten, durch Ligandenbindung kreuzvernetzt. Beide Wege münden in der kaskadenartigen Aktivierung von proteolytischen Enzymen (Caspasen), die das Schrumpfen der Zelle und die Degradierung des Chromatins steuern. Die DNA wird durch Endonukleasen fragmentiert, die im Bereich der Linker-

DNA zwischen zwei Nukleosomen schneiden, so dass Mono- und Oligonukleosomen unterschiedlicher Länge entstehen. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt bei der Apoptose die Plasmamembran erhalten, erfährt jedoch Strukturveränderungen. So wird z.B. Phosphatidylserin (PS), welches normalerweise im Inneren der Plasmamembran lokalisiert ist, auf der Oberfläche der Membran exprimiert. Zytoplasma und Zellorganellen gelangen also nicht in den Extrazellulärraum sondern werden nach dem programmatischen Ablauf der Apoptose zusammen mit den DNA-Fragmenten in Vesikel (apoptotic blebs) verpackt und aus der Zelle geschleust. Diese apoptotischen Körperchen werden anschliessend von professionellen Phagozyten, wie Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen, beseitigt, ohne dass eine inflammatorische Immunantwort ausgelöst wird. Ein charakteristisches Merkmal der anti-inflammatorischen Clearance ist die Erkennung von sogenannten „eat me“-Signalen, die exklusiv von apoptotischen Zellen exprimiert werden, wie unter anderem durch PS¹⁹.

Trotz des kontrollierten Ablaufs der Apoptose und der sicheren Beseitigung ihrer Abbauprodukte können apoptotische Zellen jedoch auch eine potentielle Quelle für Selbst-Antigene sein. So werden seit einiger Zeit Defekte in der nicht-inflammatorischen Beseitigung (Clearance) von apoptotischen Körperchen für die Entstehung von SLE diskutiert²⁰.

1.1.3. Angeborene Mechanismen zur Erkennung von Fremd und Eigen

1.1.3.1. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus ca. 30 verschiedenen, im Plasma gelöst oder zellgebunden vorliegenden Proteinen, die durch proteolytische Spaltung in einer Kaskade aktiviert werden^{21;22}.

Bisher sind drei Wege der Komplementaktivierung bekannt, der klassische Reaktionsweg, der alternative Reaktionsweg und der Lektin-Reaktionsweg. Jeder Weg mündet in der Bildung der Protease C3-Konvertase, deren zentrale Bedeutung in der Spaltung der Komplementkomponente C3 liegt und deren Spaltprodukte unterschiedliche Effektormechanismen vermitteln.

Der klassische Weg ist ein später Aktivierungsweg, der erst während der adaptiven Immunantwort beschritten wird. Die Aktivierung wird ausgelöst durch die Bindung von Komplement an Immunkomplexe aus Antigenen und Antikörper (IgM und IgG). Dabei bindet die erste Komponente C1, ein Proteinkomplex (C1q, C1s und C1r), mit dem globulären C1q an die Fc-Domänen von mindestens zwei an ein Antigen gebundenen Antikörpern. Dies verhindert eine Bindung von löslich vorkommenden

Immunglobulinen. Dies initiiert die enzymatische Aktivität von C1r, welches C1s schneidet, so dass eine aktive Serinprotease entsteht. Diese spaltet die Komplementfaktoren C4 und C2, deren große Spaltprodukte zusammen die C3-Konvertase bilden.

Der alternative und der Lektin-Reaktionsweg bilden oft die erste Verteidigung gegen die meisten Pathogene. Während beim Lektin-Reaktionsweg die C3-Konvertase durch Bindung des Akut-Phase-Protein Mannan-bindendes Lektin (MBL) an Polysaccharide auf der Oberfläche von Bakterien entsteht (Mannose, N-Acetyl-Glucosamin), kommt es beim alternativen Weg zu einer spontanen Spaltung von C3. Der weitere Ablauf entspricht dem des klassischen Weges, wobei grosse Mengen an C3b die Pathogenoberfläche opsonisieren. Der terminale Weg aller drei Wege mündet in der Entstehung eines lytischen Membranangriffskomplexes (MAC), der sich den terminalen Komplementfaktoren zusammengesetzt ist.

Die kleinen Spaltprodukte des alternativen und des klassischen Reaktionsweges bewirken zudem als Anaphylatoxine Bronchokonstriktion, Chemotaxis inflammatorischer Zellen und eine Erhöhung der Vasopermeabilität¹.

Das Komplementsystem übernimmt mit der Erkennung von körpereigenen Proteinen auch Funktionen in der Regulation²³ und Aktivierung von B-Zellen. So spielen die Komplementrezeptoren CR1 und CR2 (CD35/CD21) eine wichtige Rolle in der Regulation der antikörperproduzierenden B-Zellen²⁴, indem eine Kostimulation des B-Zell Rezeptors durch Bindung der in den Immunkomplexen integrierten Komplementspaltprodukte C3d und C4d ausgelöst wird. Defekte des klassischen Komplementaktivierungswegs oder ein Mangel an Komplementfaktoren führen einerseits zu einer beeinträchtigten humoralen Immunantwort mit einer verminderten Antikörperproduktion^{23;24}, andererseits scheint damit eine erhöhte Präsenz von Autoantikörpern, wie beim Systemischen Lupus Erythematoses zu beobachten, assoziiert zu sein.

Eine weitere Funktion liegt in der Clearance von zirkulierenden Immunkomplexen und apoptotischen Körperchen. Pentraxine wie CRP (C-reaktives Protein) oder die murine Variante SAP (Serum Amyloid P Komponente) verhindern eine Präzipitierung von Immunkomplexen im Gewebe und vermitteln ausserdem ein antiinflammatorisches Zytokinmilieu^{25;26}. Für C1q wurde eine direkte Ablagerung auf den sogenannten „Oberflächen-blebs“ der apoptotischen Zellen nachgewiesen²⁷, welche eine Makropinozytose über die Interaktion mit Calraticulin und CD91 auf Phagozyten vermittelt²⁸.

Bei einer mangelhaften Clearance werden Immunkomplexe z.B. in der Niere abgelagert, was eine glomeruläre Nephritis aufgrund einer chronischen Komplementaktivierung zur Folge haben kann.

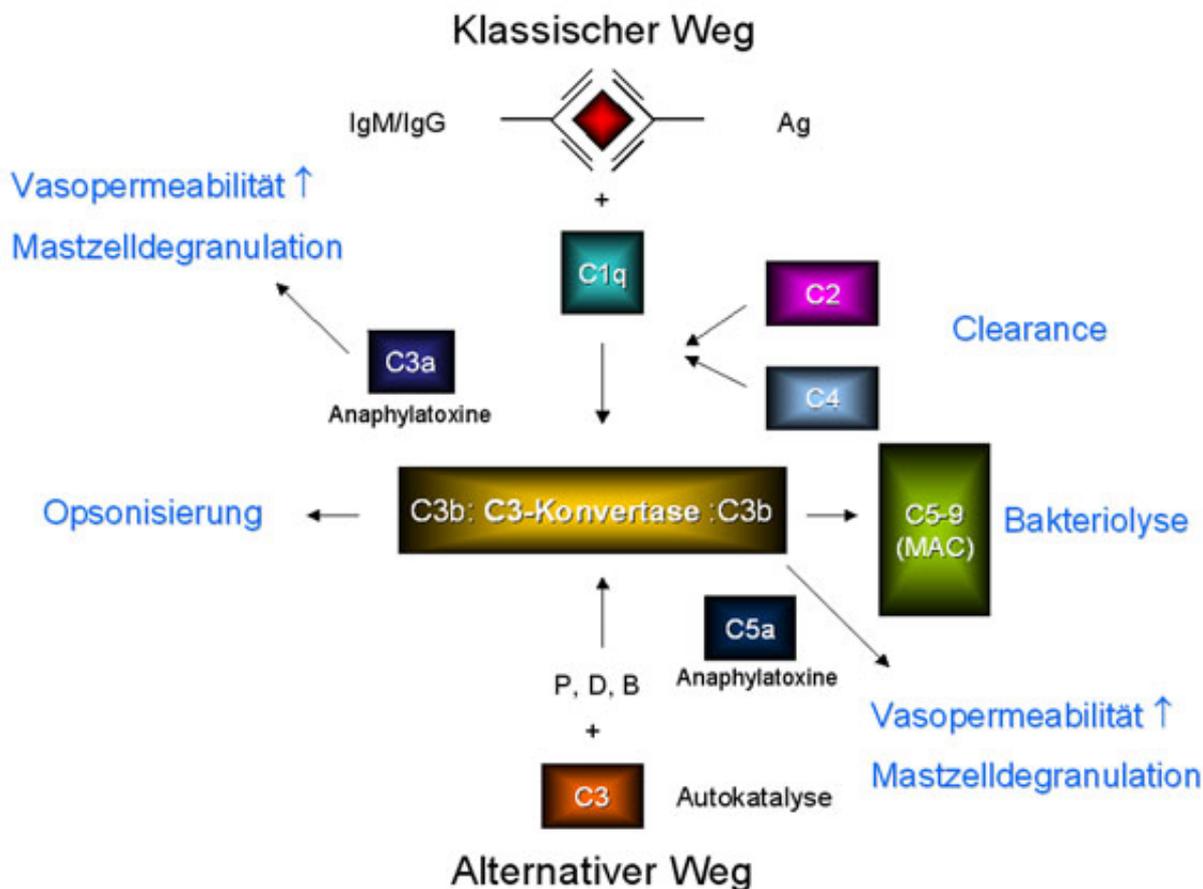


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des Komplementsystems

1.1.3.2. Toll like Rezeptoren

Die Erkennung von Pathogenen stellt hohe Anforderungen an das angeborene Immunsystem, da diese eine sehr heterogene Gruppe mit hoher Mutationsrate darstellen. Deshalb hat sich die angeborene Abwehr darauf spezialisiert, bestimmte, in der Evolution hochkonservierte Strukturen zu erkennen. Zu diesen pathogen-assoziierten molekularen Mustern, PAMPs, (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) gehören Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA, *Lipoteichon acid*), Mannane, Glycane, doppelsträngige RNA und bakterielle DNA. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die solche Strukturen erkennen werden als mustererkennende Rezeptoren, *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), zusammengefasst. Sie werden auf verschiedenen Zellen exprimiert, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, so dass ein Pathogen von mehreren Zellen

gleichzeitig erkannt werden kann und vielfältige zelluläre Abwehrmechanismen hervorruft²⁹.

Eine Gruppe innerhalb dieser PRRs stellt die Familie der Toll like Rezeptoren (TLR) dar. Sie verdanken ihren Namen der Homologie zu dem bei *Drosophila Melanogaster* entdeckten Protein *Toll*³⁰, welches dort der Rezeptor für die dorso-ventrale Ausrichtung in der Embryogenese ist³¹ und die Produktion von antifungalen Peptiden der angeborenen Immunantwort induziert.

Bisher wurden 11 humane und 12 verschiedene murine Rezeptoren identifiziert, die PAMPS wie LPS (TLR 4), CpG-DNA (TLR 9) und dsRNA (TLR 3) erkennen³². Einige werden auf der Zelloberfläche exprimiert (TLR2, 4, 5), während andere in endosomalen Kompartimenten vorliegen (TLR3, 7, 8, 9)³³. Die Zugehörigkeit zu einer Rezeptorfamilie ist durch einen ähnlichen Rezeptoraufbau begründet, mit einer leucin-reichen ligandenbindenden und einer signaltransduzierenden Domäne (TIR-Domäne, *Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne*), welche Sequenzhomologien zum Interleukin-1 Rezeptor (IL-1 R) aufweist. Die Folge einer Signalweiterleitung ist die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und IRFs (Interferon-response elements) und damit die Induktion der Genexpression verschiedener Immunresponsogene. Molekular führt die Bindung des entsprechenden Liganden zu einer Dimerisierung zweier Rezeptoren. Intrazellulär werden rezeptorassoziierte Adapterproteine rekrutiert, die eine TIR-Domäne enthalten (*Toll/IL-1-Rezeptor*). Ein Adapterprotein, das in fast allen TLRs für die Signaltransduktion verantwortlich ist (außer TLR3), ist der myeloide Differenzierungs-Faktor 88 (MyD88). Die Interaktion des TLR mit den Adapterproteinen lässt eine Kaskade der Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK-Kinasen) ablaufen, die letztendlich in der Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern mündet³⁴. Je nach Zelltyp resultiert dies in der Expression proinflammatorischer Zytokine, kostimulatorischer Moleküle und Interferone, der Bildung von Stickstoffmonoxid, der Proliferation von B-Zellen oder der Reifung zu APZ, die die T-zellvermittelte Immunantwort einleiten. Die verschiedenen Zelltypen exprimieren verschiedene TLRs und können so auf unterschiedliche Signale z.B. mit der Produktion von IFN- α reagieren^{35;36}. Somit schlagen TLRs eine Brücke zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem.

Die zellulären Expressionsprofile von Mensch und Maus sind unterschiedlich. So werden in dendritischen Zellen der Maus fast alle TLRs von sämtlichen Subpopulationen exprimiert, mit Ausnahme von TLR3, der sich nur in mDCs befindet. Im humanen System dagegen exprimieren pDCs nur TLR7 und TLR9 und mDCs alle TLRs ausser TLR9. z.B. humane pDCs nur TLR7 und TLR9, wobei letzterer nicht in

Einleitung

mDCs vorkommt. In der Maus dagegen werden fast alle TLRs (auch TLR9) von sämtlichen DC-Subpopulationen exprimiert,

Als Rezeptor für CpG-DNA wurde TLR9 identifiziert, nachdem CpG-DNA in TLR9-defizienten Mäusen weder eine inflammatorische Immunantwort noch Antikörper gegen dsDNA induzierte³⁷⁻³⁹. TLR9 wird intrazellulär in pDCs, Makrophagen und B-Zellen im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert, im Gegensatz zu TLRs, die bakterielle und virale PAMPs, welche in Vertebraten nicht vorkommen, erkennen. Die Rekrutierung in Lysosomen erfolgt erst, wenn die Zelle mit CpG-DNA stimuliert wurde^{40,41}. Die intrazelluläre Lokalisation in endosomalen Kompartimenten haben TLR3, TLR7 und TLR9, die alle Nukleinsäuren viralen oder bakteriellen Ursprungs erkennen, miteinander gemein. Somit muss CpG-DNA zuerst internalisiert werden, z.B. durch Clathrin-vermittelte Endozytose⁴², um die Zelle zu stimulieren. Die intrazelluläre Expression dieser Rezeptoren stellt einen zusätzlichen Schutz vor einer nicht vorgesehenen Stimulierung durch eigene DNA oder RNA dar.

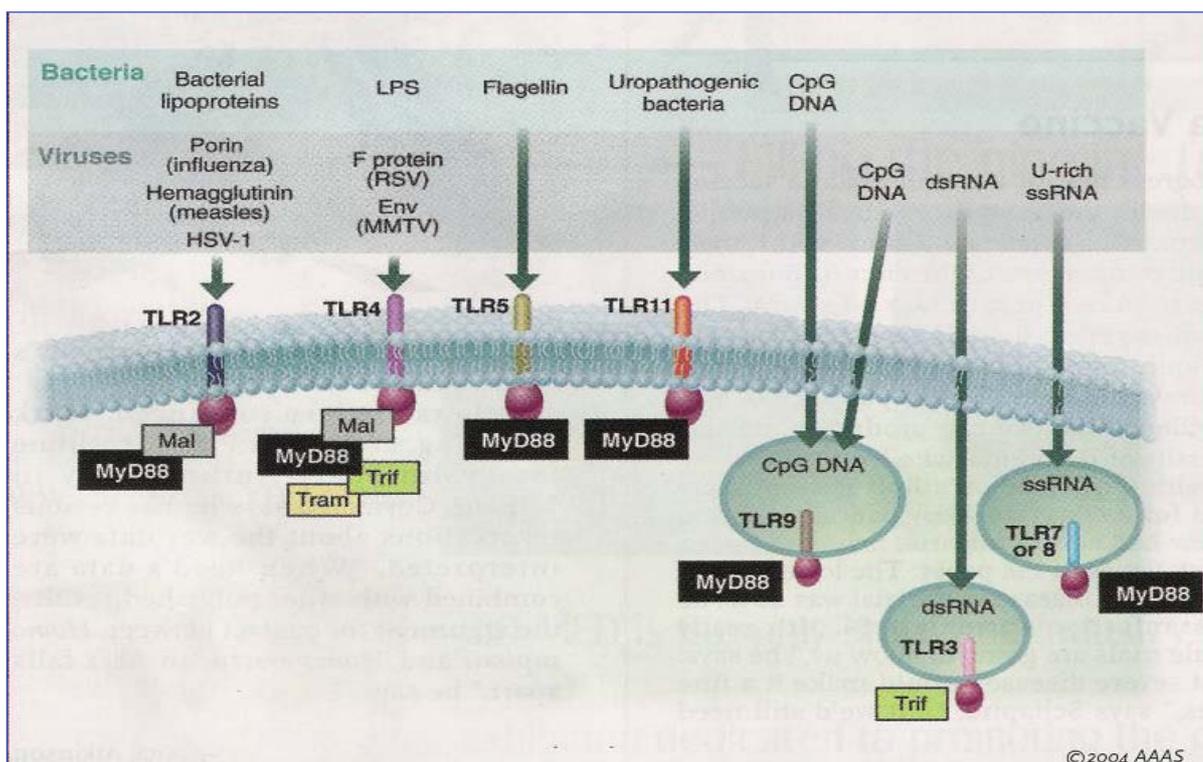


Abb. 2: Übersicht der wichtigsten Toll-like Rezeptoren.

Schematische Darstellung der Spezifität, der Lokalisation und des Aktivierungsweges der wichtigsten TLRs. Insgesamt wurden bisher 11 humane und 12 murine Rezeptoren identifiziert. (Quelle: O'Neill¹⁵)

1.2. Systemischer Lupus Erythematoses

Der Systemische Lupus Erythematoses ist eine chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung multifaktorieller Genese, die klinisch kein homogenes Krankheitsbild aufweist, sondern ein sehr breites Spektrum an möglichen Manifestationen entwickelt. Sie wird zu den Kollagenosen gezählt, wobei unterschiedliche Organe betroffen sein können. Die häufigsten Symptome sind Polyarthritis, Dermatitis, Nephritis, Karditis, Pleuritis und polymorphe Exantheme, wobei diese individuell variieren und abhängig sind von Dauer und Schweregrad der Erkrankung und jeweiliger Immundysfunktion⁴³.

Die Diagnose des SLE orientiert sich an den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR)⁴⁴. Ein charakteristisches Kriterium ist der Nachweis von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA), besonders gegen doppelsträngige DNA (dsDNA). Es können aber auch Antikörper gegen zytoplasmatische Antigene, Komplementkomponenten (C1q⁴⁵, CRP bzw SAP), Phospholipide oder Blutzellen vorkommen⁴⁶.

ANA lassen sich in 95% der Patienten nachweisen und fassen die verschiedenen, gegen Zellkernantigene gerichteten spezifischen Autoantikörper, die vorkommen können, zusammen. Dazu gehören neben Antikörpern gegen dsDNA, Antikörper gegen Einzelstrang-DNA (ssDNA), Histone (H1-H4) und Nicht-Histon-Proteine (Sm, snRNP, Determinanten Ro und La).

Ein weiteres Kriterium ist die Ablagerung von Immunkomplexen, bestehend aus Autoantikörpern und dem komplementären Antigen, im Bindegewebe der Haut und der Gefäße verschiedener Organe. Über die Aktivierung des klassischen Komplementweges wird so eine chronische Entzündungsreaktion ausgelöst. Der Krankheitsverlauf ist im folgenden gekennzeichnet durch akute Schübe entzündlicher Aktivität, in denen Komplementfaktoren stark erniedrigt und Interferon- α Spiegel sehr hoch sind. Die Diagnose SLE gilt als gesichert, wenn mehrere Kriterien erfüllt sind.

Die Entstehung des SLE ist geprägt durch eine genetische Prädisposition, wobei eine Erkrankung durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener genetischer und exogener Faktoren (z.B. Umwelt) ausgelöst wird und diese das klinische Erscheinungsbild beeinflussen. Prädisponierende Faktoren scheinen das weibliche Geschlecht in einem gebärfähigen Alter (75% der Erkrankten)⁴⁷, die Zugehörigkeit zu einer ethnischen Gruppe mit afrikanischem oder hispanischen Hintergrund⁴⁸ und einige genotypische Besonderheiten zu sein. Dies sind die Defizienz von Komplementkomponenten des frühen klassischen Aktivierungswegs, die Defizienz von Fc-Rezeptoren (z.B. Fc γ RIII) und bestimmte Haplotypen des

Haupthistokompatibilitätskomplexes MHC (*Major Histocompatibility Complex*) wie z.B. HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DRB und HLA-DQB)⁴⁹⁻⁵¹. Zu den exogenen Faktoren zählen UV-Strahlung⁵², die bei 20% der Betroffenen für einen diskoiden Lupus verantwortlich zu sein scheint und organische Verbindungen (z.B. Procainamid, Chlorpromazid), die zu einem reversiblen SLE führen. Es stehen auch einige Viren im Verdacht, die Entstehung von SLE zu triggern, wie z.B. das Cytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder das Parvovirus B19⁵³.

1.2.1. Komplement und SLE

Eine Assoziation des Komplementsystems mit dem SLE wurde erstmals gezeigt, als entdeckt wurde, dass Komplementspiegel im Serum von SLE-Patienten erniedrigt sind. Ausserdem wurden Ablagerungen von Immunkomplexen, bestehend aus Komplement und Autoantikörpern, in Glomeruli von Patienten mit renaler Beteiligung gefunden, welches die erniedrigten Serumspiegel auf Grund eines erhöhten Verbrauchs von Komplementfaktoren erklären könnte.

Die Assoziation von Komplementdefizienz auf genetischer Ebene und der Entstehung von SLE erscheint paradox, da akute Schübe der Erkrankung von Komplementaktivierung durch abgelagerte Immunkomplexe im Gewebe gekennzeichnet sind. Demnach sollte ein unvollständiges Komplementsystem, bezogen auf den chronischen inflammatorischen Verlauf des SLE, eine protektive Wirkung haben. Ganz im Gegenteil jedoch scheinen Defekte der frühen Faktoren des klassischen Komplementaktivierungsweges (C1, C2, C4) sowohl beim Menschen⁵⁴ als auch in tierexperimentellen Studien⁵⁵ prädisponierend für SLE zu sein. Es scheint eine Abhängigkeit der Prävalenz, des Phänotyps sowie der Schwere der Erkrankung von der Position des defizienten Faktors in der Komplementkaskade zu bestehen (C1>C4>C2). Defizienzen des Komplementfaktors C1 oder eines seiner Untereinheiten (C1q)⁵⁶⁻⁵⁸, und des Komplementfaktors C4^{59;60} sind mit der höchsten Prävalenz (>80%) und mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert. C2-Defizienz ist bereits in signifikant geringerem Maße mit SLE vergesellschaftet und verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch. Ein C3-Defekt scheint weder in Mäusen noch im Menschen eine Rolle bei der Entstehung von SLE zuzukommen⁶¹. Wie bedeutsam Komplementdefekte in C1 oder C4 für die Entstehung von SLE sind, zeigt sich außerdem darin, dass bei C1 Mangel geschlechtsbezogene Faktoren keine Rolle spielen und Frauen und Männer gleichermaßen erkranken (1:1). C2-Defizienz dagegen ist deutlich mehr bei Frauen als bei Männern mit der Entstehung von SLE verbunden (7:1), vergleichbar mit der Komplementdefizienz unabhängigen geschlechtsbezogenen Häufigkeit von SLE^{62;63}.

Beim Menschen kann SLE auch mit einem partiellen C4-Mangel assoziiert sein. Das C4-Protein existiert in zwei Isoformen, C4A und C4B, deren beide Gene einen breitgefächerten Polymorphismus aufweisen, welcher eine Rolle bei der Entstehung des SLE spielen könnte^{62;64;65}. Verschiedene unabhängige Studien haben gezeigt, dass zwischen SLE und Null-Allelen im C4A Gen, nicht aber im C4B Gen ein Zusammenhang zu existieren scheint^{66;67}. Lokalisiert sind beide Gene hintereinander innerhalb des MHC, weshalb sie auch als MHC-Klasse-III-Gene bezeichnet werden. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu HLA-Genen, werden Defekte von C4 zusammen mit bestimmten HLA-Typen vererbt (s. 1.2.).

Die wichtigsten Erkenntnisse über den Zusammenhang von Komplementdefizienz und Autoimmunität wurden in zahlreichen Studien in verschiedenen Tiermodellen gewonnen. Zum Beispiel sind in der Maus die Effekte einer Komplementdefizienz auch abhängig vom genetischen Hintergrund, was darauf hindeutet, dass der Phänotyp der Erkrankung von zusätzlichen Genen beeinflusst wird⁶⁸. Ob dies in dem Maße auch für den Menschen gilt, ist bisher noch nicht hinreichend untersucht, wird aber tendenziell vermutet.

Zwei Hypothesen werden diskutiert, den Zusammenhang zwischen Komplementdefizienz und der Entstehung des SLE zu erklären. Die eine berücksichtigt die Bedeutung von Komplement bei der Regulierung der Entwicklung, Aktivierung und Toleranz der B-Zellen. Demnach würde das Ausbleiben von regulatorischen Signalen durch aktivierte Komplementfragmente in B-Zellen zu einem Versagen der Aufrechterhaltung von peripherer Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen führen. In zwei unabhängigen Toleranzmodellen konnte gezeigt werden, dass sowohl der Mangel an C4 als auch eine Defizienz der Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR2 (CD21) einen Einfluss auf die Toleranzinduktion haben⁶⁹ und eine gestörte Kostimulation von CD21/CD35 auf B-Zellen die Entwicklung von Autoimmunphänomenen begünstigt. Im Gegensatz zu Mäusen mit Defizienz für C1q oder C4 zeigen CD21/CD35-defiziente Mäuse jedoch keine spontane Autoimmunerkrankung⁷⁰.

Die andere Hypothese beruht auf der Rolle von Komplement bei der Clearance von Immunkomplexen und apoptotischen Körperchen und vermutet somit bei Komplementdefekten eine ungenügende Clearance als Initiator des Toleranzverlustes. In tierexperimentellen Studien wurden intraperitoneal (i.p.) applizierte apoptotische Körperchen weniger gut phagozytiert, wenn C1q⁷¹ oder C4⁷² fehlte. Darüberhinaus wurde beobachtet, dass Makrophagen von SLE-Patienten *in vitro* eine verminderte Phagozytose von apoptotischen Zellen in Anwesenheit von autologem Serum aufweisen. Für Apoptose-induzierende Substanzen, wie z.B. dem Hydrocarbonöl Pristane, wurde jedoch auch in nicht-autoimmunen Mäusen die Entstehung einer

Autoimmunität gezeigt. Pristane wird im Rahmen der Herstellung monoklonaler Antikörper in der Bauchhöhle von Mäusen eingesetzt. Es führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die die Ansammlung von Ascites mit monoklonalen Antikörpern verstärken soll. Pristane führt jedoch auch zur Induktion von Apoptose peritonealer Zellen⁷³ und zur Entstehung einer mit der Lupus-Nephritis vergleichbaren Erkrankung und der Generierung von Lupus-assoziierten Antikörpern⁷⁴. Apoptotische Körperchen könnten somit eine Quelle für Lupus-typische Autoantigene sein, zumal eine Vielzahl der betreffenden Autoantigene bei SLE in oder auf deren Oberfläche zu finden sind^{75;76}. Da die Komplement vermittelte Phagozytose jedoch zumindest teilweise auch C3b benötigt, der Mangel an C3 allerdings nicht mit einem SLE assoziiert ist, scheinen beide Erklärungsmodelle nicht hinreichend, die Assoziation von Komplementmangel und SLE zu erklären⁷⁷.

1.2.2. IFN- α und SLE

Die Interferone sind molekularbiologisch eine Familie miteinander verwandter Proteine, die als Typ I und Typ II Interferone zusammengefasst werden. Die größte Gruppe sind die Typ I Interferone, die einen gemeinsamen Typ I Interferonrezeptor (IFNAR) binden. Die einzelnen, hochgradig homologen Proteine werden von einem Gencluster aus 13 verschiedenen Genen für IFN- α und von einzelnen Genen für IFN- β , IFN- κ , IFN- ω und IFN- τ auf dem Chromosom 9 (Maus Chromosom 4) codiert und besitzen spezifische Aktivitätsprofile⁷⁸. Zu den Typ II Interferonen zählt nur das IFN- γ , welches einen eigenen Rezeptor bindet. Die Induktion von Typ I Interferonen wurde ursprünglich als Reaktion auf eine Infektion mit dsRNA-Viren beschrieben. Mittlerweile sind aber noch weitere Induktoren wie Endotoxine von Bakterien und Protozoen, synthetische dsRNA-Analoga wie Poly (I:C) oder CpG-DNA⁷⁹⁻⁸¹ bekannt. Typ I Interferone führen über die Aktivierung einer Ribonuklease und über Phosphorylierungen von Replikationsproteinen zu einer Hemmung der Proteinsynthese des Pathogens. Neben der antiviralen Wirkung induziert es als Zytokin die Genexpression von Interferon-stimulierten Genen, die die Reifung von Monozyten zu professionellen Antigen präsentierenden Zellen initiieren und forciert eine T-Zellantwort. IFN- α aktiviert Dendritische Zellen, die direkt T-Zell-unabhängig einen Immunglobulinklassenwechsel in B-Zellen induzieren können^{82;83}. Zudem wird vermutet, dass IFN- α direkten Einfluss auf B-Zellen nimmt, indem es den Schwellenwert für die B-Zell Aktivierung herabsetzt^{84;85}. So fördert es die Differenzierung und das Überleben von B-Zellen in der Peripherie und übt einen verstärkenden Effekt auf B-Zellrezeptor abhängige Immunantworten aus.

Die meisten Zellen können mit kleinen Mengen IFN- α auf verschiedene RNA-Viren reagieren. Bestimmte Zellen, wie die dendritischen Zellen, können in den lymphatischen Geweben auf einen Stimulus mit einer sehr hohen IFN- α -Produktion zur Hemmung der Virusreplikation reagieren und werden deshalb auch als natürliche Interferon-produzierende Zellen (NIPC) bezeichnet. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Anzahl zirkulierender NIPCs in Patienten mit SLE um bis zu 70% vermindert ist im Vergleich mit Gesunden⁸⁶. In Abwesenheit eines viralen Stimulus scheint bei diesen eine verstärkte Einwanderung dieser Zellen aus der Zirkulation heraus in die Gewebe zu bestehen⁸⁷. So wurde z.B. bei diskoiden SLE-Formen eine erhöhte Anzahl von Interferon- α produzierenden Zellen in der Haut beschrieben⁸⁸. NIPCs sind beim Menschen v.a. vom Typ der unreifen plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC), während in der Maus sowohl pDCs als auch myelozytäre dendritische Zellen (mDCs) in Frage kommen^{89;90}. MDCs sind in großer Zahl in der marginalen Zone der sekundären lymphatischen Organe lokalisiert.

Ein Indiz dafür, dass IFN- α eine Rolle bei SLE spielt, war die Beobachtung, dass sich bei Lupus-Patienten erhöhte IFN- α -Spiegel im Serum messen lassen und dass die Aktivität und Schwere der Erkrankung mit den gemessenen IFN- α -Werten korrelieren⁹¹⁻⁹⁵. Die Expression des interferoninduzierten Proteins MxA in Leukozyten wurde als erhöht beschrieben bei SLE, selbst wenn im Serum keine erhöhten Spiegel an IFN- α messbar waren⁹⁶. Neuere Genexpressionsstudien haben gezeigt, dass die meisten Lupus-Patienten ein charakteristisches Profil Interferon-regulierter Gene aufweisen^{97;98}. Zu diesen Erkenntnissen passt, dass die therapeutische Gabe von IFN- α bei chronischen Infektionen oder malignen Erkrankungen oftmals als Nebeneffekt zur Entstehung von Lupus-ähnlichen Symptomen führte⁹⁹, die sich in einigen Fällen in einer Autoimmunerkrankung manifestierte (19%)¹⁰⁰. In 22% der Fälle kam es zur Generierung von Antikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) und in 8% aller Patienten konnten Antikörper gegen dsDNA nachgewiesen werden¹⁰¹.

Eine pathologische Rolle für IFN- α wurde auch mit anderen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Für die therapeutische Gabe von IFN- α ist auch die Induktion von perniziöser Anämie, autoimmuner Thyroiditis, Myasthenia Gravis, autoimmuner Hepatitis, insulinabhängigem Diabetes Mellitus, rheumatoider Arthritis, Polymyositis oder Vaskulitis beschrieben worden, ohne dass die Gründe für solch ein breites Spektrum an Autoimmunerkrankungen bekannt sind^{102;103}. Das Vorhandensein von Autoantikörpern vor einer IFN- α Therapie scheint das Risiko einer Erkrankung zu erhöhen und die Art der Autoimmunität zu beeinflussen. Dies war das Ergebnis einer

Studie mit Patienten mit anti-thyreoidalen Antikörpern, in der fast 70% im Laufe der Therapie eine autoimmune Thyreoiditis entwickelten¹⁰⁴.

Eine Aktivierung des Typ I Interferonsystems wie bei bestehendem SLE lässt sich noch bei anderen Autoimmunerkrankungen beobachten. So lassen sich bei Insulinpflichtigem Diabetes Mellitus erhöhte IFN- α -Spiegel im Serum und eine erhöhte Expression in den Langerhansschen Inseln des Pankreas nachweisen, welche im Mausmodell bereits vor der charakteristischen Zerstörung von β -Zellen gefunden wurden^{105;106}. Somit deutet vieles auf eine Schlüsselposition von IFN- α für den Verlust von Toleranz und für die Entstehung von Autoimmunität hin. Welche Rolle IFN- α für die Entstehung von SLE spielt und der genaue Mechanismus, der dieser Entwicklung zugrunde liegt, sind bisher noch nicht vollständig geklärt.

1.2.3. Immunogenität körpereigener Nukleinsäuren

Ursprünglich galt DNA generell als nicht immunogen, bis gezeigt wurde, dass DNA doch in Abhängigkeit von der Spezies unterschiedlich stark immunologisch aktiv sein kann. Nukleinsäurereiche Fraktionen eines Mycobakteriums zeigten sich in vitro als Induktoren einer verstärkten Aktivität natürlicher Killerzellen und einer Sezernierung von Typ I und II Interferonen. DNA schien dabei die essentielle Komponente zu sein, da sich die immunologische Aktivität der Fraktionen als DNase-sensitiv erwies¹⁰⁷. Während Vertebraten-DNA nicht immunstimulatorisch wirkte¹⁰⁸, wurden für bakterielle DNA verschiedene immunstimulatorische Effekte gezeigt. Sie induziert die Aktivierung von B-Zellen und Sezernierung von Immunglobulinen und stimuliert Makrophagen und DCs zur Sezernierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-12. Mittels synthetischer sequenzspezifischer Oligodesoxynukleotide (ODNs) wurden letztlich Motive mit unmethylierten Cytosin-Guanin-Dinukleotidpaaren (CpG) als die biologisch aktiven Sequenzen identifiziert¹⁰⁹, welche gehäuft in bakterieller DNA auftreten. Bei Säugetier-DNA dagegen sind 80% der CpG-Motive in methylierter Form vorhanden^{110;111} und die Anzahl sogenannter stimulatorischer CpG-Motive ist etwa sieben mal geringer (CpG-Suppression)¹¹². Zudem existieren bestimmte DNA-Sequenzen, sogenannte inhibitorische Motive (TTAGGGn), die eine Signaltransduktion über TLR9 verhindern können, diese kommen auch in den Telomeren vor¹¹³. Die Modifizierung von DNA durch Methylierung von Cytosin haben die meisten höheren Eukaryoten mit einem Genom größer als 5×10^8 Basenpaaren (bp) gemein. Die DNA-Methylierung ist während der Embryogenese und während der Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung. Sie reguliert die Genexpression, indem sie durch Methylierung von CpGs innerhalb oder stromaufwärts einer Gensequenz die

Transkription verhindert. Für Wirkstoffe wie Procainamid oder Hydralazin wurde z.B. gezeigt, dass es als Nebenwirkung durch eine Blockade der Methyltransferase zu einer Induktion Lupus-ähnlicher Symptome kommen kann^{114;115}.

Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Erkennung von Selbst-DNA nicht nur durch die Methylierung von CpG-Motiven, sondern auch durch die intrazelluläre Lokalisierung des TLR9 verhindert wird¹¹⁶. Physiologischerweise wird diese nicht kompartimentalisiert und dem TLR9 präsentiert, da eine effiziente Clearance und die Aktivität der extrazellulären Nuklease DNase I dies verhindert. DNase I-Defizienz scheint sowohl bei der Maus als auch beim Menschen mit der Entstehung Lupus-typischer Symptome assoziiert zu sein^{117;118}.

Jüngste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Säugetier-DNA unter bestimmten Voraussetzungen als Immunogen wirken kann¹¹⁹⁻¹²¹. Da der TLR9 spezifisch für die Erkennung von hypomethylierter CpG-DNA ist und Säugetier-DNA zwar wenige, aber dennoch diese Motive enthält, ist eine Erkennung von Eigen-DNA prinzipiell möglich.

Eine wichtige Rolle für die Immunogenität von Nukleinsäuren spielt auch das endosomale pH-Milieu des TLR9. Die immunologische Aktivität von CpG-DNA ließ sich *in vitro* durch interferierende Substanzen wie Chloroquin vollständig aufheben¹²². Chloroquin ist als Prophylaxe und Therapie der Malaria bekannt, indem es den Hämoglobinabbau von Erythrozyten durch den Erreger zur Gewinnung von Proteinen für seinen eigenen Stoffwechsel stört. Chemisch ist es eine schwache Base, die die Kristallisierung des Hämozins, einem Abbauprodukt des Häm, inhibiert. Dazu reichert es sich in Endosomen an und hemmt die Acidifizierung und damit die Signaltransduktion des TLR9¹²³. Chloroquin wird auch schon länger in der Behandlung von Rheumatoider Arthritis und benignen Formen des diskoiden Lupus mit Erfolg eingesetzt. Die exakte Wirkungsweise *in vivo* ist jedoch bislang nicht bekannt.

1.2.4. Hypothese und Arbeitsprogramm

Frühere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe demonstrieren bereits, dass die Anwesenheit von Komplement C4 eine besondere Rolle beim Transport und der Clearance von IgM-Immunkomplexen spielt. Für diese Immunkomplexe wurde gezeigt, dass sie an der marginalen Zone abgelagert werden und zu einer gesteigerten humoralen Immunantwort führen¹²⁴. Desweiteren konnte die Arbeitsgruppe bereits einen Zusammenhang zwischen Komplementdefizienz und Aktivierung des IFN- α -Systems nachweisen¹²⁵. Sie konnte zeigen, dass in jungen C4-defizienten Mäusen spontan eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von IFN- α vorliegt und es sich bei den Interferon-produzierenden Zellen um CD11b-positive (CD11b+) dendritische Zellen der

Marginalen Zone der Milz (MZ) handelt. Interessanterweise kommt es zu dieser IFN- α Aktivierung vor dem Auftreten erster Anzeichen einer Autoimmunerkrankung, wie z.B. dem Nachweis von IgG-Antikörpern gegen dsDNA. Auf diesen Ergebnissen basiert eine neue Theorie zur Entstehung von SLE, die beide Phänomene in sich vereint und die in dieser Arbeit weiterhin überprüft werden soll.

Die Hypothese ist, dass ein Mangel an frühen Komplementkomponenten C1q, C4 und C2 zu einer Akkumulation von endogener DNA führt, die sich aufgrund einer ineffizienten Clearance von apoptotischen Körperchen anreichert. Die apoptotische DNA lagert sich, teilweise unter Bildung von Immunkomplexen mit natürlichen IgM-Antikörpern gegen DNA, an der Marginalen Zone der Milz ab, wo sie die dortigen Dendritischen Zellen bindet und so eine Aktivierung des IFN- α Systems induziert. Sezerniertes IFN- α unterstützt die humorale Immunreaktion gegen die im Immunkomplex gebundenen Antigene, worauf es zur Bildung von IgG-Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene kommt. Diese bilden Immunkomplexe mit apoptotischen Körperchen, die sich aufgrund der verminderten Clearance im Gewebe ablagern und inflammatorische Immunantworten auslösen. Hieraus ergibt sich für IFN- α eine wichtige Rolle für die Entstehung von SLE.

Zur Überprüfung dieser Hypothese soll zunächst die Akkumulation von endogener DNA bei C4-defizienten Mäusen nachgewiesen und anschliessend die ursächliche Rolle intravaskulärer DNA für die spontane IFN- α Produktion bei C4-defizienten Mäusen überprüft werden. Dazu sollen verschiedene *in vitro* erzeugte DNA-Formen (native, fragmentierte native und apoptotische DNA) in Wt Mäuse appliziert werden. Auf mRNA-Ebene soll anschließend die Induktion von IFN- α mittels realtime RT-PCR gemessen werden, sowie dessen indirekter Nachweis über die Expression des Interferon-regulierenden Faktors IRF-7 erfolgen. Desweiteren soll der Einfluss auf Zytokine der angeborenen Immunantwort, welche ebenfalls als bei SLE erhöht beschrieben wurden, untersucht werden. Mit immunhistochemischen Färbungen von Gefrierschnitten der Milz soll die Anlagerung von apoptotischer DNA in der Marginalen Zone gezeigt werden. Parallel dazu soll *in vivo* apoptotische DNA induziert werden mittels der Applikation von Pristane, einem Isoprenoidalkan, das bekannterweise zu einer der Lupus-Nephritis ähnlichen Erkrankung führt. Eine anschliessende Langzeitbeobachtung soll Aufschluss darüber geben, ob die Deposition apoptotischer DNA an der Marginalen Zone zu einer humoralen Immunantwort führt und ob sich darüber hinaus eine Autoimmunantwort etabliert. Dies soll über die Generierung von Autoantikörpern gegen dsDNA im ELISA oder gegen nukleäre Antigene in der Immunfluoreszenz über einen Zeitraum von 6 Monaten erfolgen. Dazu soll die dargestellte Theorie bezüglich der Involvierung von TLR9 Rezeptoren mit Hilfe von

TLR9 defizienten Mäusen, unter Applikation von apoptotischer DNA, *in vivo* bestätigt werden. Sollte bei diesen Tieren die IFN- α Induktion nach Gabe von apoptotischer DNA unterbleiben, soll die medikamentöse Beeinflussung des TLR9-Signaltransduktionsweges durch Inhibierung mit Chloroquin untersucht werden. *In vitro* wurde bereits die Inhibierung der Signaltransduktion in endosomalen Toll-like Rezeptoren gezeigt. Ob dieses Wirkprinzip auch *in vivo* greift, ist bislang nicht geklärt. Dazu soll untersucht werden, ob Chloroquin die durch Applikation apoptotischer DNA in Wt Mäusen induzierte IFN- α Produktion einschränkt und ob es die spontane IFN- α Induktion in C4-defizienten Mäusen reduzieren kann.

1.3. Zielsetzung

Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung, die klinisch in Form von Nephritis, Dermatitis oder Arthritis als Folge einer abnormen Gewebsdeposition von Immunkomplexen, bestehend aus nukleären Antigenen und Antikörpern. Auf genetischer Ebene wird eine Assoziation des SLE zu Defekten der frühen Komponenten des klassischen Komplementaktivierungsweges (C1>C4>C2) gesehen, die prädisponierend für die Entstehung einer solchen Erkrankung zu sein scheint. Ein Erklärungsansatz berücksichtigt die Rolle von Komplement bei der Clearance von Immunkomplexen und apoptotischen Körperchen, demzufolge Komplementdefizienz über einen ineffizienten Abräummechanismus zur Entstehung von Autoimmunität beitragen könnte. Hierzu passt die Beobachtung, dass in Abwesenheit von C1q oder C4 apoptotische Körperchen weniger gut phagozytiert werden können. Außerdem kommen apoptotische Körperchen als Quelle für Autoantigene in Frage, beinhalten sie doch eine Vielzahl von Strukturen, gegen die Lupus-typische Autoantikörper gebildet werden. Paradoxerweise allerdings scheint ein Mangel des zentralen Komplementfaktors C3 nicht mit SLE assoziiert zu sein, so dass diese Theorie nicht ausreichend scheint, die Assoziation von Komplementmangel und SLE lückenlos zu erklären.

Eine Schlüsselstellung bei SLE scheint das antivirale Zytokin IFN- α einzunehmen, da akute Krankheitsschübe durch erhöhte IFN- α Spiegel im Serum oder einer erhöhten Expression IFN-induzierter Gene gekennzeichnet sind. Im Tiermodell gelang die Inhibierung der IFN- α Signaltransduktion durch genetischen Transfer einer IFN-Rezeptordefizienz in Lupus-suszeptible Mäuse und führte zu einem mildereren Verlauf von SLE.

Bisher ist keine einstimmige Theorie bekannt, welche die Phänomene des Komplementmangels und der verstärkten IFN- α -Produktion gemeinsam erklärt und somit eine Rationale zur Therapie des SLE darstellt.

Es wird angenommen, dass Nukleinsäuren über TLR9 die IFN- α Induktion vermitteln, dies wurde aber bisher nur *in vitro* für humane pDCs gezeigt.

In dieser Arbeit soll der Clearance defekt bei Komplementdefizienz mit der Applikation von Nukleinsäuren in Wt Mäusen zur näheren Untersuchung der frühen Induktion von IFN- α und der Folgen dieser Induktion im Rahmen der vorgestellten Theorie simuliert werden. Dies soll zur näheren Aufklärung der Mechanismen, die an der Entstehung des SLE beteiligt sind, beitragen und anhand der entwickelten Hypothese neue therapeutische Optionen in der frühen Beeinflussung des IFN- α Systems und damit der Entstehung des SLE aufzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Mäuse

Für die Versuche wurden Wildtyp (Wt) und Komplement C4-defiziente (C4^{-/-}) Mäuse vom Stamm C57Bl/6 von der Firma *Charles River Laboratories, Wilmington/USA* bezogen. Die TLR9-defizienten Mäuse (TLR9^{-/-}) haben den Stamm C57Bl/6 als genetischen Hintergrund und wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München zur Verfügung gestellt.

Der Tierversuche für dieses Projekt wurden gemäss den Anträgen 29/d/05 vom 03.01.05 bis zum 30.04.07, 29/c/04 vom 01.04.04 bis zum 30.06.06 und 29/e/07 vom 01.05.07 bis zum 31.05.09 genehmigt durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein. Der Medizinischen Universität Lübeck liegt ebenfalls die Einwilligung der Ethikkommission vor.

2.1.2. Geräte

ABI prism 7700 (*Applied Biosystem, Weiterstadt*)

Analysenwaage LC 6200S (*Sartorius, Göttingen*)

Anthos ELISA-Reader 2001 (*Anthos Labtec Instruments, Wals/Österreich*)

Brutschrank (Water Jacketed Incubator) (*Labotect Labortechnik, Göttingen*)

Columbus ELISA-Washer (*Tecan, Maennedorf/Schweiz*)

Coulter Counter T-660 und Ac.T 8 (*Beckmann Coulter, Krefeld*)

Diaplan Lichtmikroskop (*Leitz, Stuttgart*)

Digitalkamera Canon EOS 10D (*Canon, Tokyo/Japan*)

Digitalkamera Leica DC350F (*Leica, Bensheim*)

Durchflusszytometer Cytomics FC500 (*Beckmann Coulter, Krefeld*)

Elektrophoresesystem Pharmacia LKB GB 200/400 (*Pharmacia, USA*)

Färbekammer Magic Immuno Staining Tray; Cell path plc (*Hemel, Hempstead/USA*)

Fluoreszenzmikroskop DMLM DC350F (*Leica, Bensheim*)

Gefriermikrotom Kryostat CM 1850 (*Leica, Bensheim*)

Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer, Wellesley/USA*)

High Performance OCD Imaging System (*Appligene, Illkrich/Frankreich*)

Infrarotlicht 100W (*Philips, Hamburg*)

Laborwaage 12116 MP (*Sartorius, Göttingen*)

Magnetic cell separator MACS (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*)
Magnetrührer (*Heidolph, Kelheim*)
PH-Meter pHM 83 Autocal (*Radiometer, Kopenhagen/Dänemark*)
Pipette Combi-Pipette Typ 3180L (*Eppendorf, Hamburg*)
Pipetten Vario-Mikroliterpipetten 0.5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (*Eppendorf, Hamburg*)
Schüttler WT12 (*Biometria, Göttingen*)
Spektralphotometer Hitachi U-3000 (*Hitachi, Tokyo/Japan*)
Sterile Werkbank II AI B3 (*Nuaire/Plymouth/USA*)
Thermomixer 5436 (*Eppendorf, Hamburg*)
Trockenschrank (*Heraeus Christ GmbH, Osterode*)
UV-Tisch Transilluminator N9 (*Benz, Wiesloch*)
Vakuumtransfersystem Dot Blotter SRC 96D Minifold I (*Schleicher & Schuell, Dassel*)
Vortexer REAX 2000 (*Heidolph, Schwabach*)
Wasserbad (*GFL Labortechnik, Burgwedel*)
Zentrifuge Kühlzentrifuge 2K15 (*Sigma, Deisenhofen*)
Zentrifuge Minifuge 5414 C (*Eppendorf, Hamburg*)
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS (*Heraeus Christ GmbH, Osterode*)
Zentrifuge Varifuge 3.2RS (*Heraeus Christ GmbH, Osterode*)

2.1.3. Labormaterial

Einmalkanülen BD Microlance™ 3 steril, 0.45 x 13mm (*Becton Dickinson, Heidelberg*)
Einmal-Feindosierungsspritze steril, 1ml (*B. Braun Melsungen, Melsungen*)
Einmalspritzen steril, 2ml, 5ml, 10ml (*Becton Dickinson, Heidelberg*)
Nitrozellulosemembran (*Bio-Rad, München*)
Nylon-Zellsieb (*BD Biosciences, Bedford/USA*)
Tissue-Tek Cryomold® Biopsy 10mm x 10mm x 5mm (*Miles. Diagnostics Division, Elkhart/USA*)
Kunststoffröhrchen steril mit Schraubverschluss 15ml, 50ml (*Greiner, Nürtingen*)
Liquid Blocker Pap-Pen (*Cedarlane/Kanada*)
Latex-Einmalhandschuhe (*Ansell/München*)
Objektträger Super Frost (*Menzel Gläser, Braunschweig*)
Pipettenspitzen 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl (*Greiner, Nürtingen*)
Pipettenspitzen Combitips steril, 0.5ml, 1.25ml, 2.5ml, 5ml, 12.5ml (*Eppendorf, Hamburg*)
Reagenzröhrchen (*Sarstedt, Nürmbrecht*)
Reaktionsgefäße 1.5ml (*Sarstedt, Nürmbrecht*)
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel 1.5ml (*Sarstedt, Nürmbrecht*)

Separationssäulen Grösse MS (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*)

Speedvac (*Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen*)

Stabpipetten steril, 1ml, 5ml, 10ml, 25ml (*Greiner, Nürtingen*)

Zellkulturflaschen 20ml, 50ml, 800ml (*Nunc, Roskilde/Dänemark*)

Zellsieb 4µm (*BD Falcon, Heidelberg*)

2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze

Bovines Serumalbumin (BSA) (*Fluka Biochemika, Neu Ulm*)

Fetales Kälberserum (FCS) Mycoplex (*PAA Laboratories., Pasching/Österreich*)

Kulturmedium IMDM (*Bio Whittacker, Cambrex, Belgien*)

L-Glutamin (*Bio Whittacker, Cambrex, Belgien*)

2-Mercaptoethanol (*Merck, Darmstadt*)

Natrium-Pyruvat (*Bio Whittacker, Cambrex, Belgien*)

Non-essential amino acids (NEAA), (*Bio Whittacker, Cambrex, Belgien*)

Penicillin 10000E/ml, Streptomycin 10000µg/ml (*Bio Whittacker, Cambrex, Belgien*)

2.1.5. Reagenzien

Aceton (*Merck, Darmstadt*)

Agarose NA (*Amersham Biosciences, Uppsala/Schweden*)

Ammoniumchlorid (*Merck, Darmstadt*)

Boehringer Blockreagenz (*Boehringer, Mannheim*)

Biotinamidocaproate N-Hydroxysuccinimid Ester (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Borat (*Merck, Darmstadt*)

Bromphenolblau (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Chloroquin (*Resochin, Bayer AG, Leverkusen*)

Di-ethylpyrocarbonat (DEPC) (*Sigma-Aldrich*)

Dimethyl Sulfoxid (*Merck, Darmstadt*)

Dinatriumtetraborat-Decahydrat (*Merck, Darmstadt*)

Humanes Albumin (*DRK Blutspendedienst, Springe*)

DNA-Molekulargewichtsmarker 123bp-Leiter GIBCOBRL (*Invitrogen, Karlsruhe*)

Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS) fertig (*PAA Laboratories, Pasching/Österreich*)

Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS) (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Ethylenediamintetraacetic acid (EDTA) (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Ethanol (*Merck, Darmstadt*)

Ethidiumbromid (*Appligene, Heidelberg*)

Ficoll Typ 400 (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte (*Leica Instruments, Nussloch*)

Konzentrierte Salzsäure (*Merck, Darmstadt*)

Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077 (*PAA Laboratories, Pasching/Österreich*)

Magnesiumchlorid (*Merck, Darmstadt*)

Natriumacetat-Trihydrat (*Merck, Darmstadt*)

Natriumazid (*Merck, Darmstadt*)

Natriumchlorid (*Merck, Darmstadt*)

Natriumcitrat (*Merck, Darmstadt*)

Natriumnitrit (*Merck, Darmstadt*)

Paraformaldehyd (*Merck, Darmstadt*)

Poly-L-Lysin (*Sigma, Taufkirchen*)

Pristane (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (*Merck, Darmstadt*)

Triton (*Merck, Darmstadt*)

Tween 20 (*Merck, Darmstadt*)

Xylene Cyanol (*BioRad, Hercules/USA*)

Wasserstoffperoxid (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

2.1.6. Antikörper

Antikörper (anti-)	Markierung	Isotyp	Hersteller
Maus CD16/32 (Fc γ RIII/II-Block)	unkonjugiert	Ratte IgG2b	Pharmingen
Maus CD11b	FITC und PE	Ratte IgG2b	Pharmingen
Maus IgG	FITC	Kaninchen	DAKO
Maus IgG1	Alkalische Phosphatase	Ratte	Pharmingen
Maus IgG2a	Alkalische Phosphatase	Ratte	Pharmingen
Maus IgG2b	Alkalische Phosphatase	Ratte	Pharmingen
Maus IgG3	Alkalische Phosphatase	Ratte	Pharmingen
Maus CD11b-beads	Magnetbead		Miltenyi Biotec
TUNEL	FITC		Roche

2.1.7. Primer und Sonden

2.1.7.1. Primersequenzen (TIB Molbiol, Berlin)

IFN- α PCR:

Forward-Primer 5` CCT gAg AgA gAA gAA ACA Cag C
 Reverse-Primer I 5` CAA gTT ggC TgA ggA AgA SA
 Reverse-Primer II 5` Cag CAA gTT AAC TgA ggA AgA CA

2.1.7.2. Sondensequenzen (ABI Applied Biosystems, Weiterstadt)

IFN- α 5` FAM-CTg TgC CTg ggA ggT ggT Cag AgC –TAMRA

2.1.7.3. Sonden/Primer-Kits (ABI Applied Biosystems, Weiterstadt)

Ratte GAPDH Kontrolle Vic
 TaqMan Gene Expression Assays IL-12
 TaqMan Gene Expression Assays IRF 7
 TaqMan Gene Expression Assays IL-6
 TaqMan Gene Expression Assays TLR9
 TaqMan Gene Expression Assays TLR3

2.1.8. Lösungen und Kits

AmpliTa[™] Gold Polymerase (250U, 5U/μl) (*Applied Biosystems Weiterstadt*)
Desoxynukleotid Triphosphat 10μmol (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (*Roche, Indianapolis/USA*)
DNA-free Kit (*Ambion, Austin/USA*)
DNeasy DNA-Tissue-Isolations Kit (*Qiagen, Hilden*)
DsDNA-ELISA Platten (*Orgentec Diagnostika, Mainz*)
In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL) (*Roche, Indianapolis/USA*)
Kallestad[™] Hep-2 cell line slides (*Bio-Rad, Redmond/USA*)
MgCl₂ 25mmol (*Promega, Mannheim*)
One-step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (*Applied Biosystems, Weiterstadt*)
10x PCR-Puffer II ohne MgCl₂ (*Applied Biosystems, Weiterstadt*)
Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits (*Molecular Probes, Göttingen*)
RNeasy plus RNA-isolations Kit (*Qiagen, Hilden*)

2.1.9. Substrate

Sigma Fast[™] p-Nitrophenylphosphat Tabletten Set (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

2.1.10. Zelllinien

2.1.10.1. WEHI-231

Verwendet wurde die Zelllinie WEHI-231 der Firma ECACC (*European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK*). Dabei handelt es sich um Zellen eines B-Zell-Lymphoms der Maus [BALB/c x NZB], welches durch Mineralölinjektion induziert wird.

Nährmedium ist IMDM mit 25mM HEPES (*Bio Whittaker, Cambrex, Belgien*) mit den Zusätzen 10% FCS (*PAA Laboratories, Pasching/Österreich*), 1% Penicillin/Streptomycin (*Bio Whittaker, Cambrex, Belgien*), 1% L-Glutamin (*Bio Whittaker, Cambrex, Belgien*), 1% NEAA (*Bio Whittaker, Cambrex, Belgien*), 1% Natrium-Pyruvat (*Bio Whittaker, Cambrex, Belgien*) und 0,0004% beta-Mercaptoethanol (*Merck, Darmstadt*). Wechsel des Mediums 2 mal pro Woche und Kulturhöchstdauer 6 Monate.

2.1.10.2. HEp2-Zellen

Die ANA-Bestimmung wurde an Objektträgern der Firma Bio-Rad, die mit einer humanen Larynxepithelkarzinom-Zelllinie vorbeschichtet sind, durchgeführt (*Bio-Rad Laboratories, Redmond, USA*).

2.2. Methoden

2.2.1. Materialgewinnung

2.2.1.1. Intravenöse und intraperitoneale Immunisierung von Mäusen

Die intravenöse (i.v.) Applikation erfolgte nach Erwärmung unter Rotlicht ohne Narkose in die Schwanzvene mit einer sterilen Kanüle (0,45x13mm). Das Injektionsvolumen betrug 150µl. Intraperitoneal (i.p.) wurde ein Volumen von 500µl ohne Aufwärmung und ohne Narkose mit einer sterilen Kanüle (0,45x13mm) in das Abdomen injiziert. Die Art der Immunisierung wurde je nach Versuchsmodell gewählt.

2.2.1.2. Blutentnahme und Serumgewinnung

Vor und nach der Immunisierung wurde über die Schwanzarterie Blut abgenommen. Wobei pro Tier bis zu einem Volumen von 300µl gewonnen werden kann. Dafür wurde das Tier unter Rotlicht aufgewärmt und die Schwanzarterie mit einer sterilen Kanüle (0,9x40mm) punktiert. Nach der Abnahme wurde das Blut ca. 1h bei RT zum Koagulieren stehen gelassen und dann 3min mit 1000g zentrifugiert.

2.2.1.3. Isolierung von DNA (aus Zellkultur, Gewebe und Serum)

DNA wurde mit dem Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit isoliert. Die Herstellung der Puffer und Lösungen sowie die Durchführung erfolgten gemäss Hersteller-Protokoll.

2.2.1.4. Gewinnung apoptotischer und US-fragmentierter DNA

Die DNA wurde aus der Zellkultur WEHI-231 gewonnen:

- Zellen herunterzentrifugieren, 100g, 10min
- Aufnehmen in PBS, dann s. 2.2.1.3
- Für apoptotische DNA: aufnehmen in sterilem PBS, 24h-Kultur, dann s. 2.2.1.3
- Für US-fragmentierte DNA: DNA 3-4x mit Ultraschall behandeln, ca. 5 Sekunden, zwischen jedem Schritt auf Eis kühlen

2.2.1.5. DNA/RNA-Bestimmung am Spektralphotometer

Die Menge von DNA oder RNA wurde mittels Messung der optischen Dichte bestimmt. Dabei wurde die Menge an Licht gemessen, die durch eine Probe und durch eine Referenzprobe (reines Medium, in dem auch die Testprobe gelöst ist) tritt. Die Absorption der Probe wurde bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen und dann ins Verhältnis gesetzt. Die eine Wellenlänge misst die Absorption der Probe, die andere den Grad der Verunreinigung. DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum

bei 260nm, während Proteine, die nach der Isolierung als Verunreinigungen auftreten können, Wellenlängen von 280nm absorbieren. Der Quotient der Extinktionen 260/280nm beträgt für reine DNA 1,8 (für reine RNA 2,0). Bei einem Wert unter 1,7 nimmt man eine Proteinverunreinigung an. Zur Messung wurde 5µl Probe 1:20 in DEPC-Wasser verdünnt. Wird RNA mit einer optischen Dichte $OD_{260nm}=1$ gemessen, entspricht dies einer Konzentration von 40ng/µl (DNA 50ng/µl). Die Konzentration lässt sich mit folgender Formel errechnen:

$$C_{RNA} = OD_{260nm} \times 40ng/\mu l \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$C_{DNA} = OD_{260nm} \times 50ng/\mu l \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.2. Herstellung von Gewebeschnitten

2.2.2.1. Beschichtung von Objektträgern

Vor der Beschichtung mit Poly-L-Lysin erfolgte eine Vorbehandlung mit eiskaltem Aceton für 10min. Nach 15min trocknen für 10min wurden die Objektträger mit 0,01% Poly-L-Lysin (in Aqua bidest) beschichtet und anschliessend getrocknet.

2.2.2.2. Fixierung von Gewebeschnitten

Das entnommene Organ wurde in Einbettmedium (Tissue Tek) aufgenommen und bei $-80^{\circ}C$ eingefroren.

Das Gewebe wurde mit einem Mikrotom (Leica CM 1850) geschnitten bei $-20^{\circ}C$. Die Schnitte, mit einer Dicke von 6µm, wurden auf den beschichteten Objektträger platziert und ca. 1h getrocknet. Anschliessend wurde mit eiskaltem Aceton, 10min, fixiert. Nach 30min Lufttrocknen können Schnitte bei $-20^{\circ}C$ eingefroren oder gefärbt werden.

2.2.3. Nachweis von endogener DNA

2.2.3.1. Nachweis von Serum-DNA mittels GAPDH-PCR

DNA aus Serum wurde mit dem Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit isoliert (s. 2.2.1.3). Für die Quantifizierung von DNA im Serum wurde die RT-PCR für Interferon- α (s. 2.2.5.6) in abgewandelter Form angewendet. Die Reverse Transkriptase und die Primer und Sonden für Interferon- α wurden ersetzt durch DEPC-Wasser. Die PCR-Konditionen entsprachen derjenigen für die Interferon- α PCR (s. 2.2.5.6).

2.2.4. Nachweis von apoptotischer DNA

2.2.4.1. Durchflusszytometrie-TUNEL

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messsystem zur quantitativen Analyse von Zellsuspensionen mit geeigneten Fluorochromen. Dabei werden die Zellen vereinzelt und einem Laserstrahl ausgesetzt, wobei das Licht reflektiert bzw. gestreut wird. Das Licht im Forward scatter (FSC) gibt Aufschluss über die Zellgröße, während das Licht im Side scatter (SSC) eine Aussage über die Granularität macht. Darüberhinaus können mit fluorochromierten Antikörpern Epitope einer Zelle quantifiziert werden, da die emittierte Lichtmenge proportional der Anzahl der markierten Epitope ist. Es gibt verschiedene Farbstoffe mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren, so dass die Analyse mehrerer Epitope gleichzeitig möglich ist.

Hier wurde im Rahmen der Herstellung von apoptotischer DNA (s. 2.2.1.4) die Apoptose von WEHI-231 Zellen nach 24h Inkubation in PBS mit der TUNEL-Methode (Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase dUTP Nick End Labeling) überprüft. Diese weist die durch die Fragmentation der DNA entstehenden Strangbrüche in apoptotischen Zellen nach. Dazu knüpft das Enzym TdT (Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase) dUTPs an die freien 3`OH-Enden der Strangbrüche. Die Nukleotide sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Emissionsspektrum von 488nm bis 530nm) gekoppelt, so dass ihre Bindung an die DNA direkt detektiert werden kann.

Puffer und Lösungen:

- PBS
- PFA [4% w/v] 1g Paraformaldehyd
ad 25ml PBS
lösen bei 37°C, immer frisch ansetzen!
- Triton X 100 [0,1% w/v] 1g Natriumcitrat
1ml Triton X 100
ad 1l Aq.dest.
- TUNEL-FITC Kit (Roche) Enzym und Labelsolution 1:10

Durchführung:

- 4x10⁶ Zellen pro Ansatz einsetzen

- Zellen herunterzentrifugieren 100g, 10min
- Waschen in 1ml PBS, 300g, 10min
- Fixieren in 1ml PFA, 10min, RT
- 2x Waschen mit PBS, 300g, 10min
- Zellen perforieren mit 100µl Triton X 100 [0,1%], 2min auf Eis
- 1x Waschen 5min, 1x Waschen 10min mit PBS
- 50µl TUNEL-FITC (1:10), Inkubation 1h, 37°C
- 2x Waschen
- Messung

2.2.4.2. Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurde DNA nach der Isolierung aus WEHI-231 Zellen (s. 2.2.1.3 und 2.2.1.4) qualitativ nachgewiesen. 10µl DNA wurden auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (s. 2.2.3.2).

2.2.4.3. Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenzfärbung können bestimmte Antigene auf einem histologischen Schnitt lokalisiert werden. Dazu macht man sich die Affinität von Antikörpern zu Epitopen zunutze, die zu einer starken spezifischen Bindung führt, welche direkt nachgewiesen werden kann. Dabei ist der Epitop-spezifische Antikörper (Ak) direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt und wird mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert.

Zur Dokumentation wurden die Färbungen mit der Digitalkamera fotografiert und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

2.2.4.3.1 TUNEL/CD11b+ Färbung

Mit der TUNEL-Methode (s. 2.2.4.1) wurden die durch die Fragmentation der DNA entstehenden Strangbrüche in apoptotischen Zellen histologisch nachgewiesen. Hierzu wurde TUNEL-FITC verwendet. Gleichzeitig wurde das für dendritische Zellen/Makrophagen der marginalen Zone spezifische Oberflächenantigen CD11b mit einem Phycoerythrin(PE)-gekoppelten Ak (anti-CD11b-PE) gefärbt.

Puffer und Lösungen:

s. 2.2.4.1

Liquid Blocker PAP Pen

Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung:

Anti-CD11b-PE

TUNEL-FITC Kit

Durchführung:

- Umrandung der Schnitte mit dem Liquid-Blocker PAP Pen
- Fixierung mit 4% Paraformaldehyd, 10min
- Waschen mit PBS, 2x10min
- Objektträger in Triton-Puffer, 2min auf Eis
- Waschen mit PBS, 2x5min
- Färbung der Schnitte unter Lichtausschluss!
- 50µl TUNEL (FITC), 1h bei 37°C
- Waschen mit PBS, 3x5min
- 100µl CD11b-PE 1:100
- Waschen mit PBS, 3x5min
- Aufbewahrung in Küvette mit PBS zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

2.2.4.3.2 PicoGreen-Färbung

PicoGreen-markierte apoptotische DNA [40µg] wurde i.v. in die Wt Maus appliziert und anschliessend nach Organentnahme mittels Immunfluoreszenz in der Milz lokalisiert.

PicoGreen ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch in dsDNA interkaliert. Er weist ein ähnliches Emissionsspektrum wie FITC (s.2.2.4.1) auf (480-520nm). Die Durchführung des PicoGreen Assays sowie die Herstellung der Puffer und Lösungen erfolgten gemäss Hersteller-Protokoll.

Puffer und Lösungen:

- 10% Normal Mouse serum Normal mouse serum 1:10 in PBS
- 10% Normal Rat serum Normal Rat serum 1:10 in PBS
- 10% Normal Hamster serum Normal Hamster serum 1:10 in PBS
- PBS

Antikörper für Gegenfärbung:

Anti-CD11b-PE

Durchführung:

- Herstellung apoptotischer/US-fragmentierter DNA (s. 2.2.1.3 und 2.2.1.4)
- Markierung der DNA mit 10µl PicoGreen gemäss Hersteller-Protokoll (s. 2.1.8)
- I.v. Injektion von 40µg markierter DNA in Maus
- Nach 20min Milzentnahme (ab dann möglichst unter Lichtausschluss arbeiten!!!)
- 8µm Schnitte anfertigen, 1h trocknen lassen
- Schnitt umranden mit PAP-Pen, trocknen lassen, 15min
- Waschen mit PBS, 5min
- 100µl 10% NMS/NHS/NRS, 15min
- 100µl anti-CD11b-PE Ak 1:100, 30min
- Waschen mit PBS, 3x 5min
- Waschen mit PBS, 2x 5min
- Schnitte in Küvette mit PBS aufbewahren unter Lichtausschluss!

2.2.5. Immuneffekte von DNA

2.2.5.1. Isolierung von mononukleären Zellen aus der Milz

Eine heterogene Zellsuspension kann mittels der sogenannten Dichtezentrifugation nach den enthaltenden Zelltypen separiert werden. Dazu wird über ein Lymphozyten separationsmedium (Ficoll) (geringe Viskosität, bestimmte Dichte, osmotische Eigenschaften) ein Dichtegradient angelegt, anhand dessen sich die Zellen nach ihrer Grösse und ihrem Gewicht auftrennen. Bei der Zentrifugation entstehen verschiedene Schichten, die die unterschiedlichen Zelltypen enthalten. In der unteren Schicht der Ficollphase sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten. Oberhalb der Ficollphase sammeln sich Zellen geringer Dichte, langsam sedimentierende Plättchen und Plasma. Lymphozyten und Monozyten reichern sich an der Grenze zwischen Ficoll und Plasma an.

Puffer und Lösungen:

- Lymphozytenseparationsmedium [D=1,077g/ml]

Durchführung:

- Milz zwischen zwei Objektträgern zerreiben und in etwas PBS aufnehmen
- Zellsuspension durch ein 40µM Nylon-Zellsieb geben
- Langsam über 5ml vorgelegtes Separationsmedium schichten
- Zentrifugieren bei 601g (mit Bremse!), 4°C, 20min
- Mononukleären Zellring abpipettieren
- Waschen in eiskaltem PBS, 301g, 10min

2.2.5.2. Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen

Die Separation von Zellen mit bestimmtem Oberflächenantigen erfolgte mit der MACS-Methode (Magnetic Activated Cell Sorting) der Firma Miltenyi.

Prinzip: Die Targetzellen werden mit Oberflächenantigenspezifischen Antikörpern (anti-CD11b) markiert, welche an magnetische beads gekoppelt sind. Lässt man diese Zellen über eine Säule in einem Magnetfeld laufen, werden die markierten Target-Zellen an der Säulenwand festgehalten. Anschliessend kann diese eluiert werden, indem die Verbindung zum Magneten getrennt wird.

Puffer und Lösungen:

MACS-Puffer: PBS
 Natriumcitrat 0,4% (w/v)
 1% humanes Albumin (aus 5% Stocklösung)
 steril filtrieren

Durchführung: (auf Eis!)

- Zellen (s. 2.2.5.1) in MACS-Puffer waschen, bei 100g, 10min,
- Aliquot vorher abnehmen zur Zellzahlmessung am Coulter Counter
- Überstand verwerfen und Zellen in Restpuffer in ein Microtube überführen
- 0,25µg Fc-Block (anti-CD16/32 unkonjugiert)/10⁶ Zellen, Inkubation 10min auf Eis
- 10µl Antikörper-beads/10⁷ Zellen, Inkubation 15min, 10°C
- Waschen mit MACS-Puffer, bei 110g, 10min
- Zellen in 500µl MACS-Puffer aufnehmen
- MACS-Säule mit 500µl Puffer vorspülen
- Zellen auf die Säule geben und mit 2ml die Negativ-Fraktion eluieren
- Säule vom Magneten trennen und mit 1ml Puffer die Positivfraktion eluieren

- Eluierte Positivfraktion auf eine 2.Säule geben und mit 2ml Puffer nachspülen
- Positivfraktion wiederholt mit 1ml Puffer eluieren
- Aliquot für die Reinheitsbestimmung der Fraktionen am Durchflusszytometer abnehmen

2.2.5.3. Reinheitsmessung am Durchflusszytometer

Für die Reinheitsmessung wurden die Zellfraktionen mit einem Ak gegen CD11b (anti-CD11b-FITC) konjugiert und so der Grad der Verunreinigung durch nicht gewünschte Zellen (B- und T-Zellen) mittels Durchflusszytometrie (s. 2.2.4.1) bestimmt.

Durchführung:

- 5-10µl FITC-Antikörper
- Inkubation 10min, RT
- Zentrifugieren, bei 2000g, 1min
- Zellpellet in PBS aufnehmen

Es wurden je nach Zellzahl zwischen 10.000 und 50.000 Zellen untersucht.

2.2.5.4. Isolierung von RNA

RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Plus Kit isoliert. Die Herstellung der Puffer und Lösungen sowie die Durchführung erfolgte gemäss Hersteller-Protokoll.

2.2.5.5. DNA-Verdau

Bei der Isolierung von RNA kann es zur Verunreinigung mit genomischer DNA kommen, welche bei der RT-PCR, in der aus RNA cDNA synthetisiert wird, zu falschen Ergebnissen führen kann. Deshalb wurde die RNA bei Bedarf (positives Ergebnis in der RT-PCR bei Kontrolllauf der RNA ohne Reverse Transkriptase) mit dem DNA-free Kit behandelt (s. 2.1.8), bei dem die genomische DNA mit einer DNase I verdaut wird.

- 0,1 Volumen DNase I Puffer (5µl) und 1-2µl DNase I [5mg/ml] (1µl für bis zu 10µg RNA/50µl) zur RNA (50µl) hinzugeben, vortexen
- Inkubation, 30min, 37°C
- 0,1 Volumen DNase I Inaktivierungsreagenz hinzugeben, vortexen
- Inkubation, 2min, RT
- Zentrifugieren, 10.000g, 1min
- Die im Überstand enthaltene RNA vorsichtig abpipettieren

2.2.5.6. PCR und Real-time RT-PCR

Mit der PCR (Polymerase Kettenreaktion) können DNA-Abschnitte gezielt mit einer Polymerase vervielfältigt werden. Anschliessend können die PCR-Produkte anhand ihrer Grösse durch Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden.

Die Real-time RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) ist eine Methode zur relativen Quantifizierung von mRNA. Dazu wird zuerst mittels einer Reversen Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben. Danach kommt es zur Amplifizierung der Targetsequenz durch die Polymerase. Dabei kann, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Akkumulation der PCR-Produkte über Fluoreszenz-markierte Sonden direkt detektiert werden (real time). Das Signal des Farbstoffes bei Anregung durch eine Lichtquelle ist dabei quantitativ proportional zur Menge des PCR-Produkts und wird über eine Software in Echtzeit (real time) dargestellt.

Diese sequenzspezifische Sonde ist an beiden Enden mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert, am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff und einem blockierendem Phosphatrest. Die Emission des Reporterfarbstoffes wird bei Anregung durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. Das amplifizierende Enzym Ampli Taq Polymerase hat zusätzlich zu seiner Polymerase-Funktion noch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, mit der die Sonde geschnitten wird. Die Nähe des Reporters zum Quencher ist dann unterbrochen und so wird mittels eines Argon-Lasers der Reporter-Farbstoff nur dann angeregt und als Signal detektiert, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang synthetisiert hat. Die Stärke des Signals nimmt im Verlauf der Synthese von Zyklus zu Zyklus zu und ist direkt proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produkts. Es wird dabei auf das Fluoreszenzsignal eines konstitutiv exprimierten Gens (housekeeping gene), GAPDH (murine Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), bezogen, welches im selben PCR-Lauf synthetisiert wird.

Puffer und Lösungen:

- DEPC-Wasser (RNase-frei):
 - 1µl Diethylpyrocarbonat pro 1ml Wasser
 - Inkubation, 12h, 37°C
 - Autoklavieren, 20min, 120°C
- MgCl₂ [25mmol] (Promega, Mannheim)
- One-step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Sonden, Primer und fertige Sonden/Primer-Mix s. 2.1.7

Mastermix (1x Ansatz) für IFN- α PCR:

- 25 μ l 2x Mastermix (MM)
- 1,25 μ l Multiscribe-Reverse Transkriptase/RNase-Inhibitor [5U/ μ l]
- 0,75 μ l FW-Primer IFN- α [20 μ M]
- 0,75 μ l RW-Primer I IFN- α [20 μ M]
- 0,75 μ l RW-Primer II IFN- α [20 μ M]
- 0,3 μ l Sonde IFN- α [6 μ M]
- 0,2 μ l Rodent GAPDH FW-Primer [10 μ M]
- 0,2 μ l Rodent GAPDH RW-Primer [10 μ M]
- 0,2 μ l Rodent GAPDH Sonde [20 μ M]
- 3 μ l MgCl₂ [25mM]
- 7,6 μ l DEPC-Wasser
- Ansatz pro tube: 20 μ l MM + 5 μ l RNA [5ng/ μ l]

Mastermix (1x Ansatz) für IL-12 PCR:

- 25 μ l 2x Mastermix (MM)
- 1,25 μ l Multiscribe-Reverse Transkriptase/RNase-Inhibitor [5U/ μ l]
- 2,5 μ l gebrauchsfertige Sonde/Primer Mix [Sonde 5 μ M, Primer 18 μ M]
- 0,2 μ l Rodent GAPDH FW-Primer [10 μ M]
- 0,2 μ l Rodent GAPDH RW-Primer [10 μ M]
- 0,2 μ l Rodent GAPDH Sonde [20 μ M]
- 10,65 μ l DEPC-Wasser
- Ansatz pro tube: 20 μ l MM + 5 μ l RNA [5ng/ μ l]

Mastermix (1x Ansatz) für IRF-7 PCR:

- 12,5 μ l 2x Mastermix (MM)
- 0,63 μ l Multiscribe-Reverse Transkriptase/RNase-Inhibitor [5U/ μ l]
- 0,2 μ l gebrauchsfertige Sonde/Primer Mix [Sonde 5 μ M, Primer 18 μ M]
- 0,1 μ l GAPDH FW-Primer [10 μ M]
- 0,1 μ l GAPDH RW-Primer [10 μ M]
- 0,1 μ l Rodent GAPDH Sonde [20 μ M]
- 2 μ l MgCl₂ [25mM]
- 4,37 μ l DEPC-Wasser
- 20 μ l MM + 5 μ l RNA [10ng/ μ l]

Mastermix (1x Ansatz) für IL-6 PCR:

- 12,5µl 2x Mastermix (MM)
- 0,63µl Multiscribe-Reverse Transkriptase/RNase-Inhibitor [5U/µl]
- 0,2µl gebrauchsfertige Sonde/Primer Mix [Sonde 5µM, Primer 18µM]
- 0,2µl GAPDH FW-Primer [10µM]
- 0,2µl GAPDH RW-Primer [10µM]
- 0,2µl Rodent GAPDH Sonde [20µM]
- 2µl MgCl₂ [25mM]
- 4,12ml DEPC-Wasser
- 20µl MM + 5µl RNA [10ng/µl]

Mastermix (1x Ansatz) für TLR9 PCR:

- 12,5µl 2x Mastermix (MM)
- 0,63µl Multiscribe-Reverse Transkriptase/RNase-Inhibitor [5U/µl]
- 0,25µl gebrauchsfertige Sonde/Primer Mix [Sonde 5µM, Primer 18µM]
- 0,1µl Rodent GAPDH FW-Primer [10µM]
- 0,1µl Rodent GAPDH RW-Primer [10µM]
- 0,1µl Rodent GAPDH Sonde [20µM]
- 2µl MgCl₂ [25mM]
- 4,33ml DEPC-Wasser
- 20µl MM + 5µl RNA [10ng/µl]

Mastermix (1x Ansatz) für TLR3 PCR:

- 12,5µl 2x Mastermix (MM)
- 0,63µl Multiscribe-Reverse Transkriptase/RNase-Inhibitor [5U/µl]
- 0,15µl gebrauchsfertige Sonde/Primer Mix [Sonde 5µM, Primer 18µM]
- 0,125µl Rodent GAPDH FW-Primer [10µM]
- 0,125µl Rodent GAPDH RW-Primer [10µM]
- 0,125µl Rodent GAPDH Sonde [20µM]
- 2µl MgCl₂ [25mM]
- 4,35ml DEPC-Wasser
- 20µl MM + 5µl RNA [10ng/µl]

PCR-Bedingungen:

IFN-α	Hold	50°C : 5sec	
	Hold	48°C : 30min	
	Hold	95°C : 10min	
	Cycle	95°C : 15sec	
		62°C : 1min	45x
IL-12 und IRF-7	Hold	50°C : 5sec	
	Hold	48°C : 30min	
	Hold	95°C : 10min	
	Cycle	95°C : 15sec	
		60°C : 1min	45x
IL-6	Hold	50°C : 5sec	
	Hold	48°C : 30min	
	Hold	95°C : 10min	
	Cycle	95°C : 15sec	
		61°C : 1min	45x
TLR9	Hold	50°C : 5sec	
	Hold	48°C : 30min	
	Hold	95°C : 10min	
	Cycle	95°C : 15sec	
		62°C : 1min	45x
TLR3	Hold	50°C : 5sec	
	Hold	48°C : 30min	
	Hold	95°C : 10min	
	Cycle	95°C : 15sec	
		60°C : 1min	45x

Pro PCR-Lauf wird ein weiterer Ansatz mitgeführt, indem durch Weglassen der Multiscribe/RNase-Inhibitor (enthält die Reverse Transkriptase) kontrolliert wird, ob die eingesetzte RNA-Probe noch mit genomischer DNA verunreinigt ist. Sollte in diesem Ansatz cDNA gebildet werden muss der DNA-Verdau (s. 2.2.5.5) wiederholt und die Probe erneut gemessen werden.

2.2.5.7. Relative Quantifizierung

Hierbei wird die Expression der Zielsequenz relativ zu einer zweiten, konstitutiv exprimierten Sequenz (housekeeping) bestimmt. Die Stärke des Fluoreszenz-Signals der Targetsequenz mit der unbekannt Menge wird auf das Signal des Housekeeping-Gens (GAPDH) bezogen.

Die Ausgangsmenge der Zielsequenz wird über eine Standardkurve bestimmt und dann durch die Ausgangskopienzahl des Kalibrators (z.B. Wt unbehandelt) geteilt. Der Kalibrator wird dadurch zum 1x-Wert und die Target-Probe wird dann als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator bestimmt.

2.2.5.8. Vergleichende C_T-Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Haben beide Amplicons annähernd gleiche Effizienzen, so nähert sich die Steigung der Geraden dem Wert 0. Ist der absolute Wert der Steigung $< 0,1$ kann die $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewendet werden, ohne dass eine Standardkurve generiert werden muss. Für die durchgeführten PCRs war keine Standardkurve nötig.

2.2.6. Nachweis von Autoantikörpern

2.2.6.1. Maus anti-dsDNA-Antikörper ELISA

Ein wichtiger diagnostischer Marker des SLE ist der Nachweis von Antikörpern gegen dsDNA im Serum.

Für den Nachweis von IgG-Ak gegen dsDNA im Maus-Serum wurde ein spezieller ELISA der Firma Orgentec benutzt, der schon mit DNA beschichtet ist. Die Ak gegen die Serum-Ak sind direkt mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welches ein geeignetes Substrat unter Farbstoffbildung umsetzt. Dabei spaltet es Phosphat von organischen Verbindungen ab, wobei ein Azofarbstoff entsteht.

Als Positiv-Kontrolle wurde Iprlpr-Serum verwendet.

Puffer und Lösungen:

Substrat für Alkalische Phosphatase	pNPP Sigma Fast-AP für 20ml
Verdünnungspuffer	PBS und PBS/Tween (0.05% v/v)
Waschpuffer	PBS/Tween (0.05% v/v)

Durchführung:

- 100µl Serum-Verdünnung 1:20 im Doppelansatz
- Inkubation 30min, RT

- Waschen 3x mit 300µl Waschpuffer
- Verdünnung des AP-konjugierten Sekundär-Antikörpers in PBS/Tween (0.05%):
Ratte anti-Maus IgG1 1:10.000
- Ratte anti-Maus IgG2a 1:5000
- Ratte anti-Maus IgG2b 1:10.000
- Ratte anti-Maus IgG3 1:2500
- 100µl Sekundär-Antikörper, 30min, RT
- Waschen 3x mit 300µl Waschpuffer
- 200µl Substrat, 20min im Dunkeln
- Reaktion stoppen mit 50µl 3N NaOH
- Messung der Extinktion im ELISA-Reader bei 405nm (Referenz 620nm)

2.2.6.2. HEp2/ANA-Test

Ebenfalls charakteristisch für SLE sind hohe Titer antinukleärer Antikörper (ANA) gegen verschiedene nukleäre Bestandteile. Für den Nachweis wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest auf einer humanen Larynxepithelkarzinom-Zelllinie (Human epidermoid carcinoma cells) durchgeführt. Dazu wurden HEp-2-Zellen beschichtete Objektträger (*Bio-Rad*) verwendet. Als Positivkontrolle wurde Iprlpr-Serum verwendet.

Puffer und Lösungen:

PBS/ 1% BSA/ 0.05% Tween

Eindeckmedium (Glycerol, pH 8.5, *Euroimmun*)

Durchführung

- 25µl Serum-Verdünnung 1:10 bis 1:80 pro Immunoblot, 30min, RT
- Waschen mit PBS/ 1% BSA/ 0.05% Tween, 10min
- Trocknen mit Blotpapier
- 25µl IgG-FITC 1:25 in PBS, 1h, RT, unter Lichtausschluss
- Waschen mit PBS/ 1% BSA/ 0.05% Tween, 15min, unter Lichtausschluss
- Eindeckeln mit Eindeckmedium und Deckgläschen
- Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

3 Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Daten ergab, dass diese sich nicht normalverteilt darstellen. Um den mittleren Wert einer Stichprobe zu erhalten, legt man deshalb bei asymmetrisch verteilten Werten statt des Mittelwerts den Median fest. Dieser beschreibt den in der Mitte liegenden Schwerpunkt einer in aufsteigender Reihenfolge sortierten Stichprobe. Er wird auch 50%-Wert genannt, da er die Messwerte in zwei gleich grosse Datenhälften teilt. Extremwerte im positiven oder negativen Bereich fallen damit bei der Berechnung des Medians nicht ins Gewicht.

3.1. Untersuchung zum Komplementmangel bedingten Abräumdefekt endogener apoptotischer DNA auf die Induktion von IFN- α

3.1.1. Nachweis von endogener apoptotischer DNA im Serum

Die Hypothese der verminderten Clearance von apoptotischer DNA bei Komplementdefizienz bietet eine Erklärung für die Entstehung der Lupus-typischen Autoantikörper in der Bereitstellung nukleärer Antigene. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten eine spontan erhöhte IFN- α mRNA-Expression bei jungen, phänotypisch gesunden C4-/- Mäusen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei jungen C4-/- Mäusen schon lange vor Krankheitsbeginn erhöhte endogene DNA in der Zirkulation nachgewiesen werden kann.

Der quantitative Nachweis von endogener DNA, isoliert aus dem Serum einzelner Wt und C4-/- Mäuse, wurde über die Amplifizierung des Housekeeping-Gens GAPDH mittels realtime PCR vorgenommen, welche auf dem Protokoll der RT-PCR für IFN- α beruht (s. 2.2.5.6) und in abgewandelter Form ohne den Schritt der reversen Transkription und ohne die Amplifizierung des IFN- α Gens durchgeführt wurde (s. 2.2.3.1).

Die PCR zeigte, dass in DNA-Proben aus dem Serum einzelner 3-4 Monate alten C4-/- Mäuse im Median signifikant mehr GAPDH-Gen amplifiziert wurde als in DNA-Proben aus dem Serum einzelner Wt Mäuse gleichen Alters (**Abb. 3**). 90% der DNA-Proben aus C4-/-Serum enthielten zwischen 2,03 und 309,5 mal mehr Amplifikate des GAPDH-Gens als DNA aus Wt Serum. Im Median wurden in DNA aus C4-/- Serum

46,95 mal mehr Amplifikate des GAPDH-Gens nachgewiesen als in DNA aus Wt Serum.

Ein weiteres Diagramm (**Abb. 4**) stellt die relativen Werte der Amplifizierung des GAPDH-Gens der einzelnen Wt und C4^{-/-} Seren dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer niedrigeren oder einer höheren Amplifikatmenge des GAPDH-Gens als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte der gesamten Messgruppe der Wt Seren im Vergleich (Normalwert=1). 43% der einzelnen Serum-DNA Proben von Wt Mäusen lagen in der Menge der Amplifikate des GAPDH-Gens über dem Normalwert, mit einem höchsten relativen Wert von 56,12 und einem niedrigsten von 0,001 (n=7). Bei C4^{-/-} Mäusen enthielten 100% der Serum-DNA Proben mehr Amplifikate des GAPDH-Gens als es dem Normalwert entspricht.

Dass es sich bei der aus dem Serum isolierten DNA um apoptotische DNA handelt, konnte qualitativ mit der Gelelektrophorese nachgewiesen werden (**Abb. 5**). DNA wird im frühen Stadium der Apoptose durch Endonukleasen zu Fragmenten degradiert. Diese Endonukleasen schneiden spezifisch nur zwischen den Nukleosomen im Bereich der Linker-DNA, so dass Nukleosomeneinheiten verschiedener Länge entstehen (200bp und ein vielfaches davon). Lässt man die DNA elektrophoretisch auf einem Gel laufen, zeigt sich eine charakteristische Leiter (sog. Laddering).

Für die Gelelektrophorese wurde DNA aus gepooltem Serum von Wt und C4^{-/-} Mäusen (n=5) isoliert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Demnach enthielt die betreffende DNA-Probe aus Wt Serum 37ng DNA/ μ l Eluat und die DNA-Probe aus C4^{-/-} Serum 77ng DNA/ μ l Eluat. Für die anschließende Elektrophorese wurde ein Volumen von 10 μ l DNA eingesetzt. Im Gel sichtbar ist der natürlich fragmentierte Zustand der endogenen DNA sowohl von Wt Mäusen als auch von C4^{-/-} Mäusen.

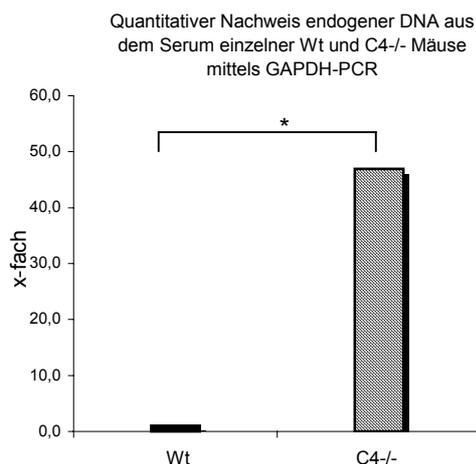


Abb. 3: Amplifizierung des GAPDH-Gens (Median) in DNA aus dem Serum einzelner junger Wt und C4-/- Mäuse mittels real-time PCR.

Nach GAPDH-PCR von DNA aus Serum von jungen (3-4 Monate) C4-/- Mäusen konnten im Median signifikant 46,95 mal mehr Amplifikate nachgewiesen werden als nach GAPDH-PCR von DNA aus Serum junger Wt Mäuse (3-4 Monate), d.h. physiologisch enthielt Serum von C4-/- Mäusen mehr DNA als Serum von Wt Mäusen (n=7, p* < 0,05).

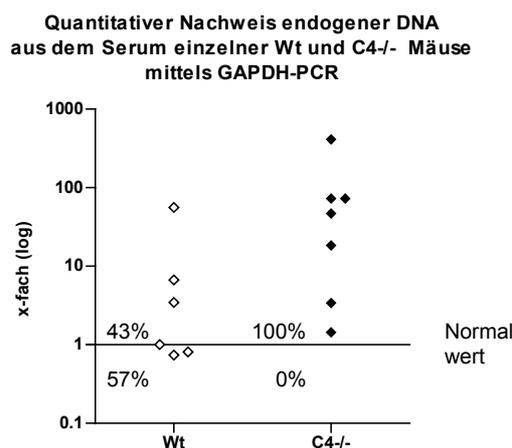


Abb. 4: Amplifizierung des GAPDH-Gens in DNA aus dem Serum einzelner junger Wt- und C4-/- Mäuse mittels real-time PCR.

In der GAPDH-PCR wurden bei 43% der einzelnen Serum-DNA Proben von Wt Mäusen mehr Amplifikate des GAPDH-Gens gemessen, als es dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte der gesamten Messgruppe entspricht (Normalwert). Bei 100% der einzelnen Serum-DNA Proben von C4-/- Mäusen wurden mehr Amplifikate des GAPDH-Gens gemessen, als es dem Normalwert entspricht (n=7, p* < 0,05).

GAPDH	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
Wt (Ref.)	1,0	0,22	41,29	
C4-/-	46,95	2,03	309,5	0,0205

Tab. 1: Darstellung des Medians der relativen Werte der Amplifizierung des GAPDH-Gens endogener DNA aus dem Serum einzelner C4-/- Mäuse bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten relativen Wert der Amplifizierung des GAPDH-Gens endogener DNA aus dem Serum einzelner Wt Mäuse (Median ΔC_T -Werte der gesamten Stichprobe).

Der Median der ΔC_T -Werte nach Amplifizierung des GAPDH-Gens einzelner Serum-DNA Proben von Wt Mäusen wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert nach Amplifizierung des GAPDH-Gens von Serum-DNA von C4-/- Mäusen (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

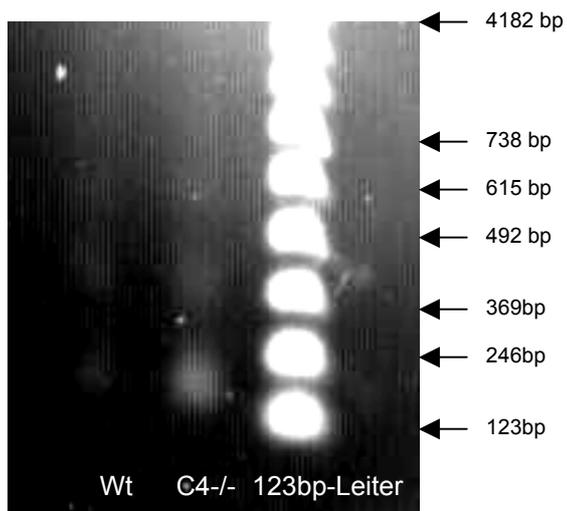


Abb. 5: Qualitativer Nachweis von endogener apoptotischer DNA im Serum von Wt Mäusen und C4-/- Mäusen mittels Gelelektrophorese.

Elektrophorese von DNA-Proben isoliert aus Poolserum (5 Tiere). Eingesetzt wurde ein Volumen von 10µl DNA-Eluat. Die Gelelektrophorese zeigt, dass es sich bei der aus Serum von Wt und C4-/- Mäusen isolierten DNA um fragmentierte DNA handelt.

3.1.2. Deposition von apoptotischer DNA an der marginalen Zone der Milz

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe identifizierten CD11b+ Zellen der marginalen Zone der Milz als die IFN- α produzierenden Zellen. Zum Nachweis der Deposition endogener DNA aus der Zirkulation in die marginale Zone der Milz wurden 40 μ g apoptotische DNA (*in vitro* hergestellt aus WEHI-231 Zellen, kultiviert für 24h in PBS (s. 2.2.1.4)) mit PicoGreen-Markierung i.v. in die Wt Maus appliziert und nach 30 Minuten die Milz entnommen. Zudem wurde die spontane Deposition endogener DNA aus der Zirkulation in die marginale Zone der Milz in unbehandelten Wt und C4-/- Mäusen nachgewiesen.

Die marginale Zone der Milz wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt (**Abb. 6**). In der Immunfluoreszenzfärbung der Milz unbehandelter Wt Mäuse (**Abb. 6A**) konnte trotz der in 3.1.1 nachgewiesenen geringen Menge endogener DNA im Serum keine Deposition von DNA in der marginalen Zone der Milz gezeigt werden. In der Milz von Wt Mäusen, die mit 40 μ g PicoGreen-markierter apoptotischer DNA i.v. behandelt wurden jedoch, konnte eine Anlagerung von DNA in der marginalen Zone nachgewiesen werden (**Abb. 6B**). Die hier gelb erscheinende Fluoreszenz ist auf eine spektrale Überlagerung der grünen Fluoreszenz für apoptotische DNA und der roten Fluoreszenz für CD11b+ Zellen zurückzuführen.

In der Immunfluoreszenzfärbung der Milz unbehandelter C4-/- Mäuse (**Abb. 6C**) konnte eine spontane Deposition von endogener DNA in der marginalen Zone der Milz und eine Kolo-kalisation mit CD11b+ Zellen nachgewiesen werden als eine spektrale Überlagerung der grünen Fluoreszenz für apoptotische DNA (grün) und der roten Fluoreszenz für CD11b+Zellen (rot).

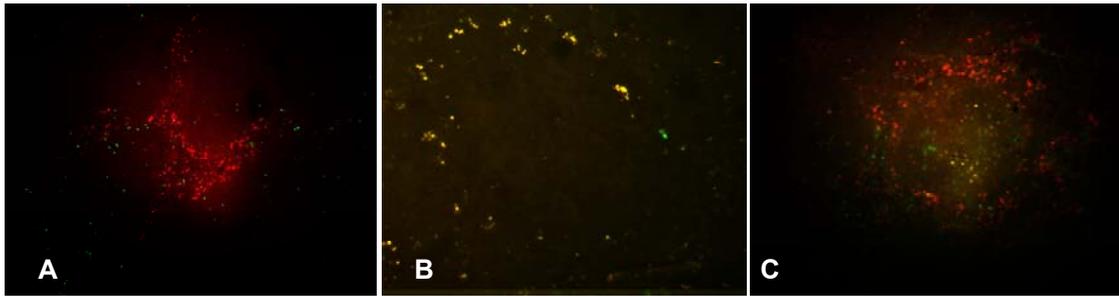


Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung der unbehandelten Milz von Wt und C4^{-/-} Mäusen.

A und C Immunfluoreszenzfärbung der Milz mit TUNEL-FITC (grün) und anti-CD11b-PE (rot).

B Immunfluoreszenzfärbung der Milz mit PicoGreen (grün) und anti-CD11b-PE (rot).

(A) In unbehandelten Wt Mäusen ist die Lokalisation der CD11b⁺ Zellen (rot) in der marginalen Zone mittels Färbung mit einem anti-CD11b⁺ Ak (anti-CD11b-PE) dargestellt. Es konnte keine spontane Deposition von endogener DNA mit TUNEL-FITC (grün) an der marginalen Zone nachgewiesen werden.

(B) In Wt Mäusen konnte mit der i.v. Applikation 40µg PicoGreen-markierter apoptotischer DNA (grün) eine Deposition der DNA an der marginalen Zone zusammen mit CD11b⁺ Zellen (rot) gezeigt werden. Die gelb erscheinende Fluoreszenz ist auf eine spektrale Überlagerung der grünen Fluoreszenz (apoptotische DNA) und der roten Fluoreszenz (CD11b⁺) zurückzuführen.

(C) In unbehandelten C4^{-/-} Mäusen ist die Lokalisation der CD11b⁺ Zellen (rot) in der marginalen Zone mittels Färbung mit einem anti-CD11b⁺ Ak (anti-CD11b-PE) dargestellt. Die gelb erscheinende Fluoreszenz deutet auf eine Deposition von endogener DNA hin und ist auf eine spektrale Überlagerung der grünen Fluoreszenz der endogenen DNA mit TUNEL-FITC und der roten Fluoreszenz der CD11b⁺ Zellen zurückzuführen. Dies weist auf eine spontane Deposition von endogener DNA an CD11b⁺ Zellen der marginalen Zone bei unbehandelten C4^{-/-} Mäusen hin.

3.1.3. Induktion von Lupus-assoziierten Zytokinen durch DNA

Ob bei C4^{-/-} Mäusen ein kausaler Zusammenhang zwischen dem spontan aktivierten IFN- α System und der gefundenen erhöhten endogenen DNA besteht, wurde untersucht, indem der Effekt der Applikation von *in vitro* hergestellter apoptotischer DNA oder durch Ultraschall-fragmentierte DNA auf die mRNA-Expression CD11b⁺ Zellen der Milz von IFN- α , IL-6, IL-12 und IRF-7 in Wt Mäusen gemessen wurde.

3.1.3.1. Kontrolle der Apoptoserate von PBS-induzierter Apoptose bei WEHI-231 Zellen im Durchflussfluoreszenzzytometer

Für die Herstellung von apoptotischer DNA wurden WEHI-231 Zellen zwischen 0h und 24h in PBS kultiviert und die Apoptoserate im Durchflussfluoreszenzzytometer kontrolliert. Die natürliche Apoptoserate, d.h. die Anzahl TUNEL-positiver Zellen unter physiologischen Konditionen im Medium lag bei 42,5%. Mit steigender Kulturdauer in PBS nahm die TUNEL-Positivität zu. Die höchste Apoptoserate wurde nach 24 Stunden mit 89% gemessen (**Abb. 7**).

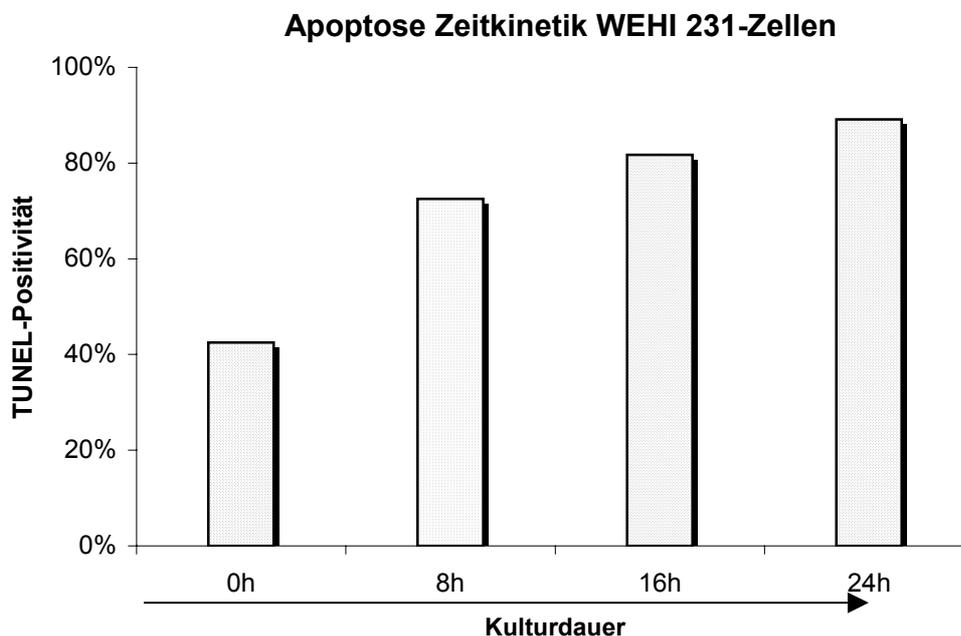


Abb. 7: Apoptose-Zeitkinetik von WEHI-231 Zellen: TUNEL-Positivität einer Langzeitkultur in PBS im Durchflusszytometer.

Die TUNEL-Positivität nahm mit steigender Kulturdauer zu. Unter physiologischen Konditionen in Medium waren bereits 42,5% der Zellen TUNEL-positiv. Nach 24 Stunden Kultur in PBS waren 89% aller Zellen apoptotisch.

3.1.3.2. Elektrophoretische Darstellung der Fragmentierung von DNA von WEHI-231 Zellen durch Apoptose oder Ultraschall

Zur qualitativen Kontrolle der DNA, die aus WEHI-231 Zellen isoliert wurde, diente die Durchführung einer Gelelektrophorese (**Abb. 8**). Dargestellt ist ein DNA-Molekulargewichtsmarker (123bp DNA-Leiter) (**Abb. 8A**), apoptotische DNA isoliert aus einer WEHI-231 Zellkultur nach 24h in PBS (**Abb. 8B**) und DNA isoliert aus einer physiologischen WEHI-231 Zellkultur und nach anschliessender Fragmentierung durch Ultraschall (**Abb. 8C**).

DNA wird im frühen Stadium der Apoptose durch Endonukleasen zu Fragmenten degradiert. Diese Endonukleasen schneiden spezifisch nur zwischen den Nukleosomen im Bereich der Linker-DNA, so dass Nukleosomeneinheiten verschiedener Länge (mindestens 200bp und ein Vielfaches davon) entstehen. Lässt man die DNA dann elektrophoretisch auf einem Gel laufen, zeigt sich eine charakteristische Leiter (Laddering) (**Abb. 8B**).

Eine Fragmentierung von DNA durch Ultraschall führt zu einer unspezifischen Degradierung der DNA in Fragmente undefinierter Grösse und zeigt somit im Gel kein Laddering (**Abb. 8C**).

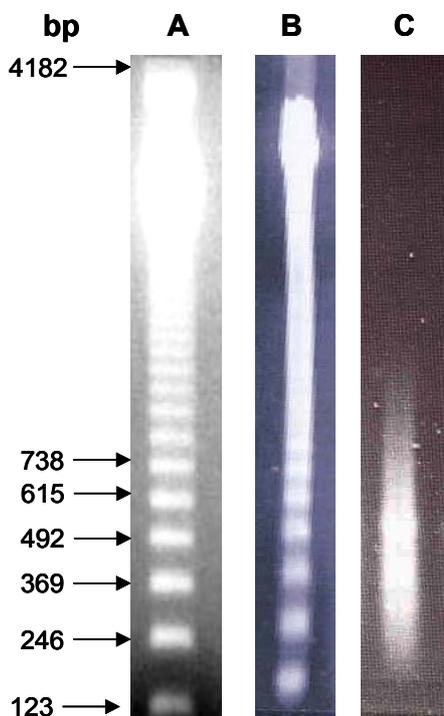


Abb. 8: Gelelektrophoretische Darstellung von DNA isoliert aus WEHI-231 Zellen nach Fragmentierung durch Apoptose oder Ultraschall.

Gelelektrophorese mit 10µl DNA [4µg] aus WEHI-231-Zellen aus physiologischer Kultur und nach US-Behandlung und DNA aus 24h PBS-Kultur.

(A) DNA-Molekulargewichtsmarker 123-bp Leiter
(B) DNA, isoliert nach 24 Stunden Zellkultur in PBS. Dargestellt ist die apoptotische DNA als Leiter von Fragmenten unterschiedlich definierter Grösse, die für die spezifische Degradierung von DNA bei der Apoptose charakteristisch ist.

(C) DNA, isoliert aus physiologischer Zellkultur. Dargestellt ist die DNA als einzelne Stücke undefinierter Länge, wie sie bei der unspezifischen Fragmentierung durch Ultraschallbehandlung entsteht.

3.1.3.3. Reinheitskontrolle der CD11b+ Zellfraktion

Für die Zytokin-Messungen mittels RT-PCR wurden mittels anti-CD11b-MACS-Beads CD11b+ Zellen aus der murinen Milz isoliert. Die Reinheit der CD11b+ und CD11b- Zellfraktionen wurde nach jeder Aufreinigung am Durchflusszytometer überprüft. Über die Aufreinigung wurde eine durchschnittliche Reinheit von ~90% erreicht (**Abb. 9**).

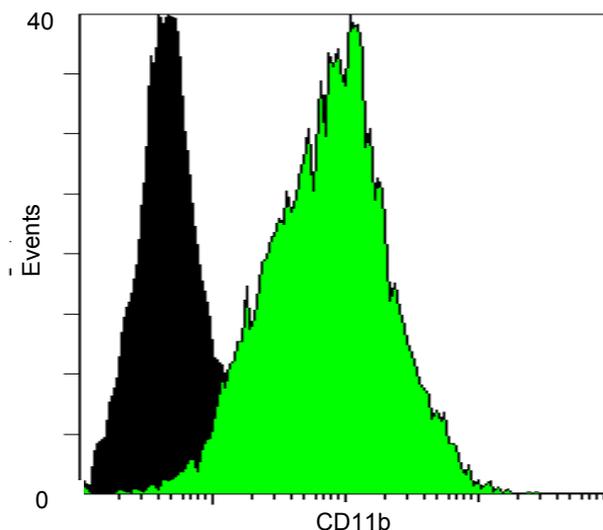


Abb. 9: Beispiel einer Reinheitskontrolle am Durchflussfluoreszenzzytometer nach Aufreinigung von CD11b-Zellen.

Über die Aufreinigung von CD11b-Zellen mittels anti-CD11b-MACS-Beads wurde eine durchschnittliche Reinheit von ~90% in der CD11b+ Fraktion (grün) erreicht. Die verbleibenden 10% der CD11b- Fraktion (schwarz) rekrutieren sich aus T- und B-Zellen.

3.1.3.4. Expression der mRNA von IFN- α , IL-6, IL-12 und IRF-7 in CD11b+ Zellen der Milz nach *in vivo* Applikation von DNA

Mit Hilfe von Real-time RT-PCRs sollte die Immunogenität von DNA auf Zytokinebene untersucht werden. Dazu wurden Wt Mäusen 4 μ g fragmentierte DNA i.v. injiziert. Die Fragmentierung wurde entweder durch Ultraschall (US) oder durch Apoptose erreicht. Nach 6 h wurde die Milz entnommen und CD11b+ Zellen isoliert.

Untersucht wurden IFN- α und Zytokine der angeborenen Immunantwort, welche bei SLE ebenfalls als auffallend erhöht beschrieben werden, wie IL-6 und IL-12. Die Untersuchung des Zytokins IRF-7 diente dem indirekten Nachweis von IFN- α . IRF-7 wird allgemein für eine effiziente IFN- α Antwort benötigt, nachdem es nach der Sezernierung des ersten Interferensubtyps exprimiert wird und dann dafür verantwortlich ist, dass 13 andere verschiedene IFN- α Subtypen gebildet werden.

Die Injektion US-fragmentierter DNA führte im Median (50%-Wert) zu einem insignifikanten Anstieg der IFN- α mRNA-Expression in CD11b+ Zellen um das 3,35-fache (**Abb. 10**). Bei 5% der Tiere waren die relativen Werte <0,01 und bei 5% >1620,50 (**Tab. 2**). Apoptotische DNA dagegen induzierte eine signifikant erhöhte IFN- α mRNA-Expression, die 15,41 mal höher als die konstitutive in unbehandelten Referenztieren war (**Abb. 10**). Dabei exprimierten 90% der Tiere zwischen 0,13 und 3082,28 mal mehr IFN- α mRNA als unbehandelte Tiere, wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,00 und 74,75 aufwiesen (**Tab. 2**). Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen behandelten und unbehandelten Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren IFN- α mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für IFN- α mRNA-Expression der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1) (**Abb. 11**). Bei unbehandelten Tieren lagen 50% über oder unter dem Normalwert ($n>30$). Bei 19 von 32 Tieren lag die relative IFN- α mRNA-Expression nach Applikation von US-fragmentierter DNA über dem relativen Wert aus dem Median der IFN- α mRNA-Expression unbehandelter Mäuse (~59%), während nach apoptotischer DNA bei 24 von 32 Tieren (~78%) eine gesteigerte Expression von IFN- α mRNA nachgewiesen wurde. Die IFN- α mRNA-Expression nach Applikation apoptotischer DNA zeigte sich auch signifikant höher als nach US-fragmentierter DNA (**Tab. 2**).

Die Messung von IL-6 ergab nach Behandlung mit US-fragmentierter DNA im Median eine 1,08 mal höhere und nach Applikation von apoptotischer DNA eine 1,65 mal

höhere mRNA-Expression als bei unbehandelten Referenztieren, wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,36 und 1,45 aufwiesen (**Abb. 12**). Bei 90% der Tiere lagen die relativen Werte nach Applikation von US-fragmentierter DNA zwischen 0,2 und 10,97 und nach Applikation von apoptotischer DNA zwischen 0,54 und 11,41 (**Tab. 3**). Beide DNA-Präparationen induzierten keine signifikant erhöhte IL-6 mRNA-Expression. Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen behandelten und unbehandelten Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren IL-6 mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für IL-6 mRNA-Expression der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1). Bei unbehandelten Tieren lagen 50% über oder unter dem Normalwert ($n > 20$) (**Tab. 3**). Nach Behandlung mit US-fragmentierter DNA wurden bei 13 von 25 Tieren (~52%) und nach Applikation von apoptotischer DNA bei 16 von 28 Tieren (~57%) eine höhere Expression von IL-6 mRNA, als es dem Median der relativen Werte unbehandelter Mäuse entspricht, nachgewiesen (**Abb. 13**).

Für IL-12 wurde eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression nachgewiesen, sowohl nach Applikation von US-fragmentierter (0,13-fach in Bezug auf unbehandelte Referenztiere) als auch nach apoptotischer DNA (0,14-fach in Bezug auf unbehandelte Referenztiere), wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,04 und 7,26 aufwiesen (**Abb. 14, Tab. 4**). Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen behandelten und unbehandelten Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren IL-12 mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für IL-12 der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1). Bei unbehandelten Tieren lagen 48% über und 52% bei oder unter dem Normalwert ($n > 30$). Nach Applikation von US-fragmentierter DNA lag bei 17 von 19 Tieren die IL-12 mRNA-Expression bei oder unter dem Normalwert der relativen Werte unbehandelter Mäuse (89%), während nach Applikation von apoptotischer DNA 26 von 29 Tieren (89%) eine verminderte Expression von IL-12 mRNA im Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigten (**Abb. 15**).

Für IRF-7 konnte nach Applikation von US-fragmentierter DNA im Median keine Steigerung der mRNA-Expression nachgewiesen werden im Vergleich zu unbehandelten Referenztieren (0,91-fach in Bezug auf unbehandelte Referenztiere), wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,48 und 13,52 aufwiesen. Die Applikation von apoptotischer DNA hatte ebenfalls keine

signifikant gesteigerte IRF-7 mRNA-Expression zur Folge (1,48-fach in Bezug auf unbehandelte Referenztiere) (**Abb. 16, Tab. 5**). Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen behandelten und unbehandelten Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren IRF-7 mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für IRF-7 mRNA-Expression der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1). Bei unbehandelten Tieren lagen 50% über oder unter dem Normalwert ($n > 20$). Nach Applikation von US-fragmentierter DNA lag bei 11 von 22 Tieren die IRF-7 mRNA-Expression bei oder unter dem Normalwert der relativen Werte unbehandelter Mäuse (~50%), während nach apoptotischer DNA 20 von 28 Tieren (~71%) eine gesteigerte Expression von IRF-7 mRNA im Vergleich zu unbehandelten Tieren zeigten (**Abb. 17**).

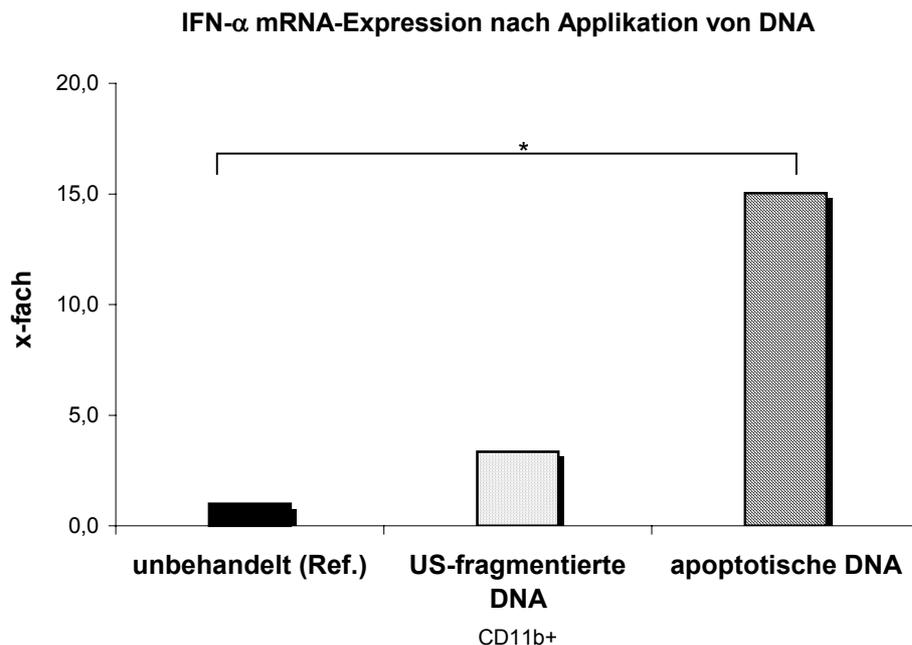


Abb. 10: IFN- α mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von Wt Mäusen, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Die Applikation von 4 μ g US-fragmentierter DNA führte zu einer 3,35-fach höheren mRNA-Expression von IFN- α als bei unbehandelten Tieren (n=31, *p>0,05). Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte eine signifikante Erhöhung der IFN- α mRNA-Expression um das 15,00-fache im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (n=34, *p<0,05).

IFN- α	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p	
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,00	74,75		
US-fragmentierte DNA	3,35	0,01	1620,50	0,17	
apoptotische DNA	15,41	0,13	3082,28	0,0006	0,0077

Tab. 2: Darstellung des Medians der relativen Werte für IFN- α nach Applikation 4 μ g apoptotischer oder US-fragmentierter DNA und CD11b-Aufreinigung, bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten Median aus den ΔC_T -Werten für IFN- α unbehauelter Mäuse.

Der Median der ΔC_T -Werte für IFN- α unbehauelter Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert für IFN- α nach Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA oder 4 μ g US-fragmentierter DNA (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz

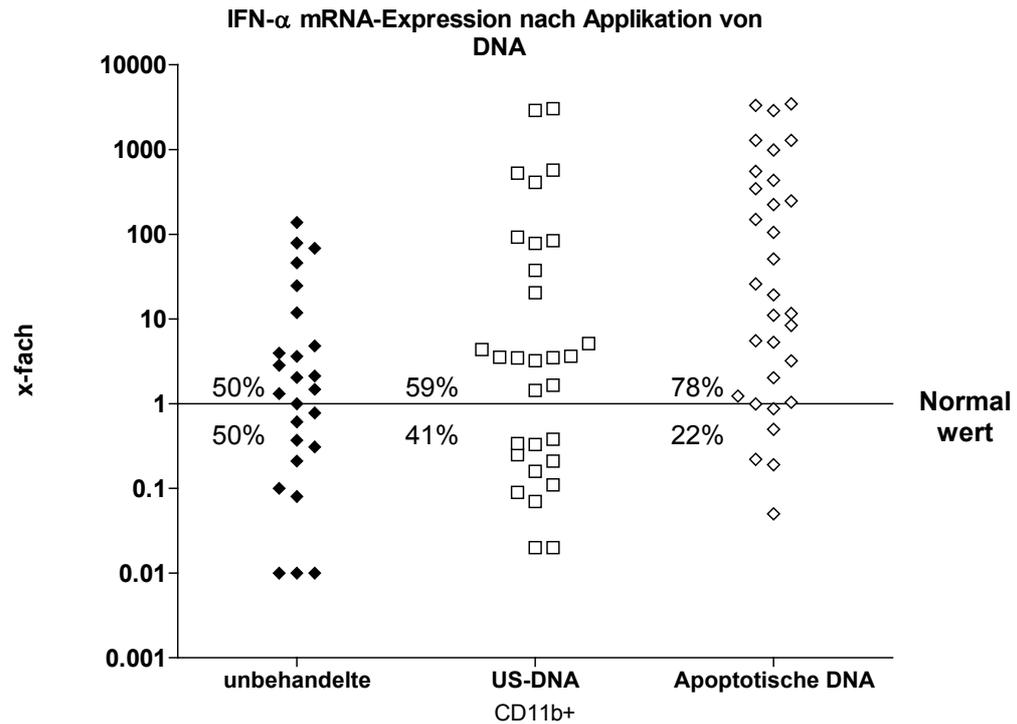


Abb. 11: IFN- α mRNA-Expression in CD11b+ Zellen einzelner Wt Mäuse, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). Bei unbehandelten Tieren haben 50% eine entsprechende oder höhere IFN- α mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n > 30$). Die Applikation von 4 μ g US-fragmentierter DNA führte bei 59% der Tiere zu einer höheren IFN- α mRNA-Expression als bei unbehandelten ($n > 30$). Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte bei 78% der Mäuse eine höhere IFN- α mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n > 30$).

IL-6 mRNA-Expression nach Applikation von DNA

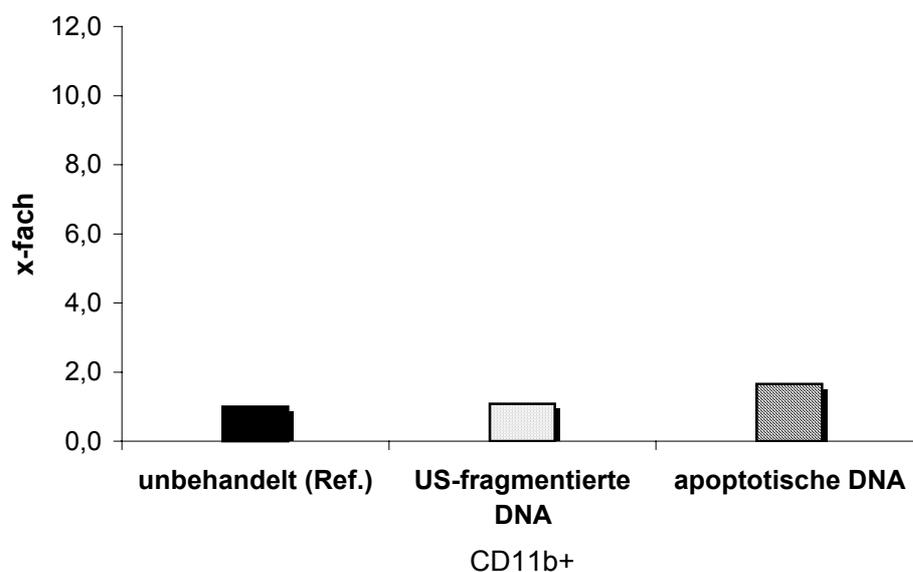


Abb. 12: IL-6 mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von Wt Mäusen, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Die Applikation von 4µg US-fragmentierter DNA führte zu einer 1,08-fachen mRNA-Expression von IL-6 als bei unbehandelten Tieren. Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte eine IL-6 mRNA-Expression um das 1,65-fache im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Die Unterschiede sind nicht signifikant ($n > 20$, $*p > 0,05$).

IL-6	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=	
unbehandelt (Ref.)	(Ref.) 1,0	0,36	1,45		
US-fragmentierte DNA	1,08	0,2	10,97	0,51	
apoptotische DNA	1,65	0,54	11,41	0,05	0,173

Tab. 3: Darstellung des Medians der relativen Werte für IL-6 nach Applikation 4µg apoptotischer oder US-fragmentierter DNA und CD11b-Aufreinigung, bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten Median aus den ΔC_T -Werten für IL-6 unbehandelter Mäuse.

Der Median der ΔC_T -Werte für IL-6 unbehandelter Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert für IL-6 nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA oder 4µg US-fragmentierter DNA (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

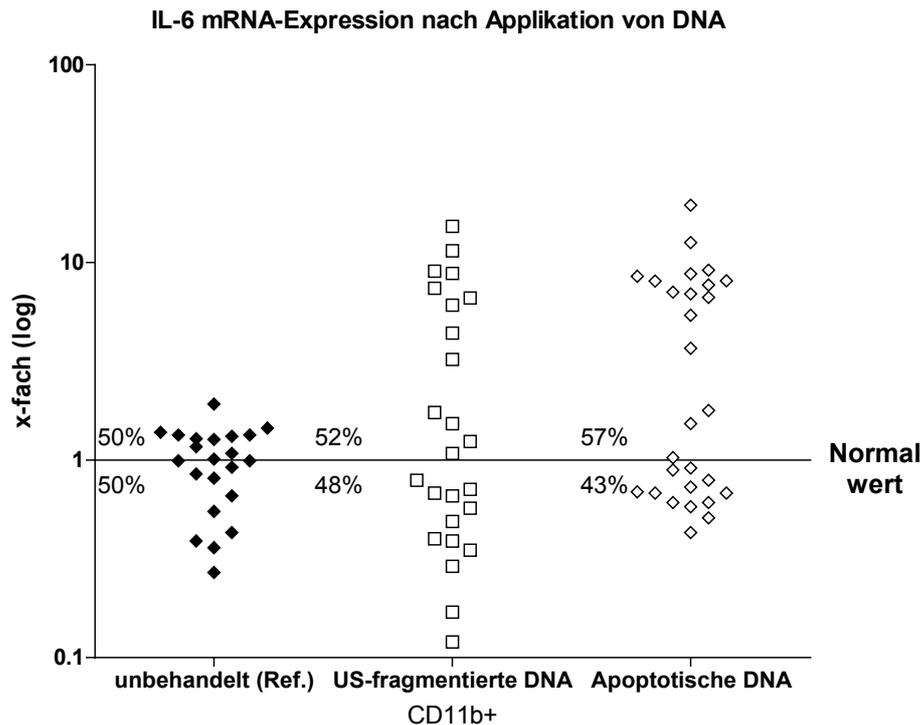


Abb. 13: IL-6 mRNA-Expression in CD11b+ Zellen einzelner Wt Mäuse, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). Bei unbehandelten Tieren haben 50% eine entsprechende oder höhere IL-6 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n > 20$). Die Applikation von $4\mu\text{g}$ US-fragmentierter DNA führte bei 52% der Tiere zu einer höheren IL-6 mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n > 20$). Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte bei 57% der Mäuse eine höhere IL-6 mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n > 20$).

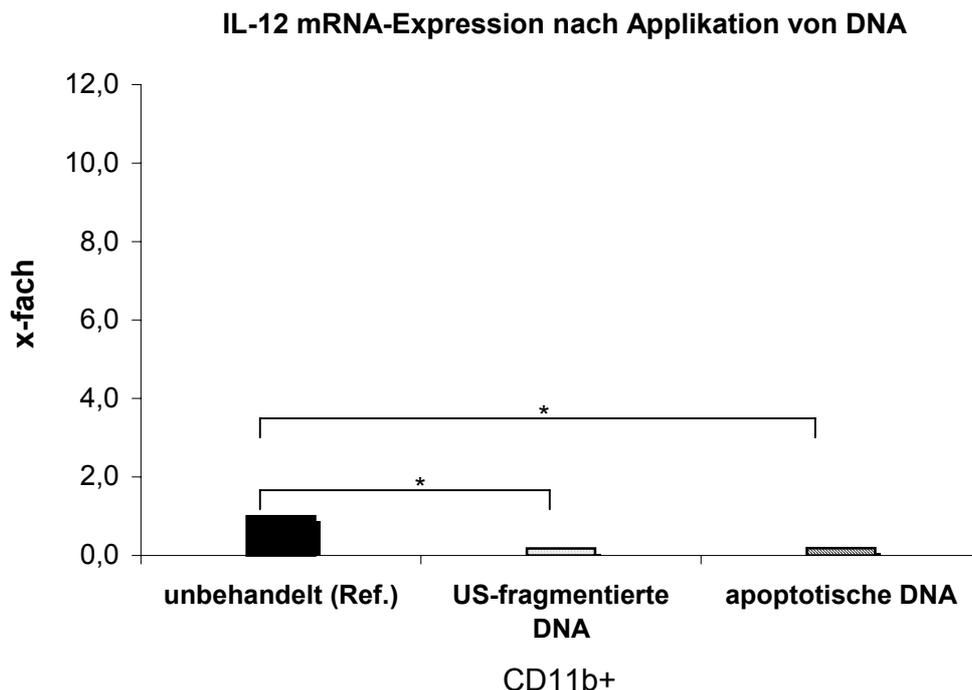


Abb. 14: IL-12 mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von Wt Mäusen, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Die Applikation von 4µg US-fragmentierter DNA führte zu einer um den Faktor 0,13 erniedrigten mRNA-Expression von IL-12 als bei unbehandelten Tieren. Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte eine um den Faktor 0,14 erniedrigten IL-12 mRNA-Expression als bei unbehandelten Mäusen. Die Unterschiede sind signifikant ($n > 15$, $*p < 0,05$).

IL-12	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,04	7,26	
US-fragmentierte DNA	0,13	0,02	1,51	0,0029
apoptotische DNA	0,14	0,02	1,93	0,0010

Tab. 4: Darstellung des Medians der relativen Werte für IL-12 nach Applikation 4µg apoptotischer oder US-fragmentierter DNA und CD11b-Aufreinigung, bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten Median aus den ΔC_T -Werten für IL-12 unbehalteter Mäuse.

Der Median der ΔC_T -Werte für IL-12 unbehalteter Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert für IL-12 nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA oder 4µg US-fragmentierter DNA (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

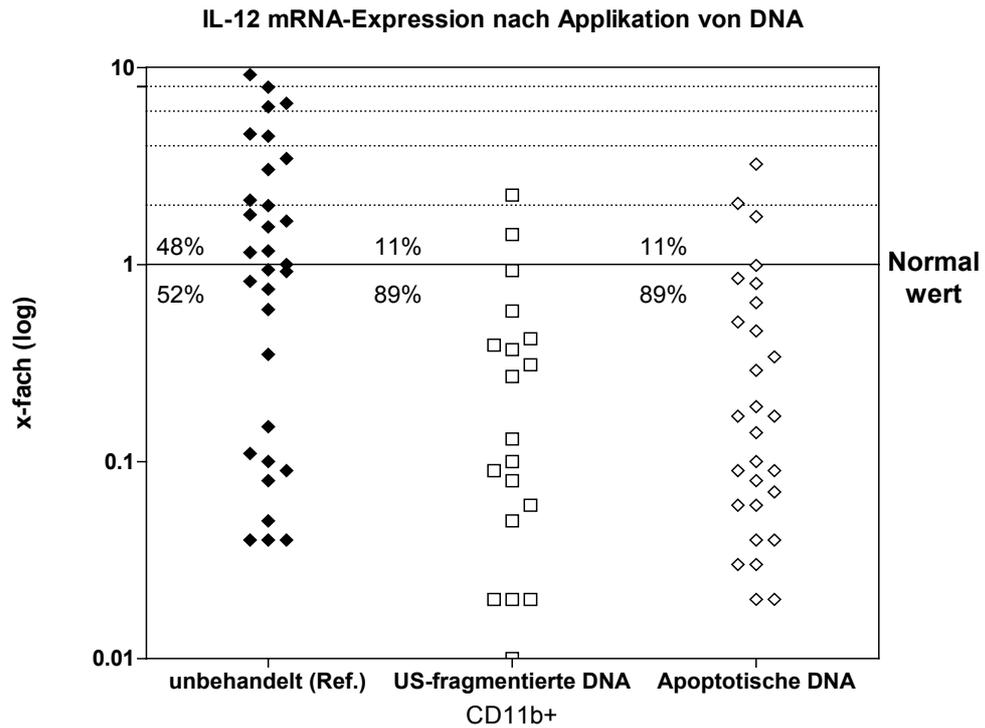


Abb. 15: IL-12 mRNA-Expression in CD11b+ Zellen einzelner Wt Mäuse, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). Bei unbehandelten Tieren haben 48% eine höhere und 52% eine entsprechende oder niedrigere IL-12 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n > 30$). Die Applikation von 4 μ g US-fragmentierter DNA führte bei 89% der Tiere nicht zu einer höheren IL-12 mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n > 15$). Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte bei 89% der Mäuse keine gesteigerte IL-12 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren ($n > 20$).

IRF-7 mRNA-Expression nach Applikation von DNA

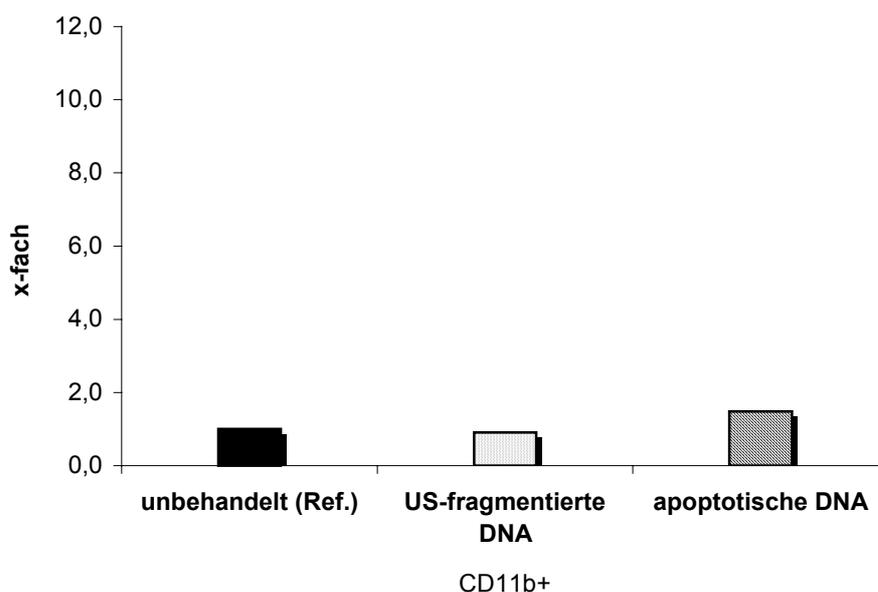


Abb. 16: IRF-7 mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von Wt Mäusen unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Die Applikation von 4µg US-fragmentierter DNA führte zu einer um den Faktor 0,91 erniedrigten mRNA-Expression von IRF-7 als bei unbehandelten Tieren. Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte im Vergleich zu unbehandelten Mäusen eine höhere IRF-7 mRNA-Expression um das 1,48-fache (n > 25).

IRF-7	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p	
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,48	13,52		
US-fragmentierte DNA	0,91	0,42	2,72	0,3142	
apoptotische DNA	1,48	0,48	27,5	0,4461	0,065

Tab. 5: Darstellung des Medians der relativen Werte für IRF-7 nach Applikation 4µg apoptotischer oder US-fragmentierter DNA und CD11b-Aufreinigung, bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten Median aus den ΔC_T-Werten für IRF-7 unbehalteter Mäuse.

Der Median der ΔC_T-Werte für IRF-7 unbehalteter Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert für IRF-7 nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA oder 4µg US-fragmentierter DNA (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

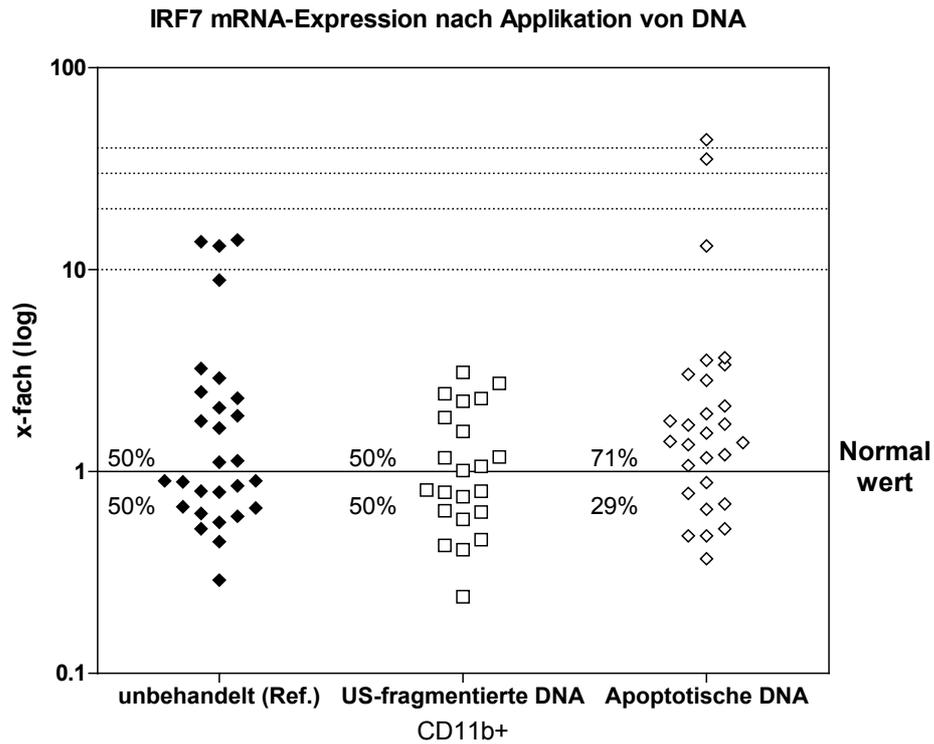


Abb. 17: IRF-7 mRNA-Expression in CD11b+ Zellen einzelner Wt Mäuse, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation verschiedener DNA-Präparationen.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). Bei unbehandelten Tieren haben 50% eine entsprechende oder höhere IRF-7 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n > 30$). Die Applikation von $4\mu\text{g}$ US-fragmentierter DNA führte bei 50% der Tiere nicht zu einer höheren IRF-7 mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n > 20$). Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte bei 71% der Mäuse eine gesteigerte IRF-7 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren ($n > 20$).

3.1.4. Untersuchung zur Induzierbarkeit von Autoantikörpern durch apoptotische DNA

Vorangehende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten ein spontan aktiviertes Typl-Interferonsystem für C4-defiziente Mäuse bereits in einem Alter von vier Wochen, lange bevor diese ab etwa dem achten Lebensmonat beginnen, Autoantikörper gegen dsDNA zu generieren. Die Applikation von apoptotischer DNA in Wt Mäuse führte in dieser Arbeit zu einer gesteigerten mRNA-Expression von IFN- α (s. 3.1.3.4). Hier sollte untersucht werden, ob apoptotische DNA über die Aktivierung des Typl-Interferonsystems Toleranz überwinden und langfristig zur Entstehung von Autoimmunität führen kann.

Apoptose wurde in DNA *in vitro* induziert, aufgereinigt und anschliessend in der ersten Woche alle zwei Tage, insgesamt 5 mal, in die Maus appliziert. Zur Kontrolle wurde Apoptose *in vivo* mittels der einmaligen Applikation von 500 μ l Pristane i.p. induziert, da es zu einer Generierung von Lupus-assoziierten Antikörpern führt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung (Tag 0, 10, 27 und nach 6 Monaten) erfolgte eine Blutentnahme zur Serumgewinnung.

Der quantitative Nachweis von IgG-Autoantikörpern gegen dsDNA wurde im ELISA durchgeführt. Eine qualitative Untersuchung anti-nukleärer Antikörper (ANA) gegen dsDNA und extrahierbare nukleäre Antigene (ENA), die bei SLE in 80-100% der Fälle nachgewiesen werden können, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz auf einer humanen Larynxepithelkarzinom-Zelllinie (HEp2) durchgeführt. Durch die erhöhte Teilungsaktivität der Tumorzellen können sämtliche Stadien der mitotischen Zellteilung dargestellt werden. Demnach ergeben sich unterschiedliche Immunfluoreszenzmuster, je nach Lokalisation des Antigens im Zellkern, welche einen ersten Hinweis auf die Spezifität vorhandener Antikörper geben.

Während innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 6 Monaten bei PBS-behandelten Mäusen gleichen Alters keine spontane Bildung von IgG anti-dsDNA zu verzeichnen war, führte die Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA i.v. zu einer signifikanten dauerhaften Immunantwort. Die fünf-malige Applikation von apoptotischer DNA induzierte eine erste messbare IgG-Immunantwort gegen dsDNA am Tag 10, die sich bis Tag 27 noch erhöhte und nach 6 Monaten Höchstwerte erreichte (**Abb. 18**). 6 Monate nach der Immunisierung konnten bei 90% der Tiere ANAs nachgewiesen werden (**Abb. 19**), wovon 70% eine einheitliche homogene nukleäre Fluoreszenz der Interphasezellen zeigen und eine positive Färbung des kondensierten mitotischen

Chromatins der Zellen in der Metaphase, was auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen dsDNA hinweist (**Abb. 19A**). Bei zwei Seren lag ein nicht homogenes, sondern ein granuläres Kernfluoreszenzmuster vor und deutet auf Antikörper gegen Ribonukleoproteine hin (Antikörper gegen das Smith-Antigen? s. 1.2) (**Abb. 19B** und **C**). Ein anderes Serum zeigte keine chromosomenassoziierte, sondern eine extranukleäre cytoplasmatische Fluoreszenz mit negativem mitotischen Chromatin der Zellen in der Metaphase (**Abb. 19D**), wie es bei 10-20% der SLE-Patienten vorkommt, was auf Antikörper gegen ribosomale P-Proteine schliessen lässt.

Die Behandlung mit 500µl Pristane i.p. erzeugte ebenfalls eine signifikante stabile Autoimmunantwort gegen dsDNA, nachweislich im ELISA nach 6 Monaten, wobei allerdings im Gegensatz zu *in vitro* induzierter apoptotischer DNA keine erste Immunantwort nach 10 oder 27 Tagen messbar war, wohl aber nach 6 Monaten (**Abb. 18**). 6 Monate nach Pristane-Gabe waren ausserdem 38% der Mäuseren ANA-positiv (**Abb. 20**), davon 66% mit nukleär homogenem Fluoreszenzmuster (**Abb. 20A** und **B**) und Fluoreszenz-positivem mitotischem Chromatin (**Abb. 20B**) und 34% mit einem homogenen Fluoreszenzmuster der Nukleolen bei gleichzeitiger feingranulärer Anfärbung des Nukleoplasmas, was Antikörper gegen PM-1 vermuten lässt (extrahierbares nukleäres Polymyositis-Antigen), der eigentlich ein Markerantikörper für den Overlap zwischen Polymyositis und Sklerodermie ist, aber auch schon bei Lupus-Patienten beschrieben wurde (**Abb. 20C**). 62% aller immunisierten Mäuse wiesen Antikörper auf, die ein extranukleäres cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster ergeben und mitotisches Chromatin nicht anfärbten (**Abb. 20D**).

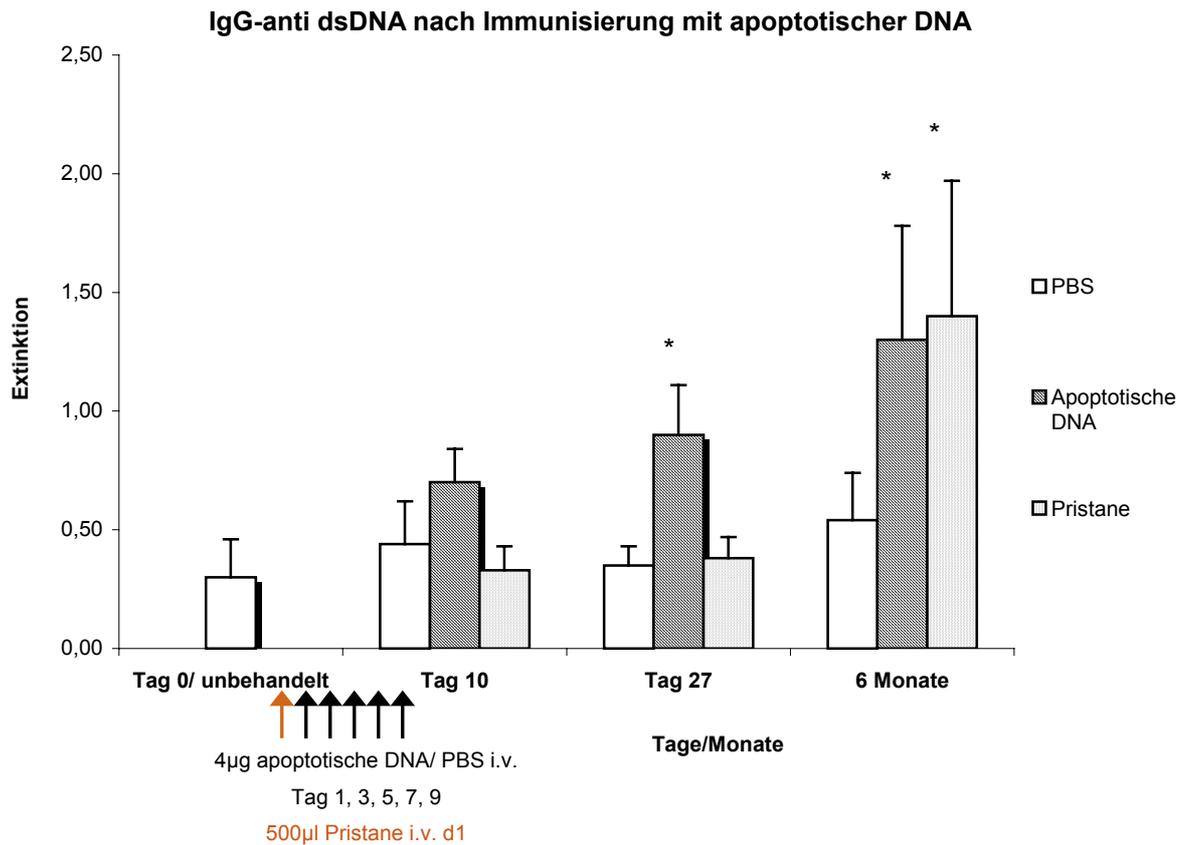


Abb. 18: IgG-anti dsDNA-Nachweis im ELISA nach Immunisierung von Wt Mäusen mit apoptotischer DNA über einen Zeitraum von 6 Monate.

Die Applikation von insgesamt 5 mal 4µg apoptotischer DNA i.v. erfolgte alle zwei Tage in dem Zeitraum Tag 0-10. Die Applikation von 500µl Pristane i.p. erfolgte an Tag 1. Die Blutentnahme wurde vor der ersten Applikation (Tag 0) und nach der Applikation, an den Tagen 10, 27 und nach 6 Monaten vorgenommen. Nach der letzten Applikation von apoptotischer DNA war ab Tag 27 eine signifikante IgG anti-dsDNA Immunantwort messbar, die sich im beobachteten Zeitraum von 6 Monaten verstärkte und als dauerhaft etablierte ($n=6$, $*p$ (Tag 27)=0,0286, $*p$ (6 Monate)=0,0095). Im gemessenen Zeitraum war nach Applikation von Pristane nach 6 Monaten eine signifikant erhöhte Generierung von Autoantikörpern gegen dsDNA nachweisbar ($n>6$, $*p$ (6 Monate)=0,0121).

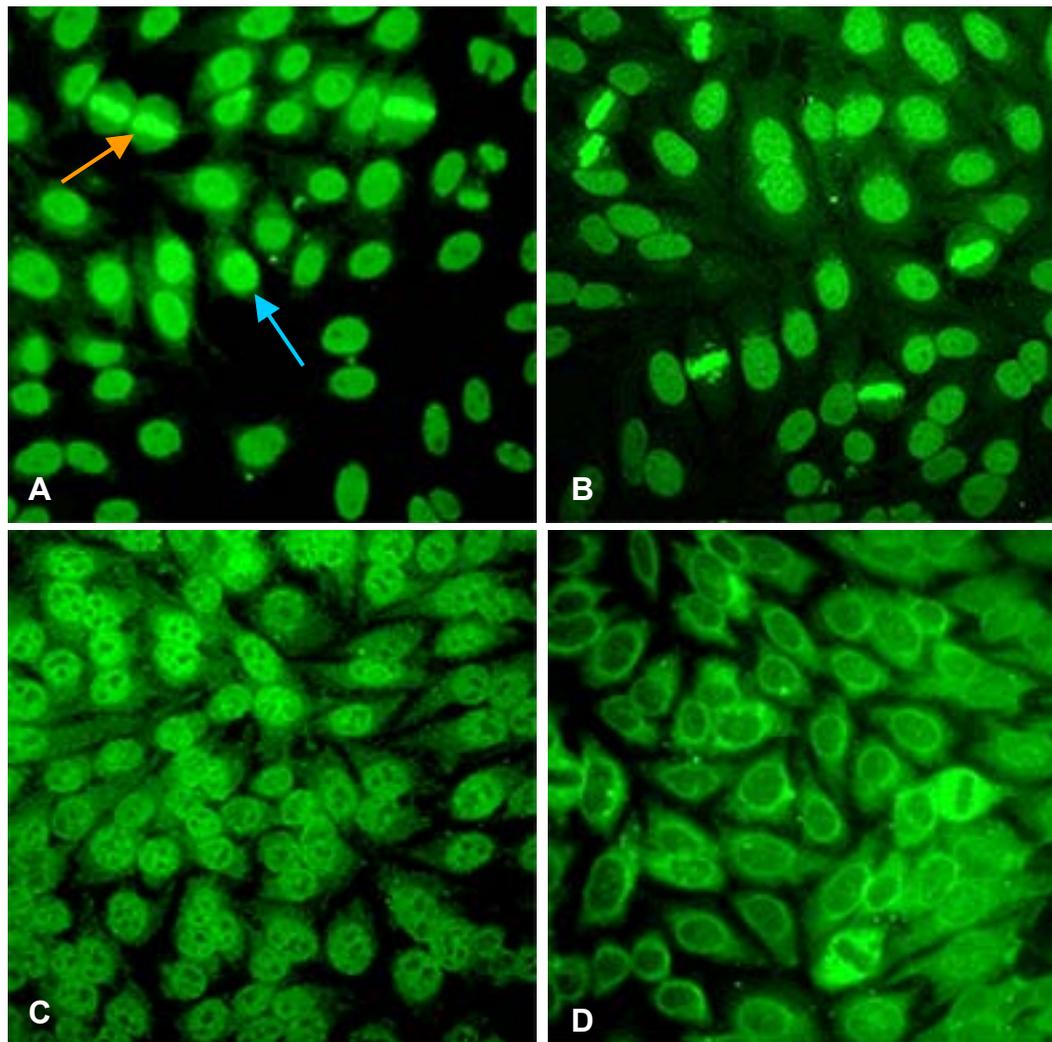


Abb. 19: Immunfluoreszenznachweis von ANA auf HEp2-Zellen 6 Monate nach Immunisierung von Wt Mäusen mit apoptotischer DNA.

Applikation von 4µg apoptotischer DNA i.v. an Tag 1, Tag 3, Tag 5, Tag 7, Tag 9. Nach 6 Monaten erfolgte eine Blutentnahme. Dargestellt sind beispielhaft die Fluoreszenzmuster von 4 verschiedenen Seren (A-D). 90% der immunisierten Mäusen waren ANA-positiv. Davon zeigten 70% ein homogen nukleäres Muster (Pfeil blau) und waren Fluoreszenz-positiv für mitotisches Chromatin (Pfeil orange) (A), 10% zeigten ein feingranuläres Muster (B) und 10% ein grobgranuläres Muster (C). 10% der immunisierten Mäuse wiesen Antikörper auf, die ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster ergeben (D) und mitotisches Chromatin nicht anfärbten.

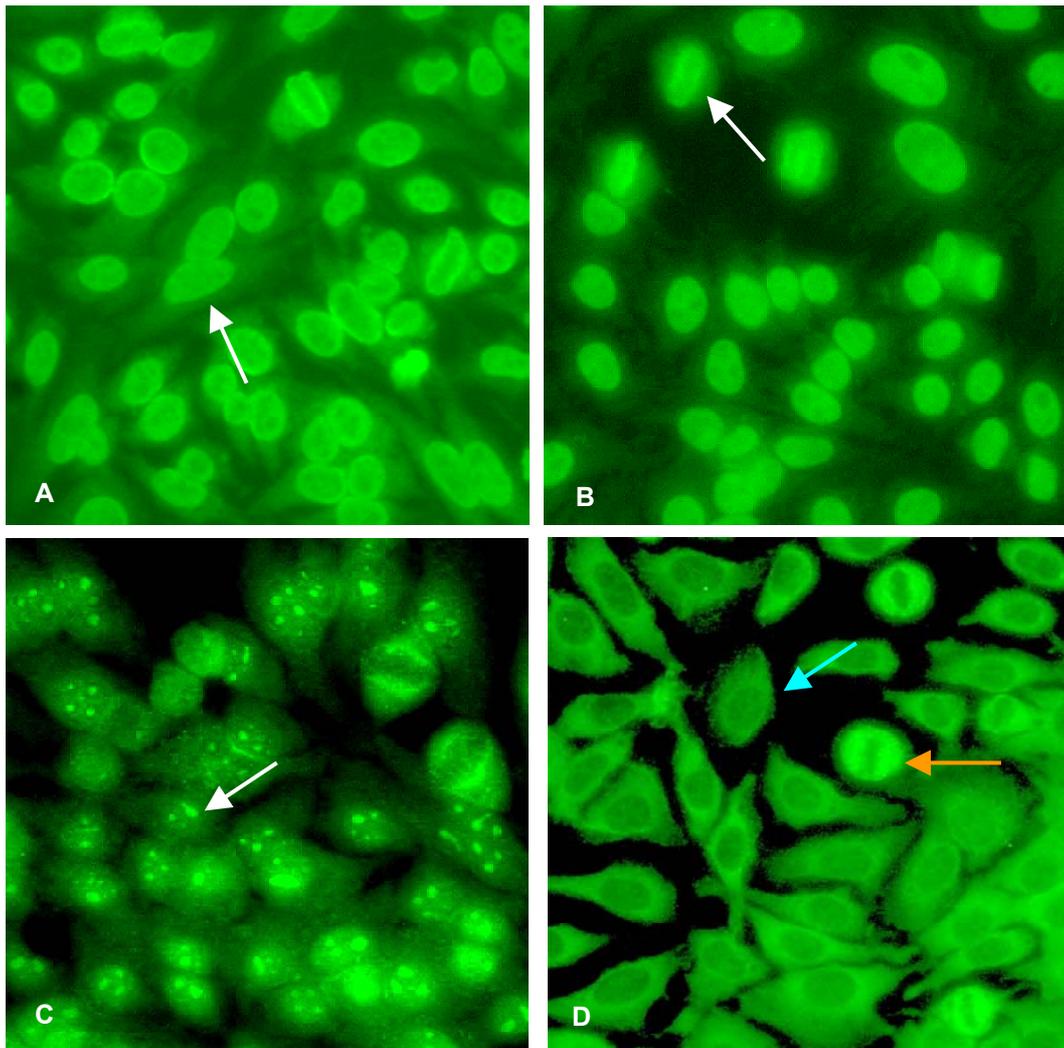


Abb. 20: Immunfluoreszenznachweis von ANA auf HEp2-Zellen 6 Monate nach Immunisierung von Wt Mäusen mit Pristane.

Applikation von 500 μ l Pristane i.p. an Tag 1. Nach 6 Monaten erfolgte eine Blutentnahme. Dargestellt sind beispielhaft die Fluoreszenzmuster von 4 verschiedenen Seren (A-D). 38% der Seren waren ANA-positiv. Davon 66% mit nukleär homogenem Fluoreszenzmuster (A und B) und Fluoreszenz-positivem mitotischem Chromatin (B). 34% zeigten ein homogenes Fluoreszenzmuster der Nucleolen bei gleichzeitiger feingranulärer Anfärbung des Nucleoplasmas (C). 62% der immunisierten Mäuse wiesen Antikörper auf, die ein extranukleäres cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster ergeben (Pfeil blau) und mitotisches Chromatin nicht anfärbten (Pfeil orange) (D).

3.2. Untersuchung zum Mechanismus der IFN- α Induktion durch apoptotische DNA *in vivo*

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass eine Aktivierung von CD11b+ Zellen der marginalen Zone durch DNA-enthaltende Immunkomplexe zur Produktion von IFN- α auf besondere Rezeptoren angewiesen zu sein scheint, da die Lokalisation des T-Zell-unabhängigen Antigens TNP-Ficoll nicht zu einer Aktivierung von IFN- α führte¹²⁶. Andere Arbeitsgruppen haben bereits *in vitro* gezeigt, dass einer der Aktivierungswege für Chromatin- bzw. DNA-enthaltende Immunkomplexe über den TLR9 führt¹²⁷⁻¹²⁹. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob TLR9 bei der Induktion von IFN- α durch apoptotische DNA auch *in vivo* eine Rolle spielt.

3.2.1. Die Bedeutung des TLR9-Rezeptors für die durch apoptotische DNA vermittelte IFN- α Induktion

Vorangehende Publikationen haben bereits gezeigt, dass TLR9 *in vitro* der signaltransduzierende Rezeptor für die Typ1-Interferonaktivierung durch Nukleinsäuren ist. Mittels der Real-time RT-PCR für IFN- α wurde in dieser Arbeit die Rolle des TLR9-Rezeptors bei der Aktivierung des Typ1-Interferonsystems durch apoptotische DNA *in vivo* untersucht. Dazu wurde TLR9-defizienten (TLR9^{-/-}) Mäusen 4 μ g apoptotische DNA i.v. injiziert, nach 6 h die Milz entnommen und CD11b+ Zellen isoliert.

Nach Applikation von apoptotischer DNA war die IFN- α mRNA-Expression in TLR9^{-/-} Mäusen um den Faktor 0,23 niedriger als bei unbehandelten Tieren, wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,02 und 3,27 aufwiesen (**Abb. 21**). 90% der relativen Werte nach Applikation von apoptotischer DNA lagen in einem Bereich zwischen 0,00 und 3,95 (**Tab. 6**). Es besteht somit kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Tieren. Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen behandelten und unbehandelten Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren IFN- α mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für IFN- α mRNA-Expression der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1). Bei unbehandelten Tieren lagen 50% über oder unter dem Normalwert (n=8). Nach Applikation von apoptotischer DNA lag bei 12 von 17 Tieren die IFN- α mRNA-Expression bei oder unter dem Normalwert unbehandelter Mäuse (~77%). Bei 4 von 17 Tieren (~23%) wurde eine höhere IFN- α mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren gemessen (**Abb. 22**).

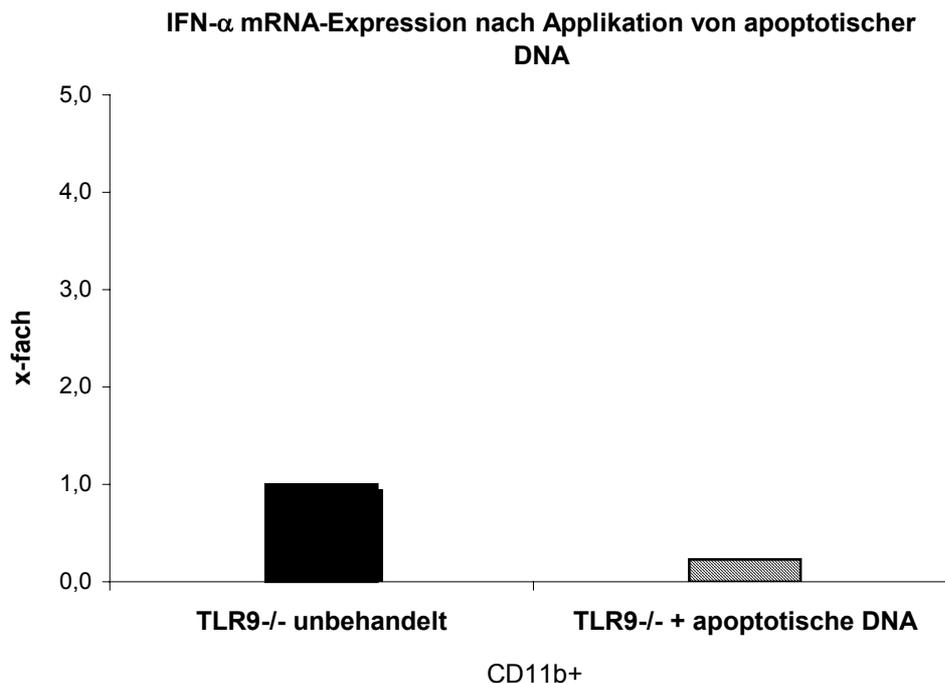


Abb. 21: IFN- α mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von TLR9-/- Mäusen unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation von apoptotischer DNA.

Die Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA in TLR9-/- Mäuse führte zu einer um den Faktor 0,23 erniedrigten mRNA-Expression von IFN- α als bei unbehandelten Tieren. Es besteht kein signifikanter Unterschied (n=16, *p>0,05).

IFN- α	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
TLR9-/- unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,02	3,27	
TLR9-/- + apoptotische DNA	0,23	0,00	3,95	0,07

Tab. 6: Darstellung des Medians der relativen Werte für IFN- α CD11b+ Zellen von TLR9-/- Mäusen nach i.v. Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA bezogen auf den als Referenz gesetzten Median aus den ΔC_T -Werten für IFN- α in CD11b+ Zellen unbehandelter TLR9-/- Mäuse.

Der Median der ΔC_T -Werte für IFN- α unbehandelter TLR9-/- Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert von IFN- α nach Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

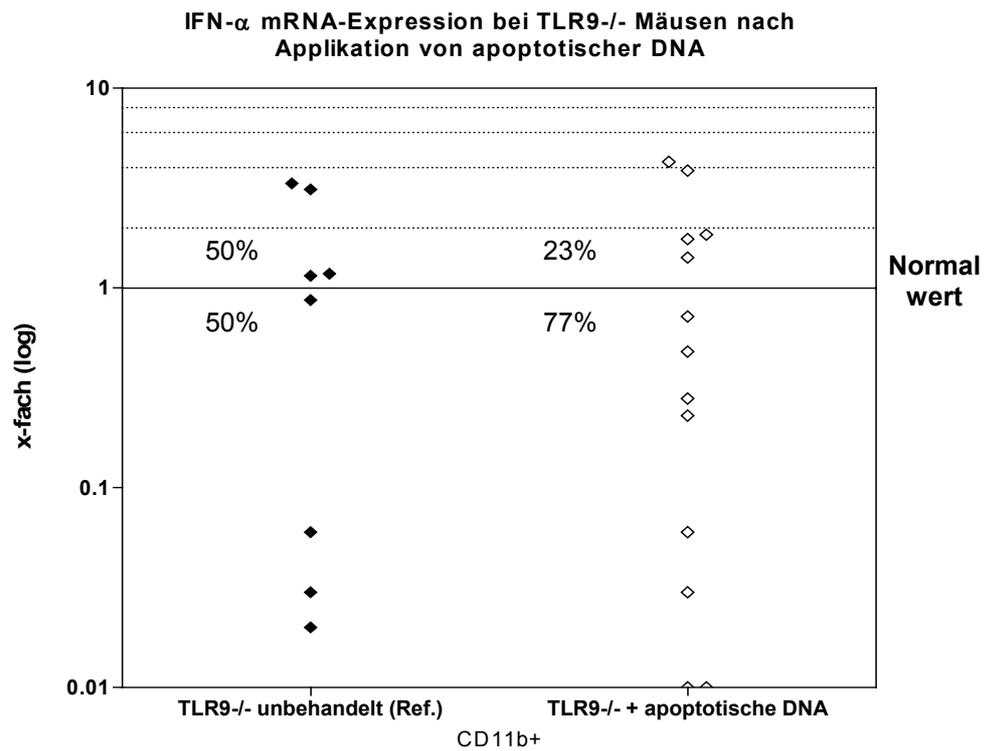


Abb. 22: IFN- α mRNA-Expression in CD11b+ Zellen von TLR9-/- Mäusen unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation von apoptotischer DNA.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). Bei unbehandelten Tieren haben 50% eine entsprechende oder höhere IFN- α mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe (n=8). Die Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA induzierte bei 77% der Tiere keine gesteigerte mRNA-Expression von IFN- α im Vergleich zu unbehandelten Tieren (n=17).

3.2.2. Der Einfluss von apoptotischer DNA auf die Expression des TLR9

Da in 3.2.1 die Abhängigkeit der IFN- α Induktion durch apoptotische DNA von der Signaltransduktion über TLR9 nachgewiesen wurde, sollte mittels Real-time RT-PCR untersucht werden, ob apoptotische DNA auch einen Einfluss auf die mRNA-Expression des Rezeptors ausübt. Dazu wurde Wt Mäusen 4 μ g apoptotische DNA i.v. injiziert, nach 6 h die Milz entnommen und CD11b+ Zellen isoliert. Ebenfalls gemessen wurde die mRNA-Expression des TLR3, der zwar RNA bindet, jedoch ebenfalls die Produktion von Typ1-Interferonen vermittelt.

Die Injektion apoptotischer DNA führte im Vergleich zu unbehandelten Mäusen im Median zu einer 0,39-fach erniedrigten TLR3 mRNA-Expression in CD11b+ Zellen (n=25), wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,30 und 3,29 aufwiesen (**Abb. 23**). Bei 5% der Tiere waren die relativen Werte nach i.v. Applikation von apoptotischer DNA <0,08 und bei 5% >2,86 (**Tab. 7**). Die TLR9 mRNA-Expression wurde durch apoptotische DNA signifikant erhöht, sie war im Median 2,82 mal höher als die Konstitutive in unbehandelten Referenztieren (n=32), wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,54 und 3,32 aufwiesen (n=11) (**Abb. 23**). 90% der Tiere exprimierten nach Applikation von apoptotischer DNA zwischen 0,46 und 39,35 mal mehr TLR9 mRNA als unbehandelte Tiere (**Tab. 7**).

Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen behandelten und unbehandelten Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren TLR3 oder TLR9 mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für TLR3 oder TLR9 der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1). Bei unbehandelten Tieren zeigten 55% eine höhere TLR3 mRNA-Expression als der Normalwert der Gesamtstichprobe (n=9). Nach Applikation von apoptotischer DNA exprimierten 80% der Tiere entsprechend oder insignifikant weniger TLR3 als unbehandelte Mäuse (**Abb. 24A**). Für TLR9 lag die mRNA-Expression bei 54% der unbehandelten Tieren über und bei 46% bei oder unter dem Normalwert. Nach Applikation apoptotischer DNA zeigten 78% der Mäuse eine signifikant gesteigerte TLR9 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Referenztieren (**Abb. 24B**).

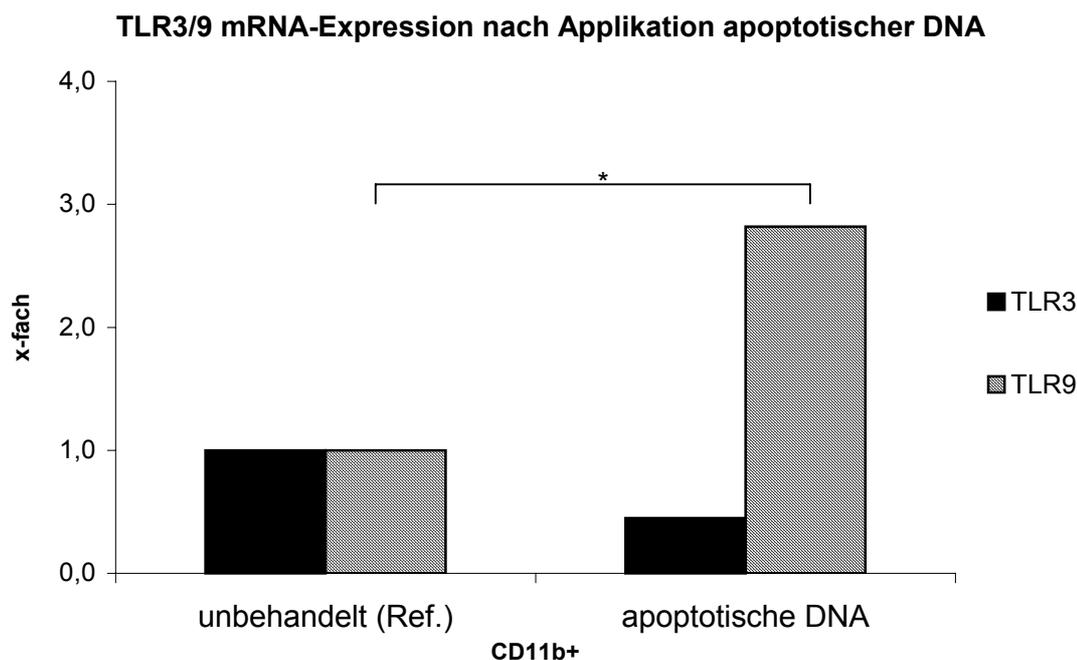


Abb. 23: TLR3 und TLR9 mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von Wt Mäusen, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation apoptotischer DNA.

Die Applikation von 4µg apoptotischer DNA führte zu einer um den Faktor 0,39 erniedrigten mRNA-Expression von TLR3 als bei unbehandelten Tieren (n=25, *p>0,05). Die gleiche Menge apoptotische DNA induzierte eine signifikante Erhöhung der TLR9 mRNA-Expression um das 2,82-fache im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (n=32, *p<0,05).

TLR3	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,30	3,29	
apoptotische DNA	0,39	0,08	2,86	0,079
TLR9	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,54	3,32	
apoptotische DNA	2,82	0,46	39,35	0,027

Tab. 7: Darstellung des Medians der relativen Werte für TLR3 und TLR9 nach i.v. Applikation 4µg apoptotischer DNA und CD11b-Aufreinigung, bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten Median aus den ΔC_T -Werten für TLR3 oder TLR9 unbehaltener Mäuse.

Der Median der ΔC_T -Werte für TLR3 und TLR9 unbehaltener Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert für TLR3 und TLR9 nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

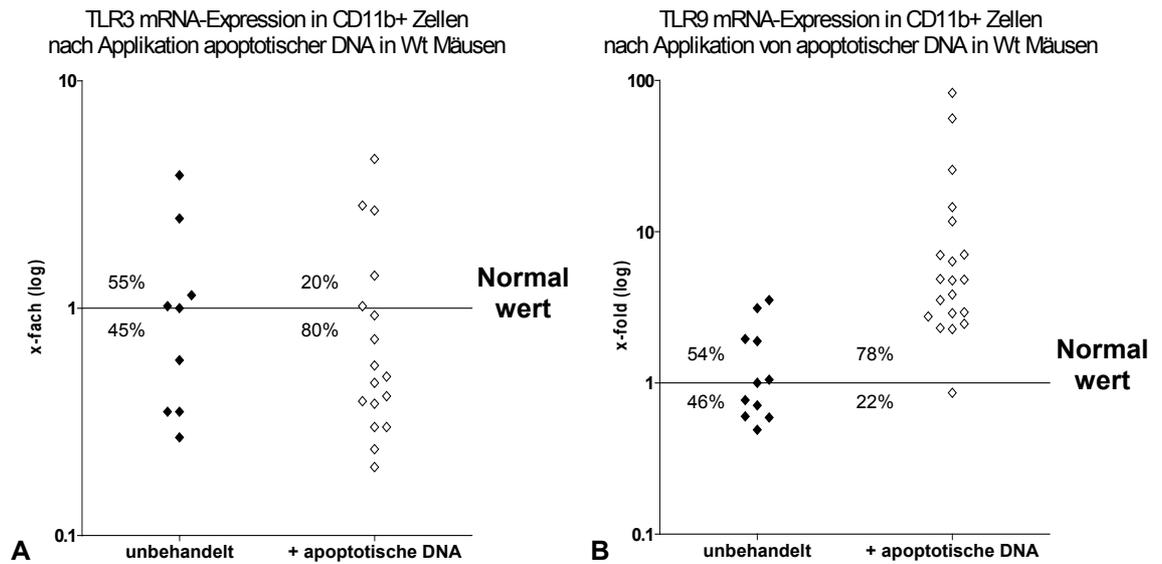


Abb. 24: TLR3 und TLR9 mRNA-Expression in CD11b+ Zellen einzelner Wt Mäuse, unbehandelt und 6h nach i.v. Applikation apoptotischer DNA.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). **(A)** Bei unbehandelten Tieren zeigten 55% eine höhere TLR3 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n=9$). Die Applikation von $4\mu\text{g}$ apoptotischer DNA führte bei 80% der Tiere nicht zu einer höheren TLR3 mRNA-Expression als bei unbehandelten ($n=25$). **(B)** Bei unbehandelten Tieren zeigten 54% eine entsprechende oder höhere TLR9 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n=11$). Die Applikation von $4\mu\text{g}$ apoptotischer DNA führte bei 78% der Tiere zu einer höheren TLR9 mRNA-Expression als bei unbehandelten ($n=31$).

3.2.3. Der Einfluss von IFN- α bei Komplementdefizienz auf die TLR9 mRNA-Expression

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben bereits eine spontan erhöhte IFN- α mRNA-Expression bei jungen, phänotypisch gesunden C4-/- Mäusen gezeigt. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass diese Tiere zudem bereits erhöhte endogene DNA in der Zirkulation aufweisen (s. 3.1.1). Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen Komplementmangel bedingten Abräumdefekten von DNA und der Aktivierung des Typ1-Interferonsystems wurde in dieser Arbeit angedeutet durch die Induzierbarkeit von IFN- α in nicht-autoimmunen Wt Mäusen durch apoptotische DNA (s. 3.1.3), welche auch zu einer erhöhten TLR9 mRNA-Expression führte (s. 3.2.2).

Untersucht wurde, ob der gesteigerten TLR9 mRNA-Expression ein möglicher Feedback-Mechanismus zugrunde liegt, bei dem eine durch Komplementmangel bedingte Akkumulation von apoptotischer DNA nach der initialen IFN- α Induktion zu einer kontinuierlichen IFN- α Aktivierung führt und damit einen Verlust der Toleranz nach sich ziehen könnte. Dazu wurde die IFN- α mRNA-Expression und die Expression von TLR3 und TLR9 von C4-/- Mäusen untersucht und mit der von unbehandelten Wt Mäusen und der von C4-/- Tieren ohne funktionellen IFN- α/β Rezeptor (C4-/-IFNAR-/-) verglichen.

C4-/- Mäuse zeigten in dieser Arbeit eine signifikante 22,74-fach höhere konstitutive IFN- α mRNA-Expression als Wt Mäuse (n=19) , wobei insgesamt 90% der Wt Mäuse einen relativen Wert zwischen 0,00 und 74,75 aufwiesen. In C4-/-IFNAR-/- Tieren war die IFN- α mRNA-Expression mit einem relativen Wert von 0,03 im Mittel insignifikant geringer als in Wt Mäusen. Bezogen auf C4-/-IFNAR-/- Tiere als Referenz zeigten C4-/- Mäuse eine signifikant erhöhte IFN- α mRNA-Expression (n=8, *p<0,05). Die TLR3 mRNA-Expression war in C4-/- Mäusen im Median mit einem relativen Wert von 0,42 insignifikant geringer als in Wt Mäusen (n=19), von denen 90% einen relativen Wert zwischen 0,30 und 3,29 aufwiesen. In C4-/-IFNAR-/- Tieren war die TLR3 mRNA-Expression im Median mit 0,60-fach insignifikant geringer als in Wt Mäusen. Bezogen auf C4-/-IFNAR-/- Tiere als Referenz zeigten C4-/- Mäuse eine insignifikant niedrigere TLR3 mRNA-Expression (n=8). Die TLR9 mRNA-Expression zeigte sich in C4-/- Mäusen signifikant um das 2,87-fache erhöht im Vergleich zu Wt Mäusen (n=19, *p<0,05) und signifikant höher als in C4-/-IFNAR-/- Mäusen, wobei insgesamt 90% der Wt Mäuse einen relativen Wert zwischen 0,54 und 3,32 aufwiesen. In C4-/-IFNAR-/- Tieren war die TLR9 mRNA-Expression mit 0,7-fach im Median insignifikant geringer als in Wt Mäusen (n=8) (**Abb. 25, Tab. 8**).

Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren IFN- α oder TLR9 mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für IFN- α oder TLR9 der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1). Die TLR3 mRNA-Expression einzelner Tiere ist nicht dargestellt.

Bei Wt Mäusen zeigten 50% eine entsprechende oder niedrigere und 50% eine höhere IFN- α mRNA-Expression als der Normalwert der Gesamtstichprobe ($n > 30$). Im Vergleich dazu zeigten 79% der C4-/- Mäuse eine höhere und 86% der C4-/-IFNAR-/- Mäuse eine niedrigere IFN- α mRNA-Expression als der Normalwert der Wt Mäuse (**Abb. 26A**). Bei Wt Mäusen war die TLR9 mRNA-Expression bei 54% der Tiere höher als der Normalwert der Gesamtstichprobe ($n=11$). Im Vergleich dazu zeigten 83% der C4-/- Mäuse eine höhere und 63% der C4-/-IFNAR-/- Mäuse eine niedrigere TLR9 mRNA-Expression als Wt Mäuse im Mittel (**Abb. 26B**).

Insgesamt zeigten C4-/- Mäuse eine signifikant gesteigerte IFN- α und TLR9 mRNA-Expression im Vergleich zu Wt Mäusen. C4-/- Mäuse ohne funktionellem IFN- α/β Rezeptor dagegen zeigten keinen Unterschied in der IFN- α oder TLR9 mRNA-Expression zu Wt Mäusen. Das Fehlen des IFN- α/β Rezeptors führte ausserdem bei C4-/- Mäusen zu einer signifikant verringerten IFN- α und TLR9 mRNA-Expression im Vergleich zu C4-/- Mäusen mit funktionellem Rezeptor.

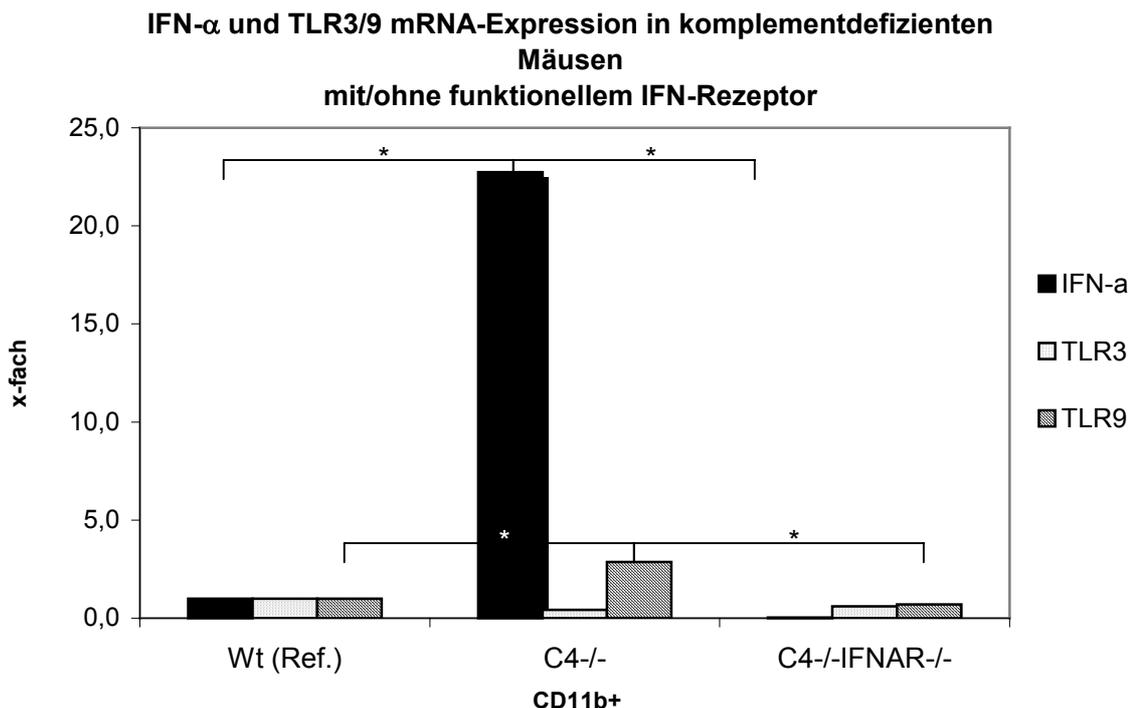


Abb. 25: IFN- α , TLR3 und TLR9 mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von unbehandelten Wt, C4-/- und C4-/-IFNAR-/- Mäusen.

C4-/- Mäuse haben eine 22,47-fach höhere konstitutive IFN- α mRNA-Expression als Wt Mäuse (n=19). In C4-/-IFNAR-/- Tieren ist die IFN- α mRNA-Expression im Mittel insignifikant geringer als in Wt Mäusen, gegenüber C4-/- Mäusen jedoch signifikant vermindert (n=8).

Die TLR3 mRNA-Expression ist in C4-/- Mäusen insignifikant geringer als in Wt Mäusen (n=19). In C4-/-IFNAR-/- Tieren ist die TLR3 mRNA-Expression im Mittel insignifikant geringer als in Wt Mäusen und insignifikant höher als in C4-/- Mäusen (n=8).

Die TLR9 mRNA-Expression ist in C4-/- Mäusen signifikant 2,87-fach erhöht im Vergleich zu Wt Mäusen (n=19) und signifikant höher als in C4-/-IFNAR-/- Mäusen. In C4-/-IFNAR-/- Tieren ist die TLR9 mRNA-Expression im Mittel insignifikant geringer als in Wt Mäusen (n=8).

IFN- α	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
Wt	(Ref.) 1,0	0,00	74,75	
C4-/-IFNAR-/-	0,03	0,02	19,51	0,1678
C4-/-	22,74	0,30	340,41	0,0043
TLR3	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
Wt	(Ref.) 1,0	0,30	3,29	
C4-/-IFNAR-/-	0,60	0,34	1,53	0,4807
C4-/-	0,42	0,21	8,51	0,4473
TLR9	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=
Wt	(Ref.) 1,0	0,54	3,32	
C4-/-IFNAR-/-	0,70	0,53	2,0	0,4573
C4-/-	2,87	0,84	6,34	0,0267

Tab. 8: Darstellung des Medians der relativen Werte für IFN- α , TLR3 und TLR9 unbehandelter C4-/- und C4-/-IFNAR-/- Mäuse nach CD11b-Aufreinigung, bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten Median aus den ΔC_T -Werten für IFN- α , TLR3 und TLR9 unbehandelter Wt Mäuse.

Der Median der ΔC_T -Werte für IFN- α , TLR3 und TLR9 unbehandelter Wt Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert für IFN- α , TLR3 oder TLR9 (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

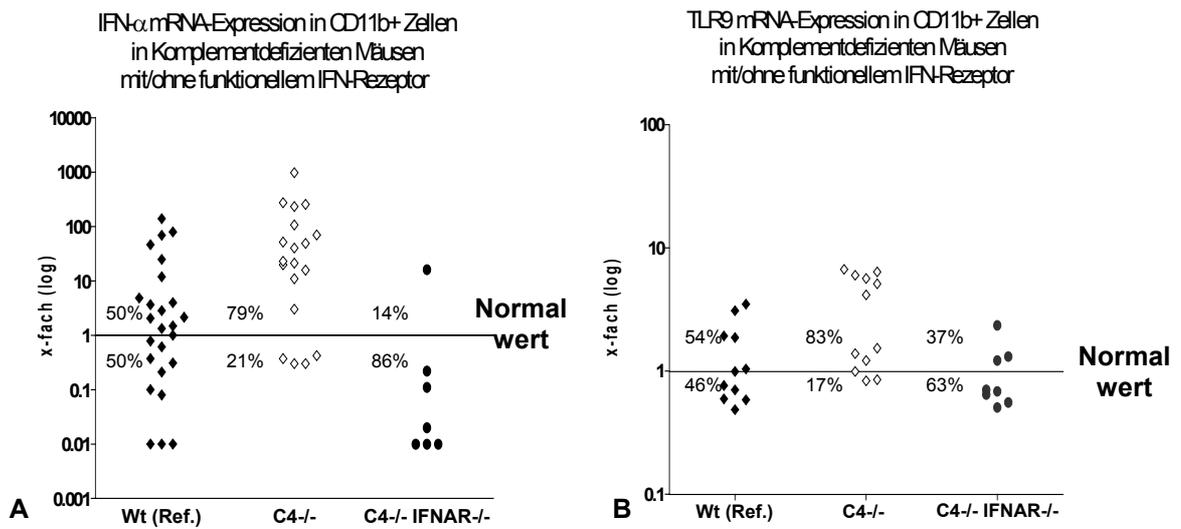


Abb. 26: IFN- α und TLR9 mRNA-Expression in CD11b+ Zellen einzelner unbehandelter Wt, C4-/- und C4-/-IFNAR-/- Mäuse.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). **(A)** Bei Wt Mäusen haben 50% eine entsprechende oder höhere IFN- α mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n > 30$). Im Vergleich dazu haben 79% der C4-/- Mäuse eine höhere und 86% der C4-/-IFNAR-/- Mäuse eine niedrigere IFN- α mRNA-Expression als Wt Mäuse im Mittel. **(B)** Bei Wt Mäusen haben 54% eine entsprechende oder höhere TLR9 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n=11$). Im Vergleich dazu haben 83% der C4-/- Mäuse eine höhere und 63% der C4-/-IFNAR-/- Mäuse eine niedrigere TLR9 mRNA-Expression als Wt Mäuse im Mittel.

3.2.4. Untersuchung zur Interferenz des IFN- α Induktionsmechanismus

Mittels der Real-time RT-PCR wurde untersucht, ob sich in Wt Mäusen die IFN- α mRNA-Expression und die TLR9 mRNA-Expression nach Applikation von apoptotischer DNA durch medikamentöse Beeinflussung der TLR9-Signaltransduktion hemmen lässt. Dazu wurde Wt Mäusen 4 μ g apoptotische DNA i.v. appliziert, allein oder nach vorheriger Gabe von Chloroquin i.p. für 48h in der Dosierung 5 μ g Chloroquin/g Körpergewicht. 6h nach der DNA-Applikation wurde die Milz entnommen und CD11b+ Zellen aufgereinigt.

In 3.1.3.4 wurde bereits gezeigt, dass die Applikation von apoptotischer DNA allein in Wt Mäusen im Median zu einer 15,41 mal höheren IFN- α mRNA-Expression als in unbehandelten Referenztieren führte, wobei 90% der Tiere zwischen 0,13 und 3082,28 mal mehr IFN- α mRNA exprimierten. Nach einer Vorbehandlung mit Chloroquin wurde durch apoptotische DNA eine geringere IFN- α mRNA-Expression induziert, die dem 7,05-fachen derjenigen unbehandelter Referenztiere entsprach (n=24). 90% der Tiere exprimierten zwischen 0,1 und 163,33 mal mehr IFN- α mRNA als unbehandelte Tiere, wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,00 und 74,75 aufwiesen. Somit induzierte apoptotische DNA nach Chloroquin-Vorbehandlung zwar eine geringere IFN- α mRNA-Expression als apoptotische DNA allein, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach einer Chloroquin-Vorbehandlung war die Induktion von IFN- α mRNA gegenüber unbehandelten Wt Mäusen immer noch signifikant erhöht (n=16) (**Abb. 27, Tab. 9**).

In 3.2.2 wurde gezeigt, dass apoptotische DNA im Median eine insignifikant geringere TLR3 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Referenztieren induzierte (0,39-fach). 90% der Tiere zeigten eine TLR3 mRNA-Expression, deren Werte zwischen 0,08 und 2,86 lagen. Nach Chloroquin-Vorbehandlung war die TLR3 mRNA-Expression im Median mit einem relativen Wert von 0,11 signifikant geringer als nach apoptotischer DNA allein und signifikant geringer als in unbehandelten Tieren (n=25), wobei insgesamt 90% der unbehandelten Tiere einen relativen Wert zwischen 0,30 und 3,29 aufwiesen. 90% der Tiere zeigten eine TLR3 mRNA-Expression, die dem 0,05- bis 0,37-fachen derjenigen unbehandelter Tiere entsprach (**Abb. 27, Tab. 9**).

In 3.2.2 wurde nachgewiesen, dass apoptotische DNA im Median 2,82 mal mehr TLR9 mRNA induzierte, als in unbehandelten Mäusen konstitutiv exprimiert wird. Bei 90% der Tiere wurde das 0,46- bis 39,35-fache der TLR9 mRNA nachgewiesen und der Unterschied war signifikant. Eine Chloroquin-Vorbehandlung führte dazu, dass apoptotische DNA eine 1,19 mal höhere TLR9 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren induzierte, wobei 90% eine Expression zeigten, deren Werte

zwischen 0,41 und 2,85 lagen. 90% der unbehandelten Tiere wiesen einen relativen Wert zwischen 0,54 und 3,32 auf. Es besteht somit kein signifikanter Unterschied zwischen Mäusen, die apoptotische DNA nach einer Vorbehandlung mit Chloroquin erhalten haben und unbehandelten Tieren. Der Unterschied zwischen der TLR9 mRNA-Expression von Tieren, die apoptotische DNA allein erhalten haben und solchen, die zusätzlich mit Chloroquin behandelt wurden, war signifikant (**Abb. 27, Tab. 9**).

Ein weiteres Diagramm stellt die relativen Werte der einzelnen Tiere dar. Dargestellt ist deren prozentuale Verteilung einer höheren oder einer niedrigeren IFN- α , TLR3 oder TLR9 mRNA-Expression als der relative Wert aus dem Median der ΔC_T -Werte für IFN- α , TLR3 oder TLR9 der gesamten Stichprobe unbehandelter Tiere im Vergleich (Normalwert=1) (**Abb. 28**). Bei unbehandelten Wt Mäusen zeigten 50% eine entsprechende oder niedrigere und 50% eine höhere IFN- α mRNA-Expression als der Normalwert der Gesamtstichprobe ($n > 30$). Nach Applikation von apoptotischer DNA allein exprimierten 78% der Tiere mehr IFN- α mRNA als der Normalwert der unbehandelten Wt Mäuse. Nach Vorbehandlung mit Chloroquin verringerte sich die Zahl der Tiere mit einer höheren IFN- α mRNA-Expression als der Median der unbehandelten Mäuse auf 66% (**Abb. 28A**). Für TLR3 lag die mRNA-Expression bei 55% der unbehandelten Tieren über und bei 45% bei oder unter dem Median ($n=9$). Nach Applikation apoptotischer DNA allein zeigten 80% der Mäuse eine niedrigere TLR3 mRNA-Expression als der Median der unbehandelten Wt Mäuse ($n=25$). Nach Vorbehandlung mit Chloroquin erhöhte sich die Zahl der Tiere mit einer niedrigeren TLR3 mRNA-Expression als der Normalwert der unbehandelten Mäuse auf 100% ($n=16$) (**Abb. 28B**). Für TLR9 lag die mRNA-Expression bei 54% der unbehandelten Tieren über und bei 46% bei oder unter dem Median ($n=11$). Nach Applikation apoptotischer DNA zeigten 78% der Mäuse eine höhere TLR9 mRNA-Expression als der Median der unbehandelten Wt Mäuse ($n=31$). Nach Vorbehandlung mit Chloroquin verringerte sich die Zahl der Tiere mit einer höheren TLR9 mRNA-Expression als der Normalwert der unbehandelten Mäuse auf 52% (**Abb. 28C**).

Zusammenfassend führte die Vorbehandlung mit Chloroquin dazu, dass die durch apoptotische DNA induzierte Erhöhung der IFN- α und TLR9 mRNA-Expression verringert wurde. Chloroquin konnte allerdings keine signifikante Verringerung der durch apoptotische DNA induzierten IFN- α mRNA-Expression erreichen. Für TLR9 dagegen führte es zu einer signifikant verringerten mRNA-Expression im Vergleich zu derjenigen, die durch apoptotische DNA allein induziert wurde. Desweiteren wurde durch Chloroquin die durch apoptotische DNA unbeeinflusste TLR3 mRNA-Expression signifikant herunterreguliert.

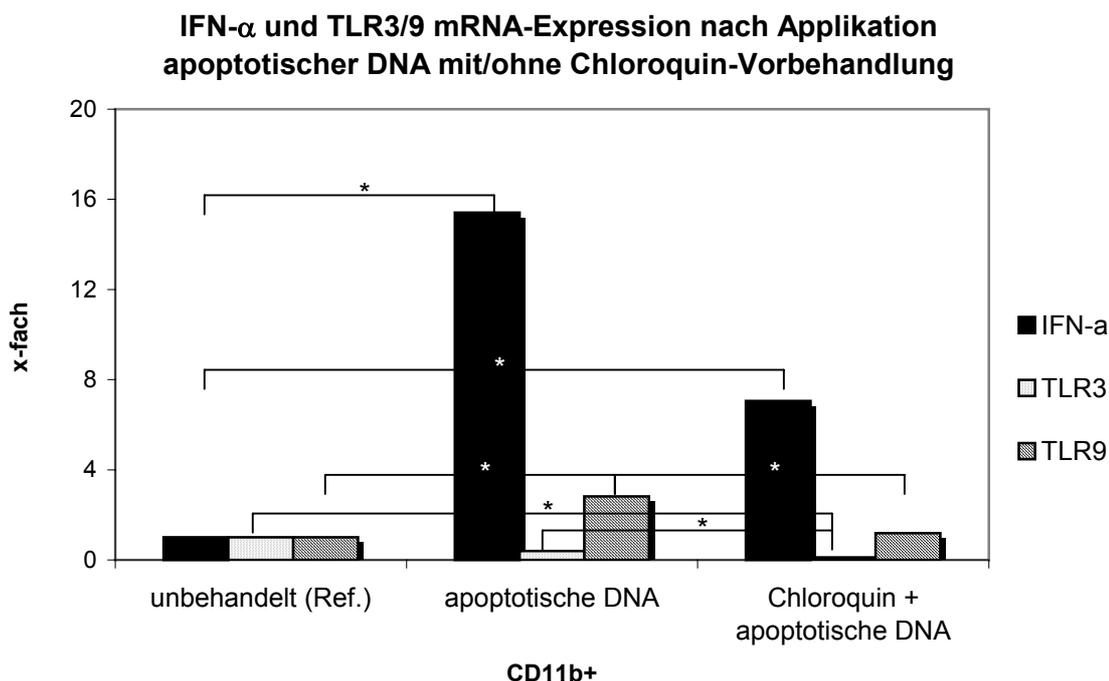


Abb. 27: IFN- α , TLR3- und TLR9 mRNA-Expression (Median) in CD11b+ Zellen von Wt Mäusen 6h nach i.v. Applikation apoptotischer DNA mit oder ohne Vorbehandlung mit Chloroquin i.p.

Die Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA i.v. führte allein appliziert zu einer 15,41 mal höheren IFN- α mRNA-Expression und im Anschluss an eine Vorbehandlung mit Chloroquin [5 μ g/g Körpergewicht] i.p. zu einer 7,05 mal höheren IFN- α mRNA-Expression als in unbehandelten Referenztieren. Der Unterschied ist nicht signifikant ($n > 8$, $*p > 0,05$). Nach Applikation von apoptotischer DNA exprimierten Wt Mäuse insignifikant weniger (0,39-fach) und nach Vorbehandlung mit Chloroquin signifikant weniger (0,11-fach) TLR3 mRNA als unbehandelte Tiere ($n > 8$, $*p > 0,05$). Wt Mäuse, die mit apoptotischer DNA behandelt wurden, exprimierten signifikant mehr TLR9 mRNA (2,82) als unbehandelte Tiere. Bei einer Vorbehandlung mit Chloroquin bestand kein signifikanter Unterschied in der durch apoptotische DNA induzierten TLR9 mRNA-Expression und unbehandelten Tieren. Die Vorbehandlung mit Chloroquin führte auch zu einer signifikant geringeren TLR9 mRNA-Expression als apoptotische DNA alleine ($n > 8$, $*p > 0,05$).

IFN-α	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=	
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,00	74,75		
Chloroquin+ apoptotische DNA	7,05	0,10	163,33	0,0193	
apoptotische DNA	15,41	0,13	3082,28	0,0006	0,1319
TLR3	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=	
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,30	3,29		
Chloroquin+ apoptotische DNA	0,11	0,05	0,37	0,0001	
apoptotische DNA	0,39	0,08	2,86	0,079	0,0016
TLR9	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	*p=	
unbehandelt	(Ref.) 1,0	0,54	3,32		
Chloroquin+ apoptotische DNA	1,19	0,41	2,85	0,6192	
apoptotische DNA	2,82	0,46	39,35	0,027	0,0007

Tab. 9: Darstellung des Medians der relativen Werte für IFN- α , TLR3 und TLR9 CD11b+ Zellen von Wt Mäusen nach i.v. Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA mit oder ohne vorherige Gabe von 5 μ g/g Chloroquin i.p. bezogen auf den als Referenz (1,0) gesetzten Median aus den ΔC_T -Werten für IFN- α in CD11b+ Zellen von unbehandelten Wt Mäusen.

Der Median der ΔC_T -Werte für IFN- α , TLR3 oder TLR9 unbehandelter Wt Mäusen wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert von IFN- α , TLR3 oder TLR9 nach Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA allein oder nach vorheriger Gabe von Chloroquin (Median der relativen Werte der einzelnen Tiere) stellt das x-fache des Werts der Referenz dar. Angegeben ist der Median der relativen Werte einer Messgruppe, das 5% Quantil, das 95% Quantil und der p-Wert in Bezug auf die Referenz.

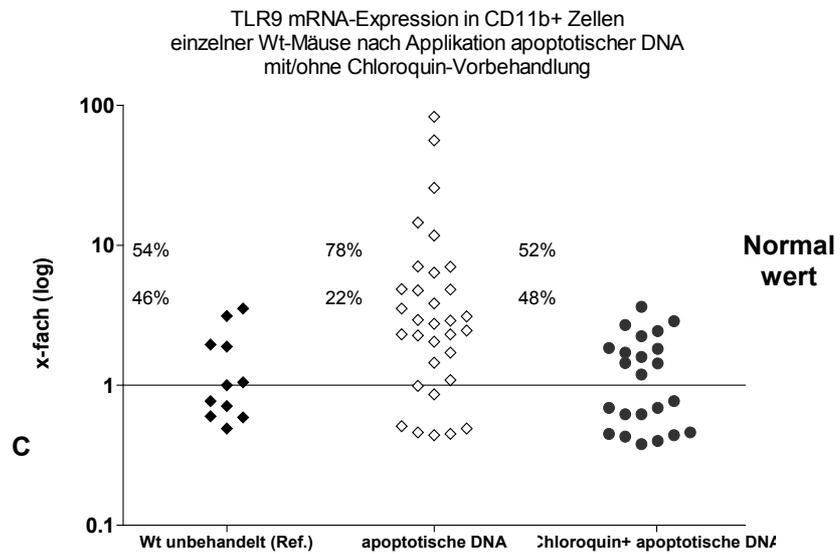
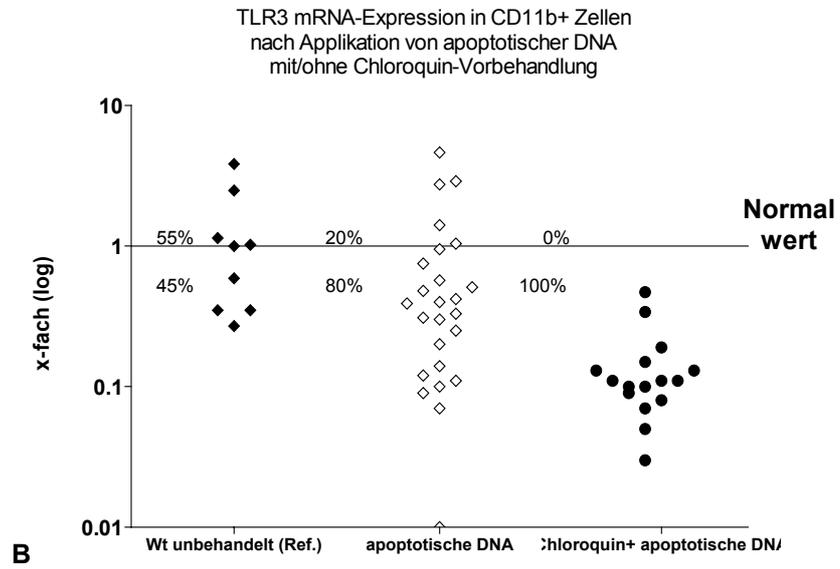
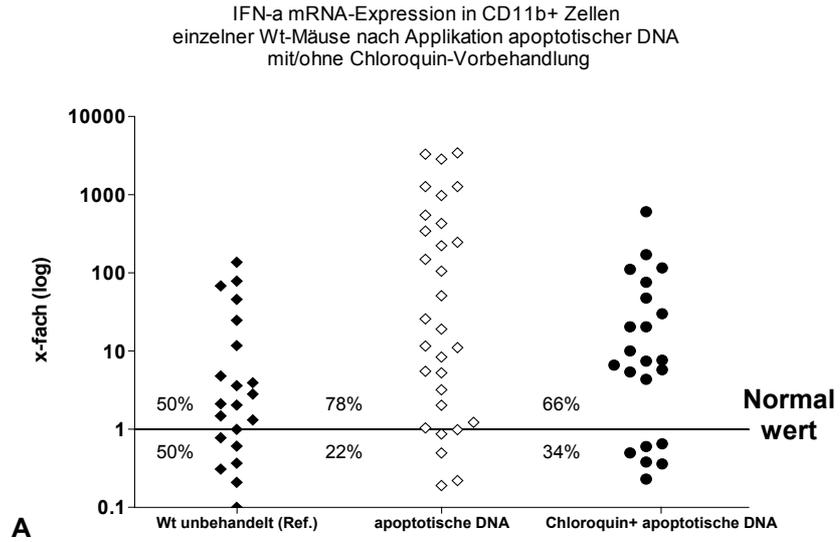


Abb. 28: IFN- α , TLR3 und TLR9 mRNA-Expression in CD11b⁺ Zellen von Wt Mäusen 6h nach i.v. Applikation apoptotischer DNA mit oder ohne Vorbehandlung mit Chloroquin i.p.

Der Normalwert entspricht dem relativen Wert des Medians der ΔC_T -Werte aller getesteten unbehandelten Tiere (1,0). **(A)** Bei unbehandelten Tieren haben 50% eine entsprechende oder höhere IFN- α mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n > 30$). Die Applikation von apoptotischer DNA induzierte bei 78% der Mäuse eine höhere IFN- α mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n > 30$). Nach Vorbehandlung mit Chloroquin führte apoptotische DNA bei 66% der Tiere zu einer höheren IFN- α mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n=16$). **(B)** Bei unbehandelten Tieren haben 55% eine höhere TLR3 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n=9$). Die Applikation von 4 μ g apoptotischer DNA führte bei 80% der Tiere nicht zu einer höheren TLR3 mRNA-Expression als bei unbehandelten ($n=25$). Nach Vorbehandlung mit Chloroquin führte apoptotische DNA bei 100% der Tiere zu einer niedrigeren TLR3 mRNA-Expression als bei unbehandelten ($n=16$). **(C)** Bei unbehandelten Tieren haben 54% eine entsprechende oder höhere TLR9 mRNA-Expression als der Median der Gesamtstichprobe ($n=11$). Die Applikation von apoptotischer DNA induzierte bei 78% der Mäuse eine höhere TLR9 mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n=31$). Nach Vorbehandlung mit Chloroquin führte apoptotische DNA bei 52% der Tiere zu einer höheren TLR9 mRNA-Expression als bei unbehandelten Tieren ($n=23$).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der pathophysiologischen Akkumulation von Nukleinsäuren aus apoptotischen Prozessen bei der Entstehung der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus Erythematoses untersucht werden. Grundlage dieser Arbeit war, dass der SLE zum einen mit der Defizienz der frühen Faktoren des klassischen Komplementaktivierungswegs assoziiert ist. Ein Erklärungsmodell postuliert eine gestörte Elimination von apoptotischen Zellen und von Immunkomplexen bei Komplementmangel. Ausgehend von der Beobachtung, dass apoptotische Körperchen als Quelle für Lupus-typische Autoantigene weniger gut phagozytiert werden können, wenn C1¹³⁰ oder C4¹³¹ fehlt. Zum anderen spielt die Aktivierung des IFN- α -Systems eine Rolle, da bei Patienten mit SLE regelmässig erhöhte IFN- α Spiegel oder die erhöhte Expression von interferoninduzierten Genen beobachtet wird und es darüber hinaus gelegentlich als Nebenwirkung einer Therapie mit rekombinantem IFN- α zur Induktion von SLE-typischen Autoantikörpern¹³² kommt. Bisher gibt es allerdings keine übereinstimmende Theorie, welche die Phänomene des Komplementmangels und des aktivierten IFN- α Systems gemeinsam erklärt. Es wird angenommen, daß Nukleinsäuren über Toll-like Rezeptoren die Induktion von IFN- α bewirken¹³³ und zwar besonders effektiv, wenn diese in IgG-Immunkomplexen vorliegen¹³⁴. IgG-Immunkomplexe finden sich jedoch beim SLE in einer späteren Phase der Erkrankung, so dass daraus zunächst keine Bedeutung für den Verlust der Toleranz und die initiale Entstehung des SLE abgeleitet werden kann. Ein neuer Erklärungsansatz basiert auf Beobachtungen der Arbeitsgruppe, die dieser Arbeit vorangegangenen sind. So bewirkt die gezielte Deposition von IgM-Immunkomplexen in der marginalen Zone der Milz eine verstärkte Immunantwort gegen Antigene dieser Immunkomplexe¹³⁵. Desweiteren konnte in unbehandelten C4-defizienten Mäusen eine deutlich gesteigerte Expression von IFN- α gezeigt werden¹³⁶.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit leitet sich die folgende Hypothese ab, welche diskutiert werden soll:

Der Mangel an frühen Komplementkomponenten C1, C4 und C2 führt zu einer reduzierten Phagozytose apoptotischer Körperchen, welche eine erhöhte Konzentration endogener apoptotischer DNA bewirkt. Die apoptotische DNA lagert sich, vermutlich unter Bildung von IgM-Immunkomplexen¹³⁷, an der marginalen Zone der Milz ab und induziert, vermittelt über den TLR9-Rezeptor, die Aktivierung des IFN- α Systems, welche schließlich die Entstehung des SLE begünstigt.

4.1. Untersuchung zum Komplementmangel bedingten Abräumdefekt endogener apoptotischer DNA auf die Induktion von IFN- α

4.1.1. Nachweis von endogener apoptotischer DNA im Serum

Bei Patienten mit SLE lassen sich erhöhte Spiegel endogener DNA im Serum bzw. im Plasma nachweisen¹³⁸⁻¹⁴⁰. Wie es dazu kommt, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Es ist aber bekannt, dass bei der Eliminierung von Immunkomplexen und apoptotischen Körperchen Komplement eine elementare Rolle spielt¹⁴¹. Für die Entstehung von SLE ist eine Defizienz der frühen klassischen Komplementfaktoren (C1q, C4) prädisponierend¹⁴² und die Schwere der Erkrankung scheint von der Position des defizienten Faktors in der Komplementkaskade abhängig zu sein (C1 > C4 > C2)¹⁴³. Eine Hypothese zur Entstehung von SLE bei Komplementdefizienz basiert auf einer Komplementmangel bedingten, verminderten Fähigkeit zur Clearance von apoptotischer DNA, in Folge dessen es durch eine pathologische Akkumulation zu einem Versagen der Toleranz gegen Selbst kommen kann. Eine neue Studie berichtet allerdings davon, dass *in vitro* keine Hierarchie in der Rolle der Bedeutung der einzelnen Komplement-Komponenten bei der Clearance apoptotischer Zellen zu bestehen scheint und somit C1q und C4 gleichwertig daran beteiligt sind¹⁴⁴.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob bereits bei jungen C4-defizienten (C4^{-/-}) Mäusen, vor dem Auftreten erster Anzeichen einer Autoimmunerkrankung, ein Clearance-Defekt in Form von erhöhter endogener DNA in der Zirkulation besteht.

Mit der sensitiven Methode der realtime PCR konnte ein signifikanter Unterschied in der Menge der aus Serum isolierten endogenen DNA zwischen C4^{-/-} und Wt Mäusen nachgewiesen werden. Die PCR des sogenannten Housekeeping-Gens GAPDH zeigte, dass in DNA-Proben aus dem Serum einzelner C4^{-/-} Mäuse signifikant mehr GAPDH-Gen amplifiziert wurde als in DNA-Proben aus dem Serum einzelner Wt Mäuse (s. 3.1.1 **Abb. 3**). Die Schlussfolgerung, dass Serum von C4^{-/-} Mäusen also scheinbar mehr endogene DNA enthält als das von Wt Mäusen, legt einen bereits bestehenden Clearance-Defekt für DNA nahe. Ausserdem wurde qualitativ mit der Gelelektrophorese nachgewiesen, dass die aus Serum isolierte DNA apoptotischen Ursprungs ist (s. 3.1.1 **Abb. 5**). Die Endogene DNA aus Wt und C4^{-/-} Serum stellte sich gleichmässig fragmentiert in Form von Basenpaar-Leitern dar (200bp und ein Vielfaches davon).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass endogene DNA im Serum der getesteten C4^{-/-} Mäuse erhöht ist. Der gleichmässig fragmentierte Zustand der DNA deutet darauf hin, dass es sich um DNA apoptotischen Ursprungs handelt.

Für komplementdefiziente Mäuse wurde bereits eine verminderte Clearance von apoptotischen Körperchen beschrieben, wenn diese künstlich auf intraperitonealem Wege zugeführt wurden^{145;146}. Eine Defizienz für C1q zeigte sich dabei im Mausmodell mit einer erhöhten Akkumulation von apoptotischen Körperchen in den Nieren vergesellschaftet, welche sich klinisch in der Entstehung von Glomerulonephritiden manifestierte¹⁴⁷. Im humanen System konnte *in vitro* für Makrophagen eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose apoptotischer Zellen gezeigt werden, wenn jene von Patienten mit SLE stammen¹⁴⁸ oder wenn Makrophagen von Gesunden in Abwesenheit von frühen Komplementfaktoren kultiviert werden¹⁴⁹.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal *in vivo* der Nachweis von endogener DNA im Serum von jungen C4^{-/-} Mäusen nachgewiesen, bevor diese eine Lupus-ähnliche Erkrankung zeigen. Die Hypothese, dass eine Prädisposition für SLE bei Komplementdefizienz auf einer gestörten Clearance apoptotischer Körperchen beruht, wird hiermit untermauert.

Jedoch zeigte sich die Methode der PCR so sensitiv, dass auch bei einigen Wt Mäusen geringe Mengen endogener DNA im Serum nachgewiesen wurden. In humanen Studien wurde bereits ebenfalls gezeigt, dass auch Gesunde durchaus messbare Konzentrationen endogener DNA im Serum haben können. Als physiologisch erwiesen sich demnach Konzentrationen bis 10ng/ml, während bei SLE-Patienten zwar individuell sehr unterschiedliche, aber deutlich höhere Konzentrationen von DNA messbar waren, die zwischen 25ng/ml bis >5000ng/ml betragen^{150;151}.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass es sich bei der DNA im Serum um apoptotische DNA handelt. Auch bei Patienten mit SLE ist die zirkulierende DNA körpereigenen Ursprungs, welche überwiegend aus apoptotischen Vorgängen stammt^{152;153}. In der Tat sind viele der für SLE charakteristischen Autoantikörper gegen Antigene gerichtet, die sich in oder auf der Oberfläche von apoptotischen Körperchen befinden. Dies führte zu der Vermutung, dass apoptotische Körperchen eine Quelle für die beim SLE typischen Autoantigene sein können^{154;155}.

Die hier nachgewiesenen erhöhten Spiegel endogener DNA bei Komplement C4-Mangel könnten der Ursprung für die Akkumulation Lupus-typischer Autoantigene sein und im weiteren Verlauf zu einem Verlust der peripheren Toleranz führen.

4.1.2. Deposition von apoptotischer DNA in der marginalen Zone der Milz

Die marginale Zone (MZ) der Milz filtert Pathogene aus der Zirkulation und ist Ort der Ablagerung von IgM-Immunkomplexen, welche sich vermehrt in der Milz anreichern, insbesondere bei bestehender Komplementdefizienz^{156;157}. Auch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben bereits die Wichtigkeit von Komplement C4 für die Clearance von Immunkomplexen in der Milz gezeigt. So wurde bei C4^{-/-} Mäusen eine bevorzugte Deposition von IgM-Immunkomplexen in der immunkompetenten MZ der Milz und in diesem Zusammenhang eine rekonstituierte humorale Immunantwort gefunden¹⁵⁸. Ausserdem konnte mit einem IgM-Immunkomplexmodell in Wt Mäusen, indem ein muriner monoklonaler IgM-Antikörper gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) intravenös appliziert wurde, ebenfalls eine Deposition in der MZ, sowie eine Aktivierung von CD11b⁺ Zellen mit der Folge einer gesteigerten IFN- α Produktion, gezeigt werden¹⁵⁹.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob zirkulierende endogene DNA an der MZ der Milz deponiert wird und über eine IFN- α Aktivierung zu einem Toleranzverlust gegenüber dieser DNA führt.

Dafür wurde zuerst die Distribution von applizierter DNA in Wt Mäusen immunhistochemisch untersucht. 30 Minuten nach i.v. Applikation konnte eine Deposition in der marginalen Zone festgestellt werden. Anschliessend wurde die natürliche Deposition von DNA in der marginalen Zone von unbehandelten komplementdefizienten und Wt Tieren untersucht. In der Milz von unbehandelten C4^{-/-} Mäusen, jedoch weniger in der von Wt Mäusen, konnte eine natürliche Ablagerung von DNA an der marginalen Zone nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Färbung mit dem Monozyten/Makrophagen-Marker CD11b und die dabei ersichtliche spektrale Überlagerung mit der Fluoreszenz für apoptotische DNA zeigte ausserdem eine Kolokalisation der DNA mit CD11b⁺ Zellen.

Die marginale Zone der Milz ist reich an immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Marginalzonen-B-Zellen. Makrophagen der marginalen Zone stellen z.B. die Haupt-Produzenten von IFN- α nach Virus-Stimulation dar¹⁶⁰. Beschrieben wurde auch eine vermehrte Anzahl autoreaktiver B-Zellen für diesen Bereich¹⁶¹, welche dort unabhängig von der Bildung von Keimzentren proliferieren und zu somatischer Mutation fähig sein können^{162;163}. In dieser Arbeit konnte eine Kolokalisation CD11b⁺ Zellen mit der applizierten oder endogenen DNA gezeigt werden. Dies deutet auf eine Bindung dieser Zellen durch DNA hin, innerhalb der eine Aktivierung des Typ I Interferonsystems denkbar ist. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

haben bereits gezeigt, dass die Aktivierung von IFN- α jedoch nicht von der Deposition eines Antigens an sich abhängig ist, sondern von IgM anti-dsDNA-Immunkomplexen und damit auf spezifische Rezeptoren angewiesen sein muss, da die Lokalisation des T-Zellunabhängigen Antigens TNP-Ficoll nicht zu einer Aktivierung von IFN- α führte¹⁶⁴. Die marginale Zone der Milz scheint somit eine bedeutende Rolle für die Entstehung von Autimmunität zu spielen. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass DNA aus der Zirkulation sich in dieser immunkompetenten Region anlagert und dass in jungen C4-/- Mäusen endogene apoptotische DNA bereits an den dortigen CD11b+ Zellen gebunden ist. Damit wird die Hypothese von der Anlagerung endogener DNA in der marginalen Zone der Milz bei Komplementdefekt bestätigt und ein Versagen der Toleranz über die Aktivierung des IFN- α Systems denkbar.

4.1.3. Die Immunogenität apoptotischer DNA

Eine zentrale Frage in dieser Arbeit war, ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der bei Lupus-Patienten häufig vorkommenden Komplementdefizienz und der charakteristischen Aktivierung IFN-induzierter Gene besteht. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass C4-/- Mäuse unphysiologisch hohe Spiegel zirkulierender DNA apoptotischen Ursprungs haben. Und Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass junge, gesunde C4-defiziente Mäuse eine signifikant erhöhte IFN- α mRNA-Expression in CD11b+ Zellen der marginalen Zone der Milz im Vergleich zu Wt Mäusen aufweisen. Erhöhte IFN- α Werte liessen sich überdies mit einem IgM-Ak gegen dsDNA in Wt Mäusen induzieren¹⁶⁵. Für den Nachweis eines kausalen Zusammenhanges dieser Befunde wurde mittels i.v. Applikation fragmentierter DNA in Wt Mäuse der Status erhöhter endogener DNA in C4-/- Mäusen nachgeahmt. Die DNA wurde dafür zuvor *in vitro* entweder durch Apoptose oder durch Ultraschall fragmentiert. Dazu wurde eine B-Lymphomzelllinie kultiviert und mittels Nährstoffentzug Apoptose induziert.

Anschliessend wurde die IFN- α mRNA-Expression und die Expression der Zytokine IL-6, IL-12 und des Interferon-regulierenden Faktors IRF-7 in der CD11b+ Zellfraktion gemessen (s. 3.1.3.4).

4.1.3.1. Der Einfluss apoptotischer DNA auf IL-6, IL-12 und IRF-7

IL-6 und IL-12 sind bei humanem SLE und im Mausmodell als erhöht beschrieben worden¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Diese Zytokine werden nach der Aktivierung von DCs über den NF κ B-Signalweg induziert, welcher ein alternativer Signalweg zum TypI-IFN-Weg darstellt.

In dieser Arbeit jedoch induzierte fragmentierte DNA im Mittel keine erhöhte Expression von IL-6, dennoch war in einzelnen Tieren sowohl nach Applikation US-fragmentierter als auch apoptotischer DNA eine erhöhte IL-6 mRNA-Expression nachzuweisen (s. 3.1.3.4 **Abb.**). Vor kurzem wurde *in vitro* gezeigt, dass die effiziente Produktion von IL-6 nicht nur von einer Aktivierung des NF κ B abhängig ist, sondern auch ein positives Signal über den IFN- α/β Rezeptor in Form einer Verstärkerschleife benötigt¹⁶⁹. Für humane pDCs wurde ausserdem gezeigt, dass die Induktion der Plasmazell-Differenzierung auf einem Zusammenspiel von IFN- α und IL-6 beruht, indem letzteres allerdings eine nachgeordnete Funktion übernimmt, da IFN- α die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Plasmablasten und IL-6 deren weitere Ausreifung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu vermitteln scheint¹⁷⁰. In humanen mDCs dagegen scheint IL-6 eine Differenzierung der B-Zellen in Kooperation mit IL-12 zu induzieren¹⁷¹. *In vitro* wurde für SLE-ICs¹⁷² und CpG-DNA eine TLR9-abhängige verstärkte Induktion von IL-12 und IL-6 gezeigt^{173;174}, während physiologisch bei der Clearance von apoptotischen Zellen die Synthese dieser Zytokine unterdrückt wird¹⁷⁵.

Die in dieser Arbeit untersuchten murinen mDCs wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als die IFN- α produzierenden Zellen charakterisiert. Im humanen System wird TLR9 nur von pDCs exprimiert, während in der Maus auch mDCs TLR9 tragen. Die Immunantwort auf DNA muss somit vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Expressionsprofile der DCs für TLR9 bewertet werden.

Die IL-12 mRNA-Expression war nach Applikation fragmentierter DNA im Mittel signifikant verringert (s. 3.1.3.4 **Abb. 14**). Zudem wurde in der Gruppe der unbehandelten Wt Mäuse starke Schwankungen in der konstitutiven mRNA-Expression gefunden. Dies passt zu dem Zytokinprofil bei SLE-Patienten, bei dem die Serumspiegel von IL-12 sehr stark zwischen den Patienten variieren, ohne dass dafür bisher ein Grund gefunden wurde¹⁷⁶. Allerdings scheinen erhöhte Spiegel von IL-12 mit der Entstehung pulmonaler, jedoch nicht renaler, Erkrankungen zusammenzuhängen¹⁷⁷. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte weder in unbehandelten C4-/- Mäusen, noch in Wt Mäusen, nach Applikation von IgM anti-dsDNA, eine erhöhte Sezernierung von IL-12 gemessen werden¹⁷⁸. Eine Herunterregulation von IL-12, als Immunantwort auf Nukleinsäuren, wurde jedoch schon *in vitro* für Chromatin-ICs beschrieben, ohne dass die charakteristische Koinduktion von TNF- α davon betroffen gewesen wäre¹⁷⁹. Ein solch besonderes

Zytokinprofil, in dem IL-12 selektiv gehemmt wird, findet sich auch nach der Aktivierung von Makrophagen durch LPS bei gleichzeitiger Kreuzvernetzung von Fc γ -, Komplement-, oder Scavenger-Rezeptoren, vielleicht um die proinflammatorische Immunantwort in Grenzen zu halten¹⁸⁰. Der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese nach könnte die applizierte fragmentierte DNA von natürlichen IgM-Ak gebunden werden und somit wäre eine Kreuzvernetzung von IgM-Fc-Rezeptoren¹⁸¹, welche für die Internalisierung von mit IgM opsonisierten Pathogenen eine Rolle spielen, durch IgM-DNA-ICs denkbar. Andererseits könnte die Internalisierung von DNA auch IgM-unabhängig sein, da Mäuse, die für natürliches sezerniertes IgM defizient sind, für die Entwicklung des SLE prädisponiert zu sein scheinen¹⁸².

IL-12 ist an der Induktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IFN- γ , und an der Differenzierung von B-Zellen beteiligt^{183, 184} und damit in einer fortgeschrittenen Phase des SLE bedeutsam. Im Rahmen der in dieser Arbeit dargestellten Frühphase der Entstehung des SLE scheint jedoch eine signifikante Herunterregulierung von IL-12 eine Rolle bei der initialen IFN- α Produktion zu spielen. Auch IL-6 scheint hauptsächlich im Rahmen der proinflammatorischen Immunantwort bei der aktiven, manifestierten Form des SLE bedeutend zu sein. Allerdings könnte die fehlende Koinduktion von IL-6 bei der Aktivierung von IFN- α in dieser Arbeit mit einer zeitlichen Verzögerung interpretiert werden, für die der gemessene Versuchszeitraum nicht ausreichend war.

Als indirekter Nachweis der Sezernierung des IFN- α Proteins wurde die Aktivierung des IRF-7 untersucht (s. 3.1.3.4 **Abb. 16**). IRF-7 gilt als ein Schlüssel-Regulator in der TLR9-vermittelten (TLR7/8) IFN- α Induktion¹⁸⁵. Er wird auf die Sezernierung des ersten Interferonsubtyps IFN- α 4 hin aktiviert und initiiert anschliessend in einer positiven Rückkopplungsreaktion die Transkription der anderen Interferon- α Subtypen^{186;187}, die zusammen eine effiziente IFN- α Antwort bilden. Für IRF-7 wurde in dieser Arbeit eine geringfügige insignifikante Steigerung der mRNA-Expression nach Applikation von apoptotischer DNA nachgewiesen. Ultraschall-fragmentierte DNA induzierte dagegen auch in einzelnen Tieren nicht mehr IRF-7, als in unbehandelten Referenztieren konstitutiv exprimiert wird. Dies könnte an dem Zeitpunkt der Messung liegen. Da die stärkste Expression des IRF-7 nach der Sezernierung des ersten Interferonsubtyps stattfindet, könnte zum Zeitpunkt der vollständigen IFN- α Antwort seine Funktion als positiver Regulator für eine effiziente IFN- α Produktion bereits beendet und deshalb die mRNA-Expression bereits herunterreguliert worden sein.

4.1.3.2. Apoptotische DNA induziert die Aktivierung von IFN- α

Durch die Applikation apoptotischer DNA konnte in dieser Arbeit im Mittel eine signifikant erhöhte IFN- α Produktion induziert werden. US-fragmentierte DNA dagegen erzielte diesbezüglich im Mittel keinen immunstimulatorischen Effekt (s. 3.1.3.4).

Im Körper zirkulierende DNA stammt überwiegend aus apoptotischen Prozessen und wird physiologischerweise schnell von Makrophagen unter anti-inflammatorischen Bedingungen phagozytiert, so dass es nicht zu einer Akkumulation von Selbst-DNA kommt. Extrazelluläre DNasen sorgen für eine schnelle Degradierung endogener DNA im Serum. Dennoch lassen sich auch bei Gesunden geringe Mengen freier DNA im Serum nachweisen¹⁸⁸ und auch in dieser Arbeit zeigte sich Wt Serum nicht gänzlich frei von DNA (s. 3.1.1). Im Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen der Serum-Nukleasen DNase I¹⁸⁹ oder SAP¹⁹⁰ zum Verlust der Toleranz gegenüber Selbst-DNA und der Entstehung Lupus-typischer Symptome, wie der Generierung von Antinukleären Antikörpern (ANA) und der Ausbildung einer Glomerulonephritis, führen kann. Beim Menschen sind Mutationen im Gen für DNase I mit der Erkrankung an SLE assoziiert¹⁹¹.

Dass beim SLE die Clearance von körpereigener DNA in einer Form gestört sein muss, belegen die Lupus-typischen Autoantikörper, von denen viele gegen apoptotische Zellbestandteile gerichtet sind¹⁹². *In vitro* zeigen Makrophagen von Lupus-Patienten eine verminderte Phagozytose apoptotischer Zellen¹⁹³ und in deren Plasma lassen sich regelmässig erhöhte Spiegel endogener DNA nachweisen¹⁹⁴. Komplementfaktoren, sowie die Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und/oder CR4 (CD11c/CD18) spielen bei der Clearance apoptotischer DNA eine Rolle. Dies beweist die direkte Bindung von C1q an apoptotische Körperchen¹⁹⁵ und die Ablagerung von weiteren Komplementfaktoren¹⁹⁶. Darüberhinaus zeigen Studien mit Komplement-defizienten Mäusen eine Abhängigkeit des Clearance-Defekts von der Position des defizienten Faktors in der Komplementkaskade. Das Fehlen der frühen Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungswegs, C1q und C4, sind dabei am stärksten mit der Entstehung des SLE und dem Schweregrad des Phänotyps assoziiert¹⁹⁷. Der Hypothese nach könnte bei einem durch Komplementmangel bedingten Abräumdefekt apoptotische DNA aus der Zirkulation an der marginalen Zone abgelagert werden und dort als Immunogen für die Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten und/oder als Antigen für die Formierung von Immunkomplexen fungieren.

DNA von Vertebraten besitzt jedoch per se keine immunstimulatorische Aktivität. Dass sie im Vergleich zu bakterieller oder viraler DNA als wenig immunstimulatorisch¹⁹⁸ gilt, wird im allgemeinen auf den geringeren Gehalt an CpG-Motiven¹⁹⁹, sowie vor allem auf den höheren Methylierungsstatus^{200;201} dieser Motive zurückgeführt. Die CpG-Motive der Vertebraten-DNA liegen, im Gegensatz zur DNA von Nicht-Vertebraten, zum grössten Teil in methylierter Form vor²⁰²⁻²⁰⁴. Dennoch enthält auch DNA von Vertebraten einige wenige hypomethylierte CpG-Motive, die zwar physiologischerweise nicht zu einer Immunaktivierung führen, diese aber auch nicht ausschliessen.

Apoptotische DNA erwies sich in dieser Arbeit im Gegensatz zu US-fragmentierter DNA als effizienter IFN- α Induktor. Miteinander gemein haben sie den fragmentierten Zustand der DNA. Dies deutet darauf hin, dass die Fragmentierung von DNA allein kein positiver Faktor für die Immunogenität zu sein scheint, sondern andere Apoptose-spezifische Strukturveränderungen eine Rolle spielen.

So könnten bei der apoptotischen Degradierung von DNA immunokryptische Epitope²⁰⁵ freigelegt werden oder veränderte Methylierungsmuster entstehen, die zu einer stimulatorischen Aktivität führen. Es gibt Hinweise darauf, dass DNA in IFN- α induzierenden oder B-Zell-stimulierenden Immunkomplexen von Lupus-Patienten sich von „normaler“ Vertebraten-DNA unterscheidet. So wurde über DNA-Methylierungsdefekte berichtet²⁰⁶ und über einen höheren Gehalt an CpG-Motiven²⁰⁷. Therapeutika, die als Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen wirken^{208;209}, führen oft als Nebenwirkung zu einem Medikamenten-induzierten Lupus. *In vitro* wurde für apoptotische DNA ebenfalls eine abnorme Hypomethylierung beschrieben, sowie ein besonders hoher Gehalt an CpG-reichen Regionen²¹⁰. In Nukleosomen aus B-Lymphomzellen der Zelllinie WEHI-231, aus der in dieser Arbeit ebenfalls DNA präpariert wurde, ist nach Apoptose bereits vermehrt Desoxymethylcytosin nachgewiesen worden²⁹.

US-fragmentierte DNA liegt nicht in überwiegend hypomethylierter Form vor. Da verschiedene Arbeitsgruppen jedoch *in vitro* gezeigt haben, dass sogar DNA mit überwiegend methylierten CpG-Motiven immunstimulatorisch wirken kann, allerdings wenn die Aufnahme mit Cytofectinen oder Carriern forciert wird, ist eine Immunogenität US-fragmentierter DNA nicht ganz auszuschliessen²¹¹⁻²¹³.

Obwohl US-fragmentierte DNA in dieser Arbeit im Mittel keine erhöhte IFN- α Produktion induzierte, konnte bei einzelnen Mäusen dennoch eine immunstimulatorische Wirkung gezeigt werden. Somit scheint die Fragmentierung doch auch eine Rolle zu spielen und andere Apoptose-spezifische Veränderungen können

nicht allein für die Immunogenität von DNA von Vertebraten verantwortlich gemacht werden. Durch Ultraschall wird die DNA unspezifisch in Fragmente verschiedener Grösse degeneriert. Bei der Apoptose hingegen entstehen Fragmente, die aus Oligonukleotiden definierter Länge bestehen, aus mindestens 180-,200bp und einem vielfachen davon. Somit könnte die spezifische Fragmentgrösse ein kritischer Faktor für die immunstimulatorische Aktivität sein, da bei der Fragmentierung mit Ultraschall auch DNA-Stücke entstehen können, die eine den apoptotischen DNA-Fragmenten vergleichbare Grösse haben. Bei der Applikation der DNA in die Mäuse erfolgte die mengenmässige Verteilung von Fragmenten mit eventuell kritischer Grösse zufällig und dies könnte erklären, warum einzelne Mäuse auch auf US-fragmentierte DNA reagierten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass apoptotische DNA in der Lage ist in mDCs der marginalen Zone der Milz von Wt Mäusen IFN- α zu aktivieren. Diese immunstimulatorische Wirkung erfolgte ohne einen zusätzlichen Carrier oder eine Transfektion und unabhängig von einer IgG-Immunkomplexbildung oder Fc γ -Rezeptoren. Damit kann gemäss der aufgestellten Hypothese die bei C4-/- Mäusen entdeckte spontane IFN- α Aktivierung der Frühphase der Erkrankung, mit der Stimulation der ebenfalls in diesen Mäusen nachgewiesenen erhöhten endogenen DNA erklärt und so ein Zusammenhang zwischen Komplementdefekt und erhöhtem IFN- α hergestellt werden.

4.1.4. Die Induktion Lupus-spezifischer Autoantikörper durch apoptotische DNA

Ein Charakteristikum des SLE ist der Nachweis von Antikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) und gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA-Ak). Diese bilden Immunkomplexe und können sich im Gewebe ablagern, wo sie Entzündungsreaktionen auslösen, in deren Verlauf es zu einer Schädigung der betreffenden Organe kommt. Defizienzen der Komplementfaktoren C1 und C4 sind sowohl beim Menschen als auch in der Maus mit der Entstehung von Autoantikörpern assoziiert⁶². Komplementmangel bedingte Störungen der Clearance-Mechanismen, die zu einer Akkumulation von DNA führen, könnten die Wahrscheinlichkeit erhöhen, einen SLE zu entwickeln²¹⁴. Komplement C4-defiziente Mäuse generieren ab etwa dem sechsten Lebensmonat Autoantikörper gegen dsDNA^{215;216}. Vorangehende Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten bei diesen Tieren ein spontan aktiviertes Typ I-Interferonsystem in einem Alter von vier Wochen, lange bevor erste Zeichen einer Autoimmunerkrankung auftreten.

Die Applikation von apoptotischer DNA in Wt Mäuse führte in dieser Arbeit zu einer gesteigerten mRNA-Expression von IFN- α . (s. 3.1.3). Die Hypothese ist, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der gesteigerten Produktion von IFN- α in C4-defizienten Mäusen und der Entstehung autoreaktiver Antikörper besteht. Aufgrund einer gestörten Clearance von apoptotischer DNA und der resultierenden Ablagerung von Immunkomplexen an Marginalzonen-Makrophagen könnte demnach IFN- α autoreaktive B-Zellen stimulieren.

Daher wurde untersucht, ob apoptotische DNA über die Aktivierung des Typ I-Interferonsystems Toleranz überwinden und langfristig zu der Entstehung einer Autoimmunität führen kann (s. 3.1.4). Hierzu wurde die Generierung von Autoantikörpern über einen längeren Zeitraum gemessen. Dabei wurde zum einen apoptotische DNA direkt in die Zirkulation gebracht und zum Vergleich mit Pristane *in vivo* Apoptose in den Tieren induziert. Nach Pristane-Applikation waren dsDNA-Ak nach 6 Monaten nachweisbar, dagegen führte die Applikation apoptotischer DNA schon ab dem Tag 27 zu einer signifikant erhöhten Generierung von dsDNA-Ak, welche auch nach 6 Monaten noch nachweisbar war.

In dieser Arbeit konnte mit der *in vivo* Induktion von Apoptose in Wt Mäusen durch Pristane eine Autoimmunantwort induziert werden. Für Pristane wurde bereits beschrieben, dass es mit Lupus assoziierte Antikörper in nicht-autoimmunen Mäusen induziert²¹⁷. Pristane ist ein Hydrocarbonöl, das sich im gesamten murinen System verteilt und dauerhaft in verschiedene Organe einlagert. Sein Autoimmunität-induzierendes Potential wurde damit in Verbindung gebracht, dass es sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Apoptose-Induktor von murinen peritonealen Zellen, insbesondere myeloiden und lymphoiden DCs, erwies²¹⁸. Die Apoptose induziert es aller Wahrscheinlichkeit nach unabhängig von Fas-Rezeptoren auf dem intrinsischen Weg. Dabei stört Pristane vermutlich die Integrität der Zellmembran, indem es sich in die Lipiddoppelschicht einlagert und im hydrophoben Kompartiment persistiert²¹⁹.

Nach Applikation von apoptotischer DNA dagegen wurde bei allen Versuchstieren eine signifikante Produktion von dsDNA-Ak bereits am Tag 27 nachgewiesen, welche auch nach 6 Monaten Bestand hatte (s. 3.1.4 **Abb. 18**). Bei 90% der Tiere konnten auch ANA nachgewiesen werden (s. 3.1.4 **Abb. 19**). Damit wurde durch apoptotische DNA nicht nur das Typ I-Interferonsystem aktiviert, sondern auch eine Autoantikörperantwort induziert. Im Tiermodell ist es bereits früher gelungen, mit der Injektion apoptotischer Zellen in gesunden Mäusen eine Autoantikörperantwort zu induzieren²²⁰. Jedoch wurde in jener Studie nur eine vorübergehende Produktion von ANA nachgewiesen, die einige Zeit nach der letzten Injektion wieder aufhörte. In dieser Arbeit dagegen führte die

mehrfache Applikation von apoptotischer DNA, die in der ersten Woche des Versuchszeitraumes erfolgte, zu einer dauerhaften Induktion von Autoantikörpern. Ein Grund für die nur vorübergehende Generierung von Autoantikörpern in der oben beschriebenen Studie könnte sein, dass mit der Injektion von apoptotischen Zellen, im Gegensatz zu der hier verwendeten apoptotischen DNA, die Phagozytosekapazität von Makrophagen zwar zeitweilig überschritten wurde, aber dennoch physiologische Phagozytoseprozesse ablaufen konnten. Aufgrund der Expression von sogenannten „eat-me“-Signalen auf den apoptotischen Zellen könnte z.B. die Induktion der Apoptose-spezifischen Zytokinbalance, mit der Produktion anti-inflammatorischer und der Inhibition proinflammatorischer Zytokine, langfristig zu einer Regenerierung der Effektivität der Clearance-Mechanismen führen, in deren Verlauf die Autoantikörperbildung abnimmt. Dies könnte auch erklären, warum die Generierung von dsDNA-Ak nach Pristane erst zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar war.

Die Applikation von apoptotischer DNA führte in dieser Arbeit zu einer Aktivierung von IFN- α . Da auch in gesunden Wt Mäusen ein geringes Mass an endogener DNA in der Zirkulation gefunden wurde in Abwesenheit von erhöhter IFN- α mRNA-Expression, ist davon auszugehen, dass geringe Mengen vom Immunsystem toleriert werden. Die Menge der hier applizierten apoptotischen DNA könnte die Kapazität der Makrophagen zur Clearance überschritten und in der Folge zu einer abnormen Präsentation an dendritische Zellen in der MZ der Milz geführt haben. Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass das Targeting von endogener DNA in die MZ bei Wt Mäusen durch eine mehrmalige Applikation von IgM gegen dsDNA zu einer dauerhaften IgG-Immunantwort gegen dsDNA führte²²¹. Die Bedeutung der Lokalisation der DNA enthaltenden Immunkomplexe an der marginalen Zone wird dadurch unterstrichen, dass in dem autoimmunen Mausstamm NZB/NZW die Marginalzonen-B-Zellen als die dsDNA-Antikörper produzierenden Zellen identifiziert wurden^{222;223}. Zudem wurde eine verstärkte Präsenz autoreaktiver B-Zellen für diese Region beschrieben²²⁴. Das in dieser Arbeit durch apoptotische DNA induzierte IFN- α wird an der marginalen Zone gebildet und könnte dort solche B-Zellen aktivieren. IFN- α hat bekanntermassen die Eigenschaft, verstärkend auf die humorale Immunantwort zu wirken. Darüberhinaus könnte IFN- α auch bei der hier nachgewiesenen Langzeit-Autoantikörperproduktion eine Rolle spielen, da es allgemein an der langanhaltenden Produktion von Antikörpern und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses beteiligt ist²²⁵. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe haben auch zeigen können, dass bei Defizienz des IFN- α/β Rezeptors die Applikation von IgM gegen dsDNA nicht zu einer Langzeit-IgG-Immunantwort führte. Bei Lupus-Patienten wurde auch eine

Korrelation von erhöhten IFN- α Serumspiegeln und hohem dsDNA-IgG-Titer gefunden⁹⁵. Zudem ist die Bildung von Autoantikörpern eine häufige Nebenwirkung innerhalb einer IFN- α Therapie^{226;227}.

Zusammenfassend könnte apoptotische DNA aufgrund der hier bereits diskutierten besonderen Struktur apoptotischer DNA gemeinsam mit dem Fehlen entsprechender sogenannter „eat-me“-Signale für eine physiologische Clearance durch Makrophagen, über die Induktion von IFN- α dazu führen, dass Toleranz überwunden wird und Autoantikörper entstehen. Die Hypothese der verminderten Clearance von apoptotischer DNA bei Komplementdefizienz bietet somit eine Erklärung für die Entstehung der Lupus-typischen Autoantikörper in der Bereitstellung von IFN- α .

4.2. Untersuchung zum Mechanismus der IFN- α Induktion durch apoptotische DNA *in vivo*

4.2.1. Die Bedeutung des TLR9-Rezeptors für die durch apoptotische DNA vermittelte IFN- α Induktion

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass eine Aktivierung von CD11b+ Zellen der marginalen Zone durch DNA-enhaltende Immunkomplexe zur Produktion von IFN- α auf besondere Rezeptoren angewiesen zu sein scheint, da die Lokalisation des T-Zellunabhängigen Antigens TNP-Ficoll nicht zu einer Aktivierung von IFN- α führte²²⁸. Andere Arbeitsgruppen haben bereits *in vitro* gezeigt, dass einer der Aktivierungswege für Chromatin- bzw. DNA-enhaltende Immunkomplexe über den TLR9 führt²²⁹⁻²³¹. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob TLR9 bei der in 3.1.3.4 gezeigten Induktion von IFN- α durch apoptotische DNA auch *in vivo* eine Rolle spielt. In TLR9-/- Mäusen wurde durch Applikation von apoptotischer DNA keine erhöhte IFN- α Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Tieren induziert (s. 3.2.1). Damit konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass *in vivo* die durch apoptotische DNA induzierte IFN- α Aktivierung über einen TLR9-abhängigen Signalweg vermittelt wird.

Ursprünglich wurde TLR9 als der Rezeptor für bakterielle und virale DNA identifiziert. Später konnte gezeigt werden, dass der eigentliche Ligand ein Motiv aus unmethylierten CG-Dinukleotiden ist^{232;233}. CpG-DNA induziert über die TLR9-vermittelte Signaltransduktion die Proliferation von B-Zellen und in pDCs die Produktion von IFN- α ²³⁴⁻²³⁶. Studien mit verschiedenen synthetischen CpG-Motiv-enhaltenden Oligonukleotiden (CpG-ODN) haben gezeigt, dass einzelsträngige CpG-

DNA (ssCpG-DNA) Sequenz- und pH-abhängig²³⁷ direkt an den TLR9 bindet. Für doppelsträngige CpG-DNA hingegen wurde eine sehr schwache Bindungsaktivität nachgewiesen, was im Kontrast zur Aktivierbarkeit des TLR9 durch natürliche bakterielle dsDNA steht.

Neuere Untersuchungen deuten jedoch an, dass die Bindung des TLR9 durch DNA nicht allein abhängig von der Spezies oder dem Gehalt an CpG-Motiven zu sein scheint, da auch Oligonukleotide ohne CpG-Motive und Vertebraten-DNA den TLR9 aktivieren konnten, wenn deren endosomale Translokation mit Cytosectinen forciert wird²³⁸⁻²⁴⁰. Somit ist eine Aktivierung des TLR9 durch endogene Liganden unabhängig von einer Infektion vorstellbar und wird kritisch für den Verlust von Toleranz gegen Autoantigene betrachtet. Die extrazellulär exprimierten TLRs erkennen pathogenspezifische Strukturen, die in Vertebraten nicht vorkommen. Dagegen werden alle TLRs, die für Nukleinsäuren spezifisch sind, intrazellulär exprimiert²⁴¹. Es wird angenommen, dass die intrazelluläre Lokalisation mit der Funktion des Rezeptors für diese Art von Liganden zusammenhängt. Es ist denkbar, dass Nukleinsäure-Liganden erst endosomal modifiziert werden müssen, bevor sie den TLR9 aktivieren können. So erfordert eine Signaltransduktion von CpG-DNA über den TLR9 eine Acidifizierung des Endosoms²⁴². Eine Hypothese ist, dass dessen saures und chemisch reduzierend wirkendes Milieu internalisierte dsCpG-DNA in mehrere ssCpG-DNA-Motive degradiert, da eine direkte Bindung von dsCpG-DNA an TLR9, wohl aber von ssCpG-DNA, nicht bewiesen werden konnte²⁴³. Andererseits wurde jedoch auch schon eine direkte Interaktion von ds Plasmid-DNA und TLR9 gezeigt²⁴⁴.

Eine weitere Funktion der intrazellulären Lokalisation könnte darin bestehen, dass mit der endosomalen Kompartimentalisierung des Bindungsereignisses zwischen Rezeptor und Ligand vielleicht eine für die Aktivierung notwendige Aufkonzentrierung des Liganden bis zu einem Schwellenwert gewährleistet wird²⁴⁵. Am ehesten jedoch wird in der intrazellulären Lokalisierung des Rezeptors ein Mechanismus zur Unterscheidung zwischen DNA pathogenen oder körpereigenen Ursprungs angenommen²⁴⁶. Damit wäre die Zugänglichkeit des intrazellulären TLR9 der kritische Faktor für die Immunogenität von DNA. Unter Bedingungen, die zu einer Internalisierung endogener Nukleinsäuren führen, wäre die Aktivierung von IFN- α und letztendlich die Entstehung von Autoimmunerkrankungen denkbar. Sowohl mit DNA enthaltenden Immunkomplexen, isoliert aus dem Serum von Lupus-Patienten, als auch mit künstlich zusammengesetzten Immunkomplexen aus apoptotischen Zellen und IgG von Lupus-Patienten konnten *in vitro* humane pDCs zur IFN- α Produktion aktiviert werden^{247;248}.

Wegweisend für die Aufklärung der Internalisierung und Aktivierung war die Entdeckung, dass *in vitro* endogenes Chromatin im Komplex mit IgG autoreaktive B-Zellen über den TLR9 aktivieren kann, wenn es via B-Zellrezeptor internalisiert wird²⁴⁹. Für DCs konnte *in vitro* ein ähnliches duales Rezeptorsystem gezeigt werden, dabei werden Chromatin-enhaltende Immunkomplexe durch Fc γ -Rezeptoren internalisiert. Beim Menschen scheinen Polymorphismen in den Fc γ -Rezeptoren auch mit der Entstehung des SLE assoziiert zu sein^{250;251}. Für das murine System wurde *in vitro* eine Beteiligung des Fc γ RIII (CD16) in der Aktivierung von mDCs gezeigt²⁵², in humanen pDCs scheint Fc γ RIIa (CD32) die Immunkomplexe zu internalisieren und dem TLR9 zuzuführen²⁵³. Allerdings zeigte sich die Aktivierung muriner mDCs in TLR9-/- und MyD88-/- Mäusen nicht komplett inhibiert, was auf die Existenz eines möglichen TLR9- oder MyD88-unabhängigen Weges hindeutet²⁵⁴. In dieser Arbeit jedoch konnte im Gegensatz dazu kein alternativer TLR9-unabhängiger Aktivierungsweg für apoptotische DNA gezeigt werden. Für DNA, die nicht in Form von IgG-Immunkomplexen vorliegt und somit keine Fc γ -Rezeptor vermittelte Translokation stattfindet, wird hier *in vivo* gezeigt, dass die apoptotische DNA-induzierte IFN- α Aktivierung in mDCs allein von der Signaltransduktion des TLR9 abhängt. IgG-Immunkomplexe finden sich bei SLE erst in einer späteren Phase der Erkrankung, somit deutet die IgG-unabhängige Immunogenität apoptotischer DNA eine grosse Bedeutung der IFN- α Induktion durch Nukleinsäuren über TLR9 für die frühe Phase der Entstehung des SLE an. Andere Arbeiten haben auch *in vitro* gezeigt, dass eine Aktivierung von DCs durch Vertebraten-DNA ohne Komplexbildung mit IgG-Autoantikörpern erfolgen kann, allerdings wurde deren Internalisierung entweder durch einen zusätzlichen Carrier²⁵⁵ oder durch Transfektion mittels Zytokinen²⁵⁶ forciert. Welche Mechanismen dazu führen, dass die apoptotische DNA IgG-unabhängig internalisiert wird, ist bislang nicht geklärt. Für CpG-DNA wurde eine Internalisierung durch Endozytose mittels unspezifischer Bindung an Zelloberflächenproteine wie z.B. Clathrin gezeigt^{257;258}. Natürliches IgM und die Formierung von IgM-DNA Immunkomplexen könnten eine Rolle spielen. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe haben bereits *in vivo* eine Aktivierung von IFN- α durch IgM anti-dsDNA gezeigt²⁵⁹. Wie die IgM-DNA Immunkomplexe in die Zelle gelangen könnten, ist bisher noch nicht bekannt. Der IgM-Fc-Rezeptor²⁶⁰, welcher bei der Internalisierung von mit IgM opsonisierten Pathogenen in B-Zellen und Makrophagen eine Rolle spielt, könnte ein möglicher Vermittler in die Zelle sein.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass *in vivo* apoptotische DNA IFN- α exklusiv über den TLR9-Signalweg induziert und zwar unabhängig von IgG-Immunkomplexen oder

Fc-Rezeptoren. Damit könnte dieser Aktivierungsweg verantwortlich für die frühe IgG-unabhängige Produktion von IFN- α durch endogene DNA in komplementdefizienten Mäusen sein.

4.2.2. Der Einfluss von apoptotischer DNA auf die Expression von Toll like Rezeptoren

In dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der IFN- α Induktion durch apoptotische DNA von der Signaltransduktion über TLR9 nachgewiesen, da in TLR9-/- Mäusen keine erhöhte IFN- α Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Tieren induziert wurde (s. 3.2.1). Ausserdem sollte untersucht werden, ob die Immunogenität apoptotischer DNA (s. 3.1.3.4) auf reziproke Weise die Expression ihres spezifischen Rezeptors beeinflusst. Dazu wurde das Expressionsprofil von TLR3 und TLR9 nach Applikation von apoptotischer DNA dargestellt.

Die Applikation apoptotischer DNA führte zu einer tendentiellen Abnahme der TLR3 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren, während die TLR9 mRNA-Expression signifikant erhöht wurde (s. 3.2.2).

Die konstitutive Expression der verschiedenen TLRs, die allgemein auf DCs, Makrophagen und B-Zellen beschränkt ist, differiert in den exprimierenden Zelltypen. Während TLR9 in humanen pDCs und B-Zellen exprimiert wird, kommt TLR3 restriktiv nur in mDCs vor^{261;262}. TLR3 und TLR9 unterscheiden sich zusätzlich von anderen TLRs darin, dass sie intrazellulär exprimiert werden. Während andere TLRs nach der Translation der mRNA im Ribosom auf sekretorischem Wege an die Zelloberfläche translozieren, verbleiben Nukleinsäure erkennende TLRs (TLR3, TLR7 und TLR9) intrazellulär. TLR9 befindet sich in ruhenden Zellen im Endoplasmatischen Reticulum und fusioniert erst nach der Zellaktivierung mit den intrazellulären Vesikeln, die den Liganden enthalten^{263;264}. Es wird angenommen, dass es sich dabei um einen Schutz-Mechanismus handelt, der TLRs, die Nukleinsäuren erkennen, vor einer Stimulierung durch eigene DNA oder RNA schützt. Da die TLR-Expressionsprofile des Menschen sich von denen der Maus unterscheiden, können Ergebnisse aus dem Mausmodell nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Beim Menschen sind die natürlichen IFN- α produzierenden Zellen, die auch den TLR9 exprimieren, vom Typ der pDCs. In diesem murinen Versuchsmodell dagegen wird IFN- α durch apoptotische DNA in mDCs induziert (s. 1.2.2). Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse haben dennoch eine grosse Relevanz bezüglich der IFN- α Induktion durch apoptotische DNA für die

Entstehung des SLE beim Menschen, da die untersuchten murinen mDCs sowohl TLR3 als auch TLR9 tragen.

Die Regulation der Expression der TLRs ist bis heute noch nicht zusammenhängend geklärt. Es wird jedoch scheinbar ein sensibles Gleichgewicht zwischen den einzelnen TLRs eines Zelltyps aufrechterhalten. Die Hochregulation der TLR9 mRNA-Expression durch apoptotische DNA in dieser Arbeit könnte im Rahmen der Immunabwehr ein Teil der Zytokin vermittelten Verstärkerschleife zur Erkennung von Pathogenen durch phagozytierende Zellen sein. So wurde *in vitro* für Stimuli wie LPS und einige proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , TNF- α) gezeigt, dass diese einen hochregulierenden Einfluss auf die Expression von TLR4 und TLR2 haben, während zeitgleich TLR5 herunterreguliert wurde²⁶⁵. Die signifikant gesteigerte TLR9 mRNA-Expression durch apoptotische DNA unterstreicht die spezifische Bedeutung dieses Rezeptors für die Aktivierung von IFN- α . Kürzlich wurde für Lupus-Patienten eine erhöhte TLR9 mRNA-Expression in PBMCs²⁶⁶ und B-Zellen²⁶⁷ gezeigt, die im allgemeinen mit der Aktivität der Erkrankung, und im besonderen mit der Aktivität von IFN- α , korreliert.

Gleichzeitig wurde hier eine tendentielle Herunterregulierung der TLR3 mRNA-Expression festgestellt. Für TLRs mit dem gleichen Signaltransduktionsweg wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung eines TLR mit der Inhibierung anderer TLRs einhergeht^{268;269}. Somit könnte die Herunterregulierung des TLR3 zeitgleich mit der Hochregulation des TLR9 auf einen kompetitiven Hemm-Mechanismus hindeuten, in dem der für apoptotische DNA irrelevante TLR3 zugunsten einer gesteigerten Expression des TLR9 supprimiert wird.

4.2.3. Der Einfluss der Komplement C4-Defizienz auf die TLR9 mRNA-Expression

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass apoptotische DNA zu einer IFN- α in Abhängigkeit von der Signaltransduktion über TLR9 induziert und zum anderen die mRNA-Expression des TLR9 hochreguliert. Ob eine erhöhte TLR9 mRNA-Expression kausal mit höheren Spiegeln endogener DNA oder mit einer daraus resultierenden IFN- α Aktivierung zusammenhängt, welche sowohl in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe spontan bei C4-defizienten Mäusen, als auch in dieser Arbeit in Wt Mäusen durch Induktion nachgewiesen werden konnte (s. 3.1.3.4), sollte im Folgenden geklärt werden. Dazu wurde die konstitutive TLR9 mRNA-Expression in C4-defizienten Mäusen mit der von Wt Mäusen verglichen. Desweiteren wurde die TLR9 mRNA-Expression von C4-defizienten Mäusen ohne funktionellem IFN- α/β Rezeptor (C4-/-

IFNAR^{-/-} Doppelknockout) untersucht. Zur Kontrolle wurden die mRNA-Expressionen von IFN- α und TLR3 aller drei Mausstämme (Wt, C4^{-/-}, C4^{-/-}IFNAR^{-/-} Doppelknockout) mitgemessen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Komplement C4-Defizienz die mRNA-Expression von TLR9 konstitutiv erhöht ist und dass dies kausal mit einer Aktivierung von IFN- α zusammenhängt (s.3.2.3). Zum einen wurde in C4-defizienten Mäusen, die eine signifikant gesteigerte IFN- α mRNA-Expression aufweisen, auch eine konstitutiv erhöhte TLR9 mRNA-Expression im Vergleich zu Wt Mäusen nachgewiesen. Zum anderen konnte kein Unterschied in der IFN- α oder TLR9 mRNA-Expression von C4-defizienten Mäusen ohne funktionellem IFN- α/β Rezeptor (Doppelknockout) im Vergleich zu Wt Mäusen festgestellt werden, wohl aber ein signifikanter Unterschied zu C4-defizienten Mäusen mit IFN- α/β Rezeptor. Für die TLR3 mRNA-Expression konnte in C4-defizienten Mäusen mit und ohne IFN- α/β Rezeptor kein Unterschied zu Wt Mäusen festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein erhöhter Spiegel endogener DNA nur dann zu einer Hochregulation der Expression des TLR9 zu führen scheint, wenn der IFN- α Signalweg vorhanden ist.

Für andere TLRs wurde bereits gezeigt, dass nicht der Ligand, sondern proinflammatorische Zytokine die Expression beeinflussen²⁷⁰. Auch in dieser Arbeit scheint die verstärkte Expression von TLR9 nicht auf die erhöhte Präsenz endogener DNA zurückzuführen zu sein, sondern auf die IFN- α Aktivierung in diesen Tieren. Denn C4-defiziente Mäuse ohne funktionellem IFN- α/β Rezeptor zeigten nicht nur eine signifikant verringerte IFN- α mRNA-Expression, sondern auch eine signifikant verringerte TLR9 mRNA-Expression im Vergleich zu Tieren, die diesen Rezeptor besitzen. Somit scheint hier eine Art Feedbackmechanismus vorzuliegen. So könnte IFN- α , nach der initialen Induktion durch apoptotische DNA über konstitutiv exprimierte TLR9-Rezeptoren, auf autokrine Weise in einer positiven Rückkopplungsschleife die Expression des TLR9 hochregulieren. Solch ein Feedbackmechanismus für IFN- α ist bereits für die Generierung einer vollständigen IFN- α Antwort beschrieben worden, wobei erst die Sezernierung des ersten IFN- α Subtyps auf autokrine Weise über den IFN- α/β Rezeptor zur Expression des Interferon-regulierenden Faktors 7 (IRF-7) und dieser zur Produktion der anderen IFN- α Subtypen führt²⁷¹. Eine Regulation der Expression des TLR9 durch IFN- α über einen positiven Feedbackmechanismus wird hier zum ersten Mal gezeigt. Besteht eine dauerhafte Störung der Clearance von

endogener DNA, wie es bei C4-Defizienz gegeben ist, könnte über diesen Feedbackmechanismus durch die permanente Aktivierung von IFN- α Toleranz überwunden werden.

4.2.4. Untersuchung zur Interferenz des IFN- α Induktionsmechanismus durch Chloroquin

In dieser Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass die IFN- α Induktion durch die Gabe von exogener apoptotischer DNA *in vivo* von der Signaltransduktion über den TLR9 abhängig ist, da in Tieren ohne funktionellem TLR9-Rezeptor kein IFN- α durch apoptotische DNA induziert wird (s. 3.2.1). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Gabe von apoptotischer DNA eine signifikant gesteigerte Expression von TLR9, nicht jedoch von TLR3, induzierte (s. 3.2.2). Im Falle erhöhter endogener apoptotischer DNA, wie bei Komplementdefizienz, konnte in C4-/- Mäusen eine gegenüber Wt Mäusen spontan erhöhte IFN- α und TLR9 mRNA-Expression nachgewiesen werden, die in C4-/-Tieren ohne funktionellem IFN- α/β Rezeptor signifikant geringer war und derjenigen von Wt Mäusen entsprach (s. 3.2.3). Darauf basierend wurde die Hypothese eines Feedbackmechanismus für IFN- α und TLR9 aufgestellt (s. 4.2.3). Untersucht werden sollte deshalb, ob dieser IFN- α Induktionsmechanismus gestört werden kann. Dazu wurde der Einfluss von Chloroquin auf die durch apoptotische DNA induzierte mRNA-Expression von IFN- α , TLR3 und TLR9 untersucht (s. 3.2.4).

Die Vorbehandlung mit Chloroquin führte zu einer Verringerung der mRNA-Expression aller drei Parameter. Die mRNA-Expression von TLR3 und TLR9 wurde signifikant herunterreguliert. Für die Expression von IFN- α zeigte sich ein Trend zu einer Hemmung, jedoch exprimierten mit Chloroquin vorbehandelte Wt Mäuse immer noch signifikant mehr IFN- α mRNA als unbehandelte Referenztiere.

Für Chloroquin wurde mehrfach gezeigt, dass es die TLR9-vermittelte Zellaktivierung durch CpG-DNA hemmt. Der Wirkmechanismus *in vivo* ist bis heute nicht genau geklärt, es wird jedoch vermutet, dass es mit der Acidifizierung des Endosoms interferiert, die für die Aktivierung eines endosomalen Rezeptors essentiell ist^{272;273}. Chemisch ist es eine schwach basische Substanz, die in Endosomen akkumuliert und in hohen Konzentrationen den pH-Wert stört²⁷⁴. Chloroquin ist ein Medikament zur Behandlung und Prophylaxe der Malaria, es wird jedoch schon lange erfolgreich für die Behandlung diskoider Lupus-Formen und der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Im Mausmodell konnte Chloroquin *In vitro* die Aktivierbarkeit sowohl von B-Zellen als auch

von pDCs und mDCs durch DNA- und RNA-enhaltende Immunkomplexe inhibieren²⁷⁵⁻²⁷⁷. Fraglich ist, ob unter endosomal basischen Bedingungen die Funktionalität des TLR-Rezeptors und damit die Signalweiterleitung gestört wird oder ob die direkte Bindung von DNA beeinträchtigt ist. In dieser Arbeit wurde mit Chloroquin nur eine tendenzielle Hemmung der durch apoptotische DNA induzierten IFN- α Induktion erreicht. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen geringe Konzentrationen von Chloroquin eine vollständige Hemmung der Aktivierbarkeit von TLR9 induzierten. Denkbar ist, dass die in dieser Arbeit einmalige Gabe von Chloroquin nicht ausreichte, um ebenfalls eine vollständige Hemmung zu erreichen und deshalb eine mehrfache Gabe indiziert wäre, um eine ausreichende Akkumulation des Wirkstoffs in den endosomalen Vesikeln zu erreichen. Andererseits deuten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen auch darauf hin, dass der therapeutische Effekt des Chloroquins bei Autoimmunerkrankungen nicht nur in der Veränderung des pH-Werts besteht. So zeigte sich die CpG-DNA vermittelte Signaltransduktion durch Chloroquin *in vitro* auch bei Konzentrationen blockiert, die für eine endosomale pH-Verschiebung nicht ausreichend gewesen wären²⁷⁸. Vermutet wird, dass Chloroquin auch direkt die Bindung von CpG-DNA an TLR9 beeinflusst und somit als TLR9-Antagonist betrachtet werden kann²⁷⁹. Auch wenn in dieser Arbeit keine signifikante Hemmung der durch apoptotische DNA induzierten IFN- α mRNA-Expression erreicht werden konnte, scheint die Art und Weise der Chloroquin-Gabe zumindest ausreichend zu sein, den hypothetischen IFN- α /TLR9-Feedbackmechanismus zu stören.

Die durch apoptotische DNA induzierte verstärkte TLR9 mRNA-Expression wurde signifikant gehemmt, so dass kein Unterschied zur konstitutiven TLR9 mRNA-Expression unbehandelter Tiere bestand. Die TLR3 mRNA-Expression, die in dieser Arbeit durch apoptotische DNA unbeeinflusst blieb, wurde durch Chloroquin sogar noch auf ein Expressionsniveau unterhalb des konstitutiven unbehandelter Tiere herunterreguliert. Auch *in vitro* konnte eine Reduktion der TLR3 mRNA-Expression durch das Einwirken proinflammatorischer Zytokine gesehen werden, ohne dass dies bislang hinreichend erklärt werden konnte²⁸⁰.

Chloroquin konnte in dieser Arbeit über eine beeinträchtigte Signalweiterleitung des TLR9 zwar keine vollständige Hemmung der IFN- α Induktion erreichen. Jedoch war die Hemmung der IFN- α Induktion ausreichend, um eine Hochregulierung der TLR9-Expression im Rahmen einer positiven Rückkopplung zu verhindern.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit *in vivo* für Chloroquin gezeigt werden, dass es auf die durch apoptotische DNA induzierte IFN- α Aktivierung nur einen tendentiell hemmenden Einfluss hat. Dagegen wird die durch apoptotische DNA induzierte TLR9

mRNA-Expression signifikant gehemmt, so dass diese vergleichbar mit derjenigen unbehandelter Referenztiere ist. Diese Ergebnisse unterstützen zwar die hier vorgestellte Hypothese der Existenz eines IFN- α /TLR9-Feedbackmechanismus, aber leider reichte die Darreichungsform für Chloroquin in diesem Versuchsmodell nicht aus, um eine echte Hemmung der IFN- α Induktion durch apoptotische DNA zu erreichen. Dennoch scheint für Chloroquin grundsätzlich das Potential vorhanden zu sein, die durch apoptotische DNA induzierte IFN- α Aktivierung zu beeinflussen, da ein hemmender Einfluss auf die mRNA-Expression des TLR9-Rezeptors nachgewiesen werden konnte. Die hemmende Wirkung für Chloroquin auf die durch apoptotische DNA induzierte TLR9 mRNA-Expression hätte ebenfalls auch IFN- α betreffen müssen, zum einen aufgrund der zahlenmässigen Reduktion signaltransduzierender Rezeptoren für apoptotische DNA und zum anderen als Folge des hier gezeigten Feedbackmechanismus. Dies scheint in unserem Versuchsmodell weniger an der Existenz eines alternativen Weges für die IFN- α Aktivierung zu liegen, als eine Folge der richtigen Dosierung und/oder Inkubationszeit zu sein.

Zusammenfassend lassen die hier vorgestellten Ergebnisse für Chloroquin zwar eine Tendenz erkennen, z.B. im Falle einer Komplementdefizienz eine initiale Aktivierung von IFN- α durch erhöhte Spiegel endogener DNA stören zu können. Ob eine Behandlung mit Chloroquin einen Toleranzverlust verhindern und somit auch in der Frühphase der Entstehung des SLE bedeutsam sein könnte, müsste jedoch genauer untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine systemische Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie aus der Gruppe der Kollagenosen mit chronisch-rheumatischem Verlauf. Auf genetischer Ebene beobachtet man eine Assoziation des SLE mit einer Defizienz von Faktoren des klassischen Komplementaktivierungsweges C1q, C4 und C2. Ein Erklärungsansatz hierfür basiert auf der Beobachtung, dass apoptotische Körperchen als Quelle für Lupus-typische Autoantikörper weniger gut phagozytiert werden können, wenn C1q oder C4 fehlen. Einen weiteren zentralen Faktor scheint das antivirale Zytokin Interferon- α (IFN- α) darzustellen, da bei Patienten mit Systemischen Lupus erythematoses regelmäßig erhöhte IFN- α Spiegel oder eine erhöhte Expression von Interferon induzierten Genen beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass C4-defiziente Mäuse vor dem Auftreten erster Anzeichen einer Autoimmunerkrankung, jedoch bei bereits aktiviertem Typ I Interferonsystem, erhöhte Spiegel endogener DNA apoptotischen Ursprungs im Serum aufweisen. Ausserdem konnte nachgewiesen werden, dass sich diese DNA an den CD11b+ Zellen der marginalen Zone der Milz anlagert. Der Komplementmangel bedingte Phagozytose-Defekt C4-defizienter Mäuse konnte in einem mit der Applikation apoptotischer DNA in Wt Mäusen nachgeahmt werden und resultierte in der Aktivierung von IFN- α . In dieser Arbeit wurde ein kausaler Zusammenhang für die spontane Aktivierung von IFN- α in C4-defizienten Mäusen und der späteren Entstehung autoreaktiver Antikörper gefunden, indem es gelang, mit der Applikation apoptotischer DNA in Wt Mäusen eine langfristige Generierung von dsDNA-Ak zu induzieren. Dabei wurde auch eine Aktivierung des Toll like Rezeptors 9 beobachtet, die ebenfalls in C4-defizienten Mäusen besteht und hier über einen positiven Feedbackmechanismus durch IFN- α reguliert wird. Somit konnte in dieser Arbeit die Theorie der Arbeitsgruppe, dass der Mangel der Komplementkomponente C4 über eine ungenügende Elimination endogener DNA zu einer gesteigerten Produktion von IFN- α und somit zur langfristigen Bildung von Autoantikörpern und damit zur Entstehung von SLE führt, vervollständigt werden.

Aus dieser Theorie ergeben sich neue therapeutische Optionen, die zum einen in der Verbesserung der sogenannten Clearance apoptotischer Körperchen und zum anderen in der direkten Blockade von IFN- α und/oder in der Regulierung der IFN- α Aktivierung über die Inhibition des TLR9-abhängigen Signaltransduktionsweges bestehen.

II Referenzen

1. Frank M.M. and Fries L.F. 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology Today* 12:322-326.
2. O'Neill L.A. 2004. After the Toll Rush. *Science* 303:1481-1482.
3. Goodnow C.C., Adelstein S., and Basten A. 1990. The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* 248:1373-1379.
4. Hartley S.B., Cooke M.P., Fulcher D.A., Harris A.W., Cory S., Basten A., and Goodnow C.C. 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72:325-335.
5. Seo S.J., Mandik-Nayak L., and Ericson J. 2003. B cell anergy and systemic lupus erythematosus. *Current directions in autoimmunity* 6:1-20.
6. Goodnow C.C., Crosbie J., Jorgensen H., Brink R.A., and Basten A. 1989. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature* 342:385-391.
7. Tiegs S.L., Russell D.M., and Nemazee D. 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *Journal of Experimental Medicine* 177:1009-1020.
8. Pulendran B., van Driel R., and Nossal G.J. 1997. Immunological tolerance in germinal centres. *Immunology Today* 18:27-32.
9. Kelsoe G. 1996. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 4:107-111.

10. Hollmann C. and Gerdes J. 1999. Follicular dendritic cells and T cells: nurses and executioners in the germinal centre reaction. *Journal of Pathology* 189:147-149.
11. Fields M.L., Seo S.J., Nish S.A., Caton A.J., and Erikson J. 2003. The regulation and activation potential of autoreactive B cells. *Immunologic research* 27:219-234.
12. Hollmann C. and Gerdes J. 1999. Follicular dendritic cells and T cells: nurses and executioners in the germinal centre reaction. *Journal of Pathology* 189:147-149.
13. Guzman-Rojas L., Sims-Mourtada J.C., and Martinez-Valdez H. 2002. Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology* 107:167-175.
14. Pulendran B., van Driel R., and Nossal G.J. 1997. Immunological tolerance in germinal centres. *Immunology Today* 18:27-32.
15. Rathmell J.C. 2003. Apoptosis and B cell tolerance. *Current directions in autoimmunity* 6:38-60.
16. Rothstein T.L., Wang J.K., Panka D.J., Foote L.C., Wang Z., Stanger B., Cui H., Ju S.T., and Marshak-Rothstein A. 1995. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* 374:163-165.
17. Rathmell J.C., Cooke M.P., Ho W.Y., Grein J., Townsend S.E., Davis M.M., and Goodnow C.C. 1995. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 376:181-184.

18. Andrews, B.S., R.A. Eisenberg, A.N. Theofilopoulos, S. Izui, C.B. Wilson, P.J. McConahey, E.D. Murphy, J.B. Roths, and F.J. Dixon. 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148:1198-1215.
19. Savill, J. and V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 407:784-788.
20. Pickering, M.C., M. Botto, P.R. Taylor, P.J. Lachmann, and M.J. Walport. 2000. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv. Immunol* 76:227-324.
21. Mayer M.M. 1970. Highlights of complement research during the past twenty-five years. *Immunochemistry* 7:485-496.
22. Mayer M.M. 1984. Complement. Historical perspectives and some current issues. *Complement* 1:2-26.
23. Fisher M.B., Ma M., Goerg S., Zhu F.G., Xia J., Finco O., Han S., Kelsoe G., Howard R.G., Rothstein T.L., Kremmer E., Rosen F.S., and Carroll M.C. 1996. Regulation of the B Cell Response to T-Dependent Antigens by Classical Pathway Complement. *Journal of Immunology* 157:549-556.
24. Ahearn, J.M. and D.T. Fearon. 1989. Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv. Immunol.* 46:183-219.:183-219.
25. Mold, C., R. Baca, and T.W. Du Clos. 2002. Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fc gamma receptors. *J. Autoimmun.* 19:147-154.
26. Kravitz, M.S., M. Pitashny, and Y. Shoenfeld. 2005. Protective molecules--C-reactive protein (CRP), serum amyloid P (SAP), pentraxin3 (PTX3), mannose-

- binding lectin (MBL), and apolipoprotein A1 (Apo A1), and their autoantibodies: prevalence and clinical significance in autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* 25:582-591.
27. Korb,L.C. and J.M.Ahearn. 1997. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* 158:4525-4528.
28. Ogden C.A., deCathelineau A., Hoffmann P.R., Bratton D., Ghebrehiwet B., Fadok V.A., and Henson P.M. 2001. C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and CD91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *Journal of Experimental Medicine* 194:781-795.
29. Janeway,C.A., Jr. and R.Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216. Epub; %2001 Oct 4.:197-216.
30. Medzhitov,R., P.Preston-Hurlburt, and C.A.Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388:394-397.
31. Lemaitre,B., E.Nicolas, L.Michaut, J.M.Reichhart, and J.A.Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell.* %20;86:973-983.
32. O`Neill L.A. 2004. After the Toll Rush. *Science* 303:1481-1482.
33. Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., and Golenbock D.T. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology* 5:190-198.

34. Akira, S. and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4:499-511.
35. Ito T., Amakawa R., and Fukuhara S. 2002. Roles of Toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Human immunology* 63:1120-1125.
36. Hertzog P.J., O'Neill L.A., and Hamilton J.A. 2003. The interferon in TLR signalling: more than just antiviral. *Trends in Immunology* 24:534-539.
37. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., and Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
38. Bauer S., Kirschning C.J., Häcker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., and Lipford G.B. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9237-9242.
39. Christensen S.R., Kashgarian M., Alexopoulou L., Flavell R.A., Akira S., and Shlomchik M.J. 2005. Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *Journal of Experimental Medicine* 202:321-331.
40. Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., and Golenbock D.T. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology* 5:190-198.
41. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., and Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.

42. Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., and Golenbock D.T. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology* 5:190-198.
43. Mills J.A. 1994. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 330:1871-1879.
44. Tan, E.M., A.S.Cohen, J.F.Fries, A.T.Masi, D.J.McShane, N.F.Rothfield, J.G.Schaller, N.Talal, and R.J.Winchester. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:1271-1277.
45. Trendelenburg, M. and J.A.Schifferli. 2000. [Apoptosis and C1q: possible explanations for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus]. *Z. Rheumatol.* 59:172-175.
46. Illei, G.G., E.Tackey, L.Lapteva, and P.E.Lipsky. 2004. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: II. Markers of disease activity. *Arthritis Rheum.* 50:2048-2065.
47. Uramoto, K.M., C.J.Michet, Jr., J.Thumboo, J.Sunku, W.M.O'Fallon, and S.E.Gabriel. 1999. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 42:46-50.
48. Mills J.A. 1994. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 330:1871-1879.
49. Arnett F.C. and Reveille J.D. 1992. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 18:865-892.

50. Hartung K., Baur M.P., Coldewey R., Fricke M., Kalden J.R., Lakomek H.J., Peter H.H., Schendel H., Schneider P.M., and Seuchter S.A. 1992. Major Histocompatibility Complex Haplotypes and Complement C4 Alleles in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Clinical Investigation* 90:1346-1351.
51. Goerg,S. 2002. The association between systemic lupus erythematosus and deficiencies of the complement system. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)*. 48:237-245.
52. Golan,T.D., S.Dan, H.Haim, G.Varda, and K.Sol. 1994. Solar ultraviolet radiation induces enhanced accumulation of oxygen radicals in murine SLE-derived splenocytes in vitro. *Lupus*. 3:103-106.
53. Zandman-Goddard G. and Shoenfeld Y. 2003. SLE and Infections. *Clinical reviews in allergy & immunology* 25:29-40.
54. Atkinson J.P. 1989. Complement deficiency: predidposing factor to autoimmune syndromes. *Clinical and experimental rheumatology* 7:95-101.
55. Prodeus A.P., Goerg S., Shen L.M., Pozdnyakova O.O., Chu L., Alicot M, Goodnow C.C., and Carroll M.C. 1998. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity* 9:721-731.
56. Pickering,M.C. and M.J.Walport. 2000. Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 39:133-141.
57. Stone,N.M., A.Williams, J.D.Wilkinson, and G.Bird. 2000. Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency. *Br. J. Dermatol.* 142:521-524.
58. Dragon-Durey,M.A., P.Quartier, V.Fremeaux-Bacchi, J.Blouin, B.C.de, A.M.Prieur, L.Weiss, and W.H.Fridman. 2001. Molecular basis of a selective

- C1s deficiency associated with early onset multiple autoimmune diseases. *J. Immunol.* 166:7612-7616.
59. Pickering, M.C. and M.J. Walport. 2000. Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 39:133-141.
60. Rupert K.L., Moulds J.M., Yang Y., Arnett F.C., Warren R.W., Reveille J.D., Myones B.L., Blanchong C.A., and Yu C.Y. 2002. The Molecular Basis of Complete C4A and C4B Deficiencies in a Systemic Lupus Erythematosus Patient with Homozygous C4A and C4B Mutant Genes. *Journal of Immunology* 169:1570-1578.
61. Einav S., Podznyakova O.O., Ma M., and Carrol M.C. 2002. Complement C4 Is Protective for Lupus Disease Independent of C3. *Journal of Immunology* 168:1036-1041.
62. Manderson A.P., Botto M., and Walport M.J. 2004. The role of complement in the development of Systemic Lupus Erythematosus. *Annual review of immunology* 22:431-456.
63. Pickering, M.C. and M.J. Walport. 2000. Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 39:133-141.
64. Schur, P.H. 1986. Inherited complement component abnormalities. *Annu. Rev. Med.* 37:333-46.:333-346.
65. Schur P.H. 1995. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 4:425-437.

66. Goerg,S. 2002. The association between systemic lupus erythematosus and deficiencies of the complement system. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)*. 48:237-245.
67. Pickering,M.C. and M.J.Walport. 2000. Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 39:133-141.
68. Mitchell D.A., Pickering M.C., Warren J., Fossati-Jimack L., Cortes-Hernandez J., Cook H.T., Botto M., and Walport M.J. 2002. C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *Journal of Immunology* 168:2538-2543.
69. Prodeus A.P., Goerg S., Shen L.M., Pozdnyakova O.O., Chu L., Alicot M, Goodnow C.C., and Carroll M.C. 1998. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity* 9:721-731.
70. Chen Z., Koralov S.B., and Kelsoe G. 2000. Complement C4 Inhibits Systemic Autoimmunity through a Mechanism Independent of Complement Receptors CR1 and CR2. *Journal of Experimental Medicine* 192:1339-1352.
71. Botto,M., C.Dell'Agnola, A.E.Bygrave, E.M.Thompson, H.T.Cook, F.Petry, M.Loos, P.P.Pandolfi, and M.J.Walport. 1998. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19:56-59.
72. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V.A., Cook H.T., Andrews M., Carrol M.C., Henson P.M., Botto M., and Walport M.J. 2000. A Hierarchical Role for Classical Pathway Complement Proteins in the Clearance of Apoptotic Cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 192:359-366.

73. Calvani M., Caricchio R., Tucci M., Sobel E.S., Silvestris F., Tartaglia P., and Richards H.B. 2005. Induction of Apoptosis by the Hydrocarbon Oil Pristane: Implications for Pristane- Induced Lupus. *Journal of Immunology* 175:4777-4782.
74. Satoh M. and Reeves W.H. 1994. Induction of Lupus-associated Autoantibodies in BALB/c Mice by Intraperitoneal Injection of Pristane. *Journal of Experimental Medicine* 180:2341-2346.
75. Rosen A., Casciola-Rosen L.A., and Ahearn J. 1995. Novel Packages of Viral and Self-antigens are generated during Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 181:1557-1561.
76. Casciola-Rosen L.A., Anhalt G., and Rosen A. 1994. Autoantigens Targeted in Systemic Lupus Erythematosus Are Clustered in Two Populations of Surface Structures on Apoptotic Keratinocytes. *Journal of Experimental Medicine* 179:1317-1330.
77. Goerg,S. 2002. The association between systemic lupus erythematosus and deficiencies of the complement system. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)*. 48:237-245.
78. Ivashkiv L.B. 2003. Type I Interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: potential role in SLE pathogenesis. *Autoimmunity* 36:473-479.
79. Havell E.A. and Spitalny G.N. 1983. Endotoxin-induced interferon synthesis in macrophage cultures. *Journal of the Reticuloendothelial Society* 33:369-380.

80. Korngold R., Blank K.J., and Murasko D.M. 1983. Effect of Interferon on thoracic ductlymphocyte output: induction with either poly I: poly C or vaccinia virus. *Journal of Immunology* 130:2236-2240.
81. Sun S., Zhang X., Tough D.F., and Sprent J. 1998. Type I Interferon-mediated stimulation of T Cells by CpG DNA. *Journal of Experimental Medicine* 188:2335-2342.
82. Le Bon A., Schiavoni G., D'Agostino G., Gresser I., Belardelli F., and Tough D.F. 2001. Type I Interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14:461-470.
83. Litinsky M.B., Nardelli B., Hilbert D.M., He B., Schaffer A., Casali P., and Cerutti A. 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through Blys and APRIL. *Nature Immunology* 3:822-829.
84. Ruuth K., Carlsson L., Hallberg B., and Lundgren E. 2001. Interferon- promotes survival of human primary B-lymphocytes via phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 284:583-586.
85. Braun D., Caramalho I., and Demengeot J. 2002. IFN- γ enhances BCR-dependent B cell responses. *International Immunology* 14:411-419.
86. Cederblad B., Blomberg S., Vallin H., Perers A., Alm G.V., and Rönnblom L. 1998. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon--producing cells. *Journal of Autoimmunity* 11:465-470.
87. Cederblad B., Blomberg S., Vallin H., Perers A., Alm G.V., and Rönnblom L. 1998. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of

- circulating natural interferon--producing cells. *Journal of Autoimmunity* 11:465-470.
88. Blomberg S., Eloranta M.L., Cederblad B., Nordlin K., Alm G.V., and Rönnblom L. 2001. Presence of cutaneous interferon- producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:484-490.
89. Siegal, F.P., N.Kadowaki, M.Shodell, P.A.Fitzgerald-Bocarsly, K.Shah, S.Ho, S.Antonenko, and Y.J.Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 284:1835-1837.
90. Eloranta M.L. and Alm G.V. 1999. Splenic Marginal Metallophilic Macrophages and Marginal Zone Macrophages are the Major Interferon-/ Producers in Mice upon Intravenous Challenge with Herpes Simplex Virus. *Scandinavian Journal of Immunology* 49:391-394.
91. Hooks J.J., Moutsopoulos H.M., Geis S.A., Stahl N.I., Decker J.L., and Notkins A.L. 1979. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *The New England journal of medicine* 301:5-8.
92. Ytterberg S.R. and Schnitzer T.J. 1982. Serum Interferon Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 25:401-406.
93. Preble O.T., Black R.J., Friedman R.M., Klippel J.H., and Vilcek J. 1982. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leucocyte interferon. *Science* 216:429-431.
94. Strannegard O, Hermodsson S., and Westberg G. 1982. Interferon and natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* 50:246-252.

95. Bengtsson A.A., Sturfelt G., Truedsson L., Blomberg J., Alm G., Vallin H., and Rönnblom L. 2000. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* 9:664-671.
96. von Wussow P., Jakschies D., Hochkeppel H., Horisberger M., Hartung K., and Deicher H. 1989. MX homologous protein in mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 32:914-918.
97. Crow M.K., Kirou K.A., and Wohlgemuth J. 2003. Microarray Analysis of Interferon-regulated Genes in SLE. *Autoimmunity* 36:481-490.
98. Han G.M., Chen S.L., Shen N., Ye S., Bao C.D., and Gu Y.Y. 2003. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes and immunity* 4:177-186.
99. Schilling P.J., Kurzrock R., Kantarjian H., Gutterman J.U., and Talpaz M. 1991. Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukaemia. *Cancer* 68:1536-1537.
100. Rönnblom L.E., Alm G.V., and Oberg K.E. 1990. Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon- treatment in a patient with a malignant carcinoid tumor. *Journal of internal medicine* 227:207-210.
101. Kälkner K.M., Rönnblom L., Karlsson Parra A.K., Bengtsson M., Olsson Y., and Oberg K. 1998. Antibodies against double-stranded DNA and development of polymyositis during treatment with interferon. *QJM* 91:393-399.
102. Ioannou Y. and Isenberg D.A. 2000. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis and Rheumatism* 43:1431-1442.

103. Raanani P. and Ben-Bassat I. 2002. Immune-mediated complications during interferon-therapy in haematological patients. *Acta of Haematology* 107:133-144.
104. Rönblom L., Alm G.V., and Oberg K.E. 1991. Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Annals of internal medicine* 115:178-183.
105. Chehadeh W., Weill J., Vantghem M.C., Alm G., Lefebvre J., Wattré P., and Hober D. 2000. Increased level of interferon- in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *The Journal of infectious diseases* 181:1929-1939.
106. Huang X., Yuang J., Goddard A., Foulis A., James R.F., Lernmark A., Pujol-Burrell R., Rabinovitch A., Somoza N., and Stewart T.A. 1995. Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44:658-664.
107. Yamamoto S., Kuramoto E., Shimada S., and Tokunaga T. 1988. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Japanese Journal of Cancer Research* 79:866-873.
108. Messina J.P., Gilkeson G.S., and Pisetsky D.S. 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *Journal of Immunology* 147:1759-1764.
109. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., and Klinman D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.

110. Gruenbaum Y., Stein R., Cedar H., and Razin A. 1981. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FESB letters* 124:67-71.
111. Bird A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.
112. Stacey K., Young G.R., Clark F., Sester D.P., Roberts T.L., Naik S., Sweet M.J., and Hume D.A. 2003. The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *Journal of Immunology* 170:3614-3620.
113. Gursel I., Gursel M., Yamada H., Ishii K.J., Takeshita F., and Klinman D.M. 2003. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *Journal of Immunology* 171:1393-1400.
114. Yung R.L., Quddus J., Chrisp C.E., Johnson K.M., and Richardson B.C. 1995. Mechanisms of drug-induced lupus. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo. *Journal of Immunology* 154:3025-3035.
115. Richardson B. 1986. Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. 5-Azacytidine induces self-reactivity in antigen-specific T4+ cells. *Human immunology* 17:456-470.
116. Barton G.M., Kaqan J.C., and Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature Immunology* 7:49-56.
117. Napirei M., Karsunky H., Zevnik B., Stephan H., Mannherz HG., and Möröy T. 2000. Features of systemic lupus erythematosus in DNaseI-deficient mice. *Nature Genetics* 25:177-181.

118. Yasutomo K., Horiuchi T., Kagami S., Tsukamoto H., Hashimura C., Urushihara M., and Kuroda Y. 2001. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics* 28:313-314.
119. Leadbetter E., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., and Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
120. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.
121. Means T.K., Latz E., Hayashi F., Murali M.R., Golenbock D.T., and Luster A.D. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *Journal of Clinical Investigation* 115:407-417.
122. Häcker H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G.B., and Wagner H. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *The EMBO Journal* 17:6230-6240.
123. Rutz, M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., and Bauer S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology* 34:2541-2550.
124. Zachrau B., Finke D., Kropf K., Gosink H.J., Kirchner H., and Goerg S. 2004. Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4-deficient mice. *International Immunology* 16:1685-1690.

125. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
126. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
127. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.
128. Leadbetter E., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., and Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
129. Means T.K. and Luster A.D. 2005. Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1062:242-251.
130. Botto, M., C. Dell'Agnola, A.E. Bygrave, E.M. Thompson, H.T. Cook, F. Petry, M. Loos, P.P. Pandolfi, and M.J. Walport. 1998. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19:56-59.

131. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V.A., Cook H.T., Andrews M., Carrol M.C., Henson P.M., Botto M., and Walport M.J. 2000. A Hierarchical Role for Classical Pathway Complement Proteins in the Clearance of Apoptotic Cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 192:359-366.
132. Rönnblom L., Alm G.V., and Oberg K.E. 1991. Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Annals of internal medicine* 115:178-183.
133. Wagner,H. and S.Bauer. 2006. All is not Toll: new pathways in DNA recognition. *J. Exp. Med.* %20;203:265-268.
134. Vallin H., Blomberg S., Alm G.V., Cederblad B., and Rönnblom L. 1999. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* 115:196-202.
135. Zachrau B., Finke D., Kropf K., Gosink H.J., Kirchner H., and Goerg S. 2004. Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4-deficient mice. *International Immunology* 16:1685-1690.
136. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
137. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in

- complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
138. Steinman,C.R. 1975. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J. Clin. Invest.* 56:512-515.
139. Bruneau,C. and J.Benveniste. 1979. Circulating DNA:anti-DNA complexes in systemic lupus erythematosus. Detection and characterization by ultracentrifugation. *J. Clin. Invest.* 64:191-198.
140. Coubrey-Hoyer,A., T.B.Okarma, and H.R.Holman. 1984. Partial purification and characterization of plasma DNA and its relation to disease activity in systemic lupus erythematosus. *Am. J. Med.* 77:23-34.
141. Mevorach,D., J.O.Mascarenhas, D.Gershov, and K.B.Elkon. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J. Exp. Med.* 188:2313-2320.
142. Atkinson J.P. 1989. Complement deficiency: predidposing factor to autoimmune syndromes. *Clinical and experimental rheumatology* 7:95-101.
143. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V.A., Cook H.T., Andrews M., Carrol M.C., Henson P.M., Botto M., and Walport M.J. 2000. A Hierarchical Role for Classical Pathway Complement Proteins in the Clearance of Apoptotic Cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 192:359-366.
144. Gullstrand,B., U.Martensson, G.Sturfelt, A.A.Bengtsson, and L.Truedsson. 2009. Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 156:303-311.
145. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V.A., Cook H.T., Andrews M., Carrol M.C., Henson P.M., Botto M., and Walport M.J. 2000. A Hierarchical Role for

- Classical Pathway Complement Proteins in the Clearance of Apoptotic Cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 192:359-366.
146. Potter P.K., Cortes-Hernandez J., Quartier P., Botto M., and Walport M.J. 2003. Lupus-Prone Mice Have an Abnormal Response to Thioglycolate and an Impaired Clearance of Apoptotic Cells. *Journal of Immunology* 170:3223-3232.
147. Botto, M., C. Dell'Agnola, A.E. Bygrave, E.M. Thompson, H.T. Cook, F. Petry, M. Loos, P.P. Pandolfi, and M.J. Walport. 1998. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19:56-59.
148. Herrmann M., Voll R.E., Zoller O.M., Hagenhofer M., Ponner B.B., and Kalden J.R. 1998. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 41:1241-1250.
149. Mevorach, D., J.O. Mascarenhas, D. Gershov, and K.B. Elkon. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J. Exp. Med.* 188:2313-2320.
150. Steinman, C.R. 1975. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J. Clin. Invest.* 56:512-515.
151. Bret, L., J. Lule, C. Alary, S. Ppolinaire-Pilipenko, J.P. Pourrat, and G.J. Fournie. 1990. Quantitation of blood plasma DNA as an index of in vivo cytotoxicity. *Toxicology.* 61:283-292.
152. Rumore P.M. and Steinman C.R. 1990. Endogenous Circulating DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *Journal of Clinical Investigation* 86:69-74.

153. Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Longhurst C., and Kalsi J.K. 1994. The Origin, Sequence, Structure, and Consequences of Developing Anti-DNA Antibodies. *Arthritis and Rheumatism* 37:169-180.
154. Casciola-Rosen L.A., Anhalt G., and Rosen A. 1994. Autoantigens Targeted in Systemic Lupus Erythematosus Are Clustered in Two Populations of Surface Structures on Apoptotic Keratinocytes. *Journal of Experimental Medicine* 179:1317-1330.
155. Rosen A., Casciola-Rosen L.A., and Ahearn J. 1995. Novel Packages of Viral and Self-antigens are generated during Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 181:1557-1561.
156. Youd, M.E., A.R. Ferguson, and R.B. Corley. 2002. Synergistic roles of IgM and complement in antigen trapping and follicular localization. *Eur. J. Immunol.* 32:2328-2337.
157. Zachrau B., Finke D., Kropf K., Gosink H.J., Kirchner H., and Goerg S. 2004. Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4-deficient mice. *International Immunology* 16:1685-1690.
158. Zachrau B., Finke D., Kropf K., Gosink H.J., Kirchner H., and Goerg S. 2004. Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4-deficient mice. *International Immunology* 16:1685-1690.
159. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in

- complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
160. Eloranta M.L. and Alm G.V. 1999. Splenic Marginal Metallophilic Macrophages and Marginal Zone Macrophages are the Major Interferon- γ Producers in Mice upon Intravenous Challenge with Herpes Simplex Virus. *Scandinavian Journal of Immunology* 49:391-394.
161. Li, Y., H. Li, and M. Weigert. 2002. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* 195:181-188.
162. MacLennan, I.C., K.M. Toellner, A.F. Cunningham, K. Serre, D.M. Sze, E. Zuniga, M.C. Cook, and C.G. Vinuesa. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194:8-18:8-18.
163. William, J., C. Euler, S. Christensen, and M.J. Shlomchik. 2002. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science*. %20;297:2066-2070.
164. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN- α in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
165. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN- α in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.

166. Ivashkiv L.B. 2003. Type I Interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: potential role in SLE pathogenesis. *Autoimmunity* 36:473-479.
167. Linker-Israeli M., Deans R.J., Wallace D.J., Prehn J., Ozeri-Chen T., and Klinenberg J.R. 1991. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology* 147:117-123.
168. Finck B.K., Chan B., and Wofsy D. 1994. Interleukin 6 Promotes Murine Lupus in NZB/NZW F1 Mice. *Journal of Clinical Investigation* 94:585-591.
169. Yasuda, K., C. Richez, J.W. Maciaszek, N. Agrawal, S. Akira, A. Marshak-Rothstein, and I.R. Rifkin. 2007. Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production. *J. Immunol.* 178:6876-6885.
170. Jego, G., A.K. Palucka, J.P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, and J. Banchereau. 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 19:225-234.
171. Dubois, B., C. Massacrier, B. Vanbervliet, J. Fayette, F. Briere, J. Banchereau, and C. Caux. 1998. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J. Immunol.* 161:2223-2231.
172. Sato, Y., M. Miyata, Y. Sato, T. Nishimaki, H. Kochi, and R. Kasukawa. 1999. CpG motif-containing DNA fragments from sera of patients with systemic lupus erythematosus proliferate mononuclear cells in vitro. *J. Rheumatol.* 26:294-301.

Referenzen

173. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., and Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
174. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.
175. Morelli A.E., Larregina A.T., Shufesky W.J., Zahorchak A.F., Logar A.J., Papworth G.D., Wang Z., Watkins S.C., Falo L.D.Jr, and Thomson A.W. 2003. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependance on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101:611-620.
176. Tokano, Y., S. Morimoto, H. Kaneko, H. Amano, K. Nozawa, Y. Takasaki, and H. Hashimoto. 1999. Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 116:169-173.
177. Tokano, Y., S. Morimoto, H. Kaneko, H. Amano, K. Nozawa, Y. Takasaki, and H. Hashimoto. 1999. Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 116:169-173.
178. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.

179. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.
180. Sutterwala, F.S., G.J.Noel, R.Clynes, and D.M.Mosser. 1997. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J. Exp. Med.* 185:1977-1985.
181. Shibuya, A., N.Sakamoto, Y.Shimizu, K.Shibuya, M.Osawa, T.Hiroyama, H.J.Eyre, G.R.Sutherland, Y.Endo, T.Fujita, T.Miyabayashi, S.Sakano, T.Tsuji, E.Nakayama, J.H.Phillips, L.L.Lanier, and H.Nakauchi. 2000. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat. Immunol.* 1:441-446.
182. Rifkin, I.R., E.A.Leadbetter, L.Busconi, G.Viglianti, and A.Marshak-Rothstein. 2005. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 204:27-42.:27-42.
183. Tokano, Y., S.Morimoto, H.Kaneko, H.Amano, K.Nozawa, Y.Takasaki, and H.Hashimoto. 1999. Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 116:169-173.
184. Dubois, B., C.Massacrier, B.Vanbervliet, J.Fayette, F.Briere, J.Banchereau, and C.Caux. 1998. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J. Immunol.* 161:2223-2231.
185. Kawai Taro, Shintaro Sato, Ishii Ken J, Coban Cevayir, Hemmi Hiroaki, Yamamoto Masahiro, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki, Inoue Jun-ichiro, Uematsu Satoshi, Takeuchi Osamu, and Akira Shizuo. 2004. Interferon- α

- induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nature Immunology* 5:1061-1068.
186. Marié, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 17:6660-6669.
187. Sato, M., N. Hata, M. Asagiri, T. Nakaya, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 1998. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* 441:106-110.
188. Steinman, C.R. 1975. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J. Clin. Invest.* 56:512-515.
189. Napirei M., Karsunky H., Zevnik B., Stephan H., Mannherz HG., and Möroy T. 2000. Features of systemic lupus erythematosus in DNase1-deficient mice. *Nature Genetics* 25:177-181.
190. Bickerstaff, M.C., M. Botto, W.L. Hutchinson, J. Herbert, G.A. Tennent, A. Bybee, D.A. Mitchell, H.T. Cook, P.J. Butler, M.J. Walport, and M.B. Pepys. 1999. Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nat. Med.* 5:694-697.
191. Yasutomo K., Horiuchi T., Kagami S., Tsukamoto H., Hashimura C., Urushihara M., and Kuroda Y. 2001. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics* 28:313-314.
192. Rosen A., Casciola-Rosen L.A., and Ahearn J. 1995. Novel Packages of Viral and Self-antigens are generated during Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 181:1557-1561.

193. Herrmann M., Voll R.E., Zoller O.M., Hagenhofer M., Ponner B.B., and Kalden J.R. 1998. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 41:1241-1250.
194. Rumore P.M. and Steinman C.R. 1990. Endogenous Circulating DNA in Systemic Lupus Erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *Journal of Clinical Investigation* 86:69-74.
195. Korb,L.C. and J.M.Ahearn. 1997. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* 158:4525-4528.
196. Mevorach,D., J.O.Mascarenhas, D.Gershov, and K.B.Elkon. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J. Exp. Med.* 188:2313-2320.
197. Taylor P.R., Carugati A., Fadok V.A., Cook H.T., Andrews M., Carrol M.C., Henson P.M., Botto M., and Walport M.J. 2000. A Hierarchical Role for Classical Pathway Complement Proteins in the Clearance of Apoptotic Cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 192:359-366.
198. Messina J.P., Gilkeson G.S., and Pisetsky D.S. 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *Journal of Immunology* 147:1759-1764.
199. Stacey K., Young G.R., Clark F., Sester D.P., Roberts T.L., Naik S., Sweet M.J., and Hume D.A. 2003. The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *Journal of Immunology* 170:3614-3620.

Referenzen

200. Bird A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.
201. Chen Y., Lenert P.S., Weeratna R.D., McCluskie M.J., Wu T., Davis H.L., and Krieg A.M. 2001. Identification of methylated CpG motifs as inhibitors of the immune stimulatory CpG motifs. *Gene Therapy* 8:1024-1032.
202. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., and Klinman D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
203. Gruenbaum Y., Stein R., Cedar H., and Razin A. 1981. Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FESB letters* 124:67-71.
204. Bird A.P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213.
205. Rosen A., Casciola-Rosen L.A., and Ahearn J. 1995. Novel Packages of Viral and Self-antigens are generated during Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 181:1557-1561.
206. Richardson B., Scheinbart L., Strahler J., Gross L., Hanash S., and Johnson M. 1990. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 33:1665-1673.
207. Sano,H. and C.Morimoto. 1982. Dna isolated from DNA/anti-DNA antibody immune complexes in systemic lupus erythematosus is rich in guanine-cytosine content. *J. Immunol.* 128:1341-1345.
208. Yung R.L., Quddus J., Chrisp C.E., Johnson K.M., and Richardson B.C. 1995. Mechanisms of drug-induced lupus. Cloned Th2 cells modified with DNA

- methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo. *Journal of Immunology* 154:3025-3035.
209. Richardson B. 1986. Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. 5-Azacytidine induces self-reactivity in antigen-specific T4+ cells. *Human immunology* 17:456-470.
210. Huck,S., E.Deveaud, A.Namane, and M.Zouali. 1999. Abnormal DNA methylation and deoxycytosine-deoxyguanine content in nucleosomes from lymphocytes undergoing apoptosis. *FASEB J.* 13:1415-1422.
211. Leadbetter E., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., and Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
212. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.
213. Means T.K., Latz E., Hayashi F., Murali M.R., Golenbock D.T., and Luster A.D. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *Journal of Clinical Investigation* 115:407-417.
214. Mevorach,D., J.O.Mascarenhas, D.Gershov, and K.B.Elkon. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J. Exp. Med.* 188:2313-2320.
215. Chen Z., Koralov S.B., and Kelsoe G. 2000. Complement C4 Inhibits Systemic Autoimmunity through a Mechanism Independent of Complement Receptors CR1 and CR2. *Journal of Experimental Medicine* 192:1339-1352.

216. Carrol M.C., Paul E., Pozdnyakova O.O., Mitchell E., and Carrol M.C. 2002. Anti-DNA autoreactivity in C4-deficient mice. *European Journal of Immunology* 32:2672-2679.
217. Satoh M. and Reeves W.H. 1994. Induction of Lupus-associated Autoantibodies in BALB/c Mice by Intraperitoneal Injection of Pristane. *Journal of Experimental Medicine* 180:2341-2346.
218. Calvani M., Caricchio R., Tucci M., Sobel E.S., Silvestris F., Tartaglia P., and Richards H.B. 2005. Induction of Apoptosis by the Hydrocarbon Oil Pristane: Implications for Pristane- Induced Lupus. *Journal of Immunology* 175:4777-4782.
219. Calvani M., Caricchio R., Tucci M., Sobel E.S., Silvestris F., Tartaglia P., and Richards H.B. 2005. Induction of Apoptosis by the Hydrocarbon Oil Pristane: Implications for Pristane- Induced Lupus. *Journal of Immunology* 175:4777-4782.
220. Mevorach D., Zhou J.L., Song X., and Elkon K.B. 1998. Systemic Exposure to Irradiated Apoptotic Cells induces Autoantibody Production. *Journal of Experimental Medicine* 188:387-392.
221. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
222. Zeng,D., M.K.Lee, J.Tung, A.Brendolan, and S.Strober. 2000. Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *J. Immunol.* 164:5000-5004.

223. Grimaldi,C.M., D.J.Michael, and B.Diamond. 2001. Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *J. Immunol.* 167:1886-1890.
224. Li,Y., H.Li, and M.Weigert. 2002. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* 195:181-188.
225. Le Bon A., Schiavoni G., D'Agostino G., Gresser I., Belardelli F., and Tough D.F. 2001. Type I Interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14:461-470.
226. Rönnblom L.E., Alm G.V., and Oberg K.E. 1990. Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon- treatment in a patient with a malignant carcinoid tumor. *Journal of internal medicine* 227:207-210.
227. Schilling P.J., Kurzrock R., Kantarjian H., Gutterman J.U., and Talpaz M. 1991. Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukaemia. *Cancer* 68:1536-1537.
228. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
229. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.

Referenzen

230. Leadbetter E., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., and Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
231. Means T.K. and Luster A.D. 2005. Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1062:242-251.
232. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., and Klinman D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
233. Bauer S., Kirschning C.J., Häcker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H, and Lipford G.B. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9237-9242.
234. Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., and Klinman D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-549.
235. Vollmer J., Weeratna R.D., Jurk M., Samulowitz U., McCluskie M.J., Payette P., Davis H.L., Schetter C., and Krieg A.M. 2004. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 113:212-223.
236. Krug A., Rothenfusser S., Hornung V., Jahrsdörfer B., Blackwell S., Ballas Z.K., Endres S., Krieg A.M., and Hartmann G. 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology* 31:2154-2163.

237. Rutz, M., Metzger J., Gellert T., Lupp P., Lipford G.B., Wagner H., and Bauer S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology* 34:2541-2550.
238. Vollmer J., Weeratna R.D., Jurk M., Samulowitz U., McCluskie M.J., Payette P., Davis H.L., Schetter C., and Krieg A.M. 2004. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 113:212-223.
239. Zhu F.G., Reich C.F., and Pisetsky D.S. 2003. Effect of cytofectins on the immune response of murine macrophages to mammalian DNA. *Immunology* 109:255-262.
240. Yasuda, K., P. Yu, C.J. Kirschning, B. Schlatter, F. Schmitz, A. Heit, S. Bauer, H. Hochrein, and H. Wagner. 2005. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 174:6129-6136.
241. Barton G.M., Kagan J.C., and Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature Immunology* 7:49-56.
242. Häcker H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G.B., and Wagner H. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *The EMBO Journal* 17:6230-6240.
243. Rutz, M., Metzger J., Gellert T., Lupp P., Lipford G.B., Wagner H., and Bauer S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology* 34:2541-2550.

244. Cornелиe,S., J.Hoebeke, A.M.Schacht, B.Bertin, J.Vicogne, M.Capron, and G.Riveau. 2004. Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J. Biol. Chem.* 279:15124-15129.
245. Barton G.M., Kaqan J.C., and Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature Immunology* 7:49-56.
246. Barton G.M., Kaqan J.C., and Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature Immunology* 7:49-56.
247. Vallin H., Perers A., Alm G.V., and Rönnblom L. 1999. Anti-Double-Stranded DNA Antibodies and Immunostimulatory Plasmid DNA in Combination Mimic the Endogenous IFN- Inducer in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Immunology* 163:6306-6313.
248. Bave,U., H.Vallin, G.V.Alm, and L.Ronnlom. 2001. Activation of natural interferon-alpha producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines. *J. Autoimmun.* 17:71-80.
249. Leadbetter E., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., and Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
250. Davies,K.A., M.G.Robson, A.M.Peters, P.Norsworthy, J.T.Nash, and M.J.Walport. 2002. Defective Fc-dependent processing of immune complexes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46:1028-1038.

251. Sullivan, K.E., A.F. Jawad, L.M. Piliero, N. Kim, X. Luan, D. Goldman, and M. Petri. 2003. Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 42:446-452.
252. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.
253. Means T.K., Latz E., Hayashi F., Murali M.R., Golenbock D.T., and Luster A.D. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *Journal of Clinical Investigation* 115:407-417.
254. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.
255. Yasuda, K., P. Yu, C.J. Kirschning, B. Schlatter, F. Schmitz, A. Heit, S. Bauer, H. Hochrein, and H. Wagner. 2005. Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.* 174:6129-6136.
256. Zhu, F.G., C.F. Reich, and D.S. Pisetsky. 2003. Effect of cytofectins on the immune response of murine macrophages to mammalian DNA. *Immunology* 109:255-262.
257. Häcker H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G.B., and Wagner H. 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *The EMBO Journal* 17:6230-6240.

258. Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., and Golenbock D.T. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology* 5:190-198.
259. Finke D., Randers K., Hoerster R., Hennig H., Zawatzky R., Marion T., Brockmann C., Klempt-Giessing K., Jacobsen K., Kirchner H., and Goerg S. 2007. Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology* 37:1702-1709.
260. Shibuya, A., N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroshima, H. J. Eyre, G. R. Sutherland, Y. Endo, T. Fujita, T. Miyabayashi, S. Sakano, T. Tsuji, E. Nakayama, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and H. Nakauchi. 2000. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat. Immunol.* 1:441-446.
261. Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, V. C. van't, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998-6004.
262. O'Mahony, D. S., U. Pham, R. Iyer, T. R. Hawn, and W. C. Liles. 2008. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int. J. Med. Sci.* 5:1-8.
263. Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., and Golenbock D.T. 2004. TLR9 signals

- after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology* 5:190-198.
264. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., and Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
265. Muzio, M., D.Bosisio, N.Polentarutti, G.D'amico, A.Stoppacciaro, R.Mancinelli, V.C.van't, G.Penton-Rol, L.P.Ruco, P.Allavena, and A.Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998-6004.
266. Komatsuda, A., H.Wakui, K.Iwamoto, M.Ozawa, M.Togashi, R.Masai, N.Maki, T.Hatakeyama, and K.Sawada. 2008. Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 152:482-487.
267. Nakano, S., S.Morimoto, J.Suzuki, K.Noizawa, H.Amano, Y.Tokano, and Y.Takasaki. 2008. Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 47:145-149.
268. Sato, S., O.Takeuchi, T.Fujita, H.Tomizawa, K.Takeda, and S.Akira. 2002. A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int. Immunol.* 14:783-791.
269. Christensen S.R., Kashgarian M., Alexopoulou L., Flavell R.A., Akira S., and Shlomchik M.J. 2005. Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *Journal of Experimental Medicine* 202:321-331.

270. O'Mahony,D.S., U.Pham, R.Iyer, T.R.Hawn, and W.C.Liles. 2008. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int. J. Med. Sci.* 5:1-8.
271. Marié,I., J.E.Durbin, and D.E.Levy. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 17:6660-6669.
272. Rutz,M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., and Bauer S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology* 34:2541-2550.
273. Macfarlane,D.E. and L.Manzel. 1998. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J. Immunol.* 160:1122-1131.
274. Macfarlane,D.E. and L.Manzel. 1998. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J. Immunol.* 160:1122-1131.
275. Lau C.M., Broughton C., Tabor A.S., Akira S., Flavell R.A., Mamula M.J., Christensen S.R., Shlomchik M.J., Viglianti G.A., Rifkin I.R., and Marshak-Rothstein A. 2005. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/ Toll-like-receptor 7 engagement. *Journal of Experimental Medicine* 202:1171-1177.
276. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S., Marshak-Rothstein A., and Rifkin I.R. 2004. Toll-like receptor 9-Dependent- and -Independent Dendritic Cell Activation by Chromatin-Immunglobulin G Complexes. *Journal of Experimental Medicine* 199:1631-1640.

Referenzen

277. Leadbetter E., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., and Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416:603-607.
278. Macfarlane, D.E. and L. Manzel. 1998. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J. Immunol.* 160:1122-1131.
279. Rutz, M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., and Bauer S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology* 34:2541-2550.
280. Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, V.C. van't, G. Penton-Rol, L.P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998-6004.

III Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen:

Finke D, Randers K, Hoerster R, Hennig H, Zawatzky R, Marion T, Brockmann C, Klempt-Giessing K, Jacobsen K, Kirchner H, Goerg S.

Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN- α in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus.

Eur J Immunol 2007; 37 1702-1709.

Faust KB, Finke D, Klempt-Giessing K, Randers K, Zachrau B, Schlenke P Kirchner H, Goerg S.

Antigen-induced B cell apoptosis is independent of complement C4.

Clin Exp Immunol 2007; 150(1): 132-9.

Randers K, Pursche T, Finke D, Jacobsen K, Hoerster R, Brockmann C, Hennig H, Heit A, Goerg S.

Induction of lupus specific autoantibodies by injection of apoptotic DNA is dependent on IFN- α and TLR9 via a positive feedback mechanism. In Vorbereitung.

Hoerster R, Brockmann C, Finke D, Randers K, Marienfeld K, Jacobsen K, Marion T, Zawatzky R, Kirchner H, Goerg S.

CD11b positive cells marginale zone macrophages are the IFN- α producing cells involved in the induction of systemic lupus erythematosus in C4 deficient mice. In Vorbereitung.

Kongressbeiträge:

2004:

Finke D, Hoerster R, Brockmann C, Kropf K, Randers K, Hennig H, Zawatzky R, Goerg S. Interferon alpha mRNA in splenic CD11b positive marginal zone macrophages of C4 deficient mice. International Congress for SLE and related Conditions. *New York/USA.*

Finke D, Hoerster R, Brockmann C, Kropf K, Randers K, Hennig H, Zawatzky R, Goerg S. Interferon alpha mRNA in splenic CD11b positive marginal zone macrophages of C4 deficient mice. *Meeting of the scandinavian society of Immunology. Aarhus/Dänemark.*

Hoerster R, Brockmann C, Kropf K, Marienfeld K, Randers K, Finke D, Goerg S. Characterisation of mononuclear cells which produce Interferon alpha (IFN- α) spontaneously in the spleen of complement C4 deficient (C4-/-) mice. 35. *Joint Annual Meeting of the Dutch and German Society of Immunology. Maastricht/Niederlande.*

Finke D, Randers K, Kropf K, Brockmann C, Hoerster R, Hennig H, Marion T, Zawatzky R, Goerg S. The development of Systemic Lupus Erythematosus is accompanied by interferon alpha production in CD11b positive cells. 35. *Joint Annual Meeting of the Dutch and German Society of Immunology. Maastricht/Niederlande.*

Finke D, Randers K, Brockmann C, Hoerster R, Hennig H, Marion T, Zawatzky R, Goerg S. The development of autoantibodies typical for Systemic Lupus Erythematosus is accompanied by Interferon alpha production in CD11b positive cells. 27. *Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen, Borstel.*

2006:

Randers K, Finke D, Hoerster R, Jacobsen K, Brockmann C, Hennig H, Zawatzky R, Marion T, Goerg S.

Elevated levels of endogenous apoptotic DNA are responsible for Interferon-alpha production within the splenic marginal zone in C4-deficient mice: A prerequisite for induction of Systemic Lupus Erythematosus. 1st *Joint Meeting of European National Societies, 16th European Congress of Immunology, Paris.* **2007:**

Randers K, Pursche T, Finke D, Jacobsen K, Hoerster R, Brockmann C, Hennig H, Marion T, Goerg S.

Apoptotic DNA is able to induce in vivo IFN-alpha production within the splenic marginal zone via a TLR dependent pathway. 37th *Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg.*

2008:

Randers K, Pursche T, Finke D, Jacobsen K, Hoerster R, Brockmann C, Hennig H, Zawatzky R, Marion T, Goerg S.

Apoptotic DNA is able to induce in vivo Interferon-alpha production within the splenic marginal zone via a TLR dependent pathway. Thus elevated levels of endogenous apoptotic DNA in C4-deficient mice may be a prerequisite for induction of Systemic Lupus Erythematosus. *7th European Lupus Meeting, Amsterdam.*

Randers K, Pursche T, Finke D, Jacobsen K, Hoerster R, Brockmann C, Hennig H, Zawatzky R, Marion T, Goerg S.

Apoptotic DNA is able to induce in vivo Interferon-alpha production within the splenic marginal zone via TLR9. Thus elevated levels of endogenous apoptotic DNA in C4-deficient mice may be a prerequisite for induction of Systemic Lupus Erythematosus. *Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien.*

IV Danksagung

Ich danke allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich,

meinem Doktorvater PD Dr. med. S. Görg für die Überlassung des Themas, die Ideen, den Rückhalt und die Geduld, sowie für die Nutzung der Forschungsräumlichkeiten in seinem Institut.

meiner Arbeitsgruppe, bestehend aus Kirsten Jacobsen, Telja Pursche, Jaafar Al-Hasani und Dr. med. Christian Brockmann für die gute Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch.

Kirsten Jacobsen, MTA, für die gute Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung der Ergebnisse, sowie für die psychologische Unterstützung bei deren öffentlicher Präsentation.

Telja Pursche, Medizindoktorandin, für die gute Zusammenarbeit an diesem Projekt und für einige Ergebnisse, die ohne ihre Mithilfe nicht zustande gekommen wären.

Dr. rer. nat. Doreen Finke, ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe und jetzt im Institut für Medizinische Wissenschaften in Uppsala, Schweden, für die umfangreichen Vorarbeiten zu diesem Thema, sowie für die gute Zusammenarbeit bei der Anfertigung einiger Ergebnisse.

Jaafar Al-Hasani, Bachelor of molecular life sciences, für die Beratung und Unterstützung bezüglich der Statistik und für die geduldige Hilfe bei Computertechnischen Fragestellungen.

Dr. rer. nat. Antje Heit, Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene in München unter der Leitung von Herrn Prof. Herrmann Wagner, für die schnelle und unkomplizierte Überlassung von TLR9-/- Mäusen.

meiner Familie, deren Fürsorge und Unterstützung mir immer ein starker Rückhalt war, auch in schwierigeren Zeiten. Ihr gilt ein besonderer Dank.