

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Leitung: PD. Dr. med. Siegfried Görg

# **Expressionsverhalten des TLR 9 in einem Modell des frühen Systemischen Lupus Erythematoses**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von  
**Telja Pursche**  
aus Lübeck

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Siegfried Görg

2. Berichterstatter: PD Dr. med. S. Kregel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.03.2012

Gez. Der Dekan der medizinischen Fakultät

---

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	
<b>II</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>III</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>IV</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1	Das Immunsystem .....	10
1.1.1	Toleranzentwicklung der B-Lymphozyten .....	11
1.1.2	Apoptose.....	13
1.2	Das Komplementsystem .....	14
1.2.1	Komplement und Toleranzinduktion .....	16
1.3	Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) .....	17
1.3.1	Komplement und SLE .....	19
1.3.2	Interferon alpha (IFN $\alpha$ ) und SLE .....	20
1.4	Toll-like Rezeptoren .....	22
1.4.1	TLR3: Ligand für dsRNA .....	24
1.4.2	TLR9: Ligand für CpG-Motive.....	24
1.4.3	TLR9 und IFN $\alpha$ .....	25
1.4.4	Toll-like Rezeptoren und SLE .....	26
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>29</b>
3.1	Mäuse .....	29
3.2	Geräte.....	29
3.3	Zellkulturmedien und –zusätze .....	29
3.4	Chemikalien und Reagenzien .....	30
3.5	Antikörper .....	30
3.6	Primer und Sonden .....	31
3.7	Lösungen und Kits (gebrauchsfertig) .....	31
3.8	Zelllinien.....	32
<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>33</b>
4.1	Immunhistochemie.....	33
4.1.1	Beschichtung der Objektträger .....	33

4.1.2	Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern.....	33
4.1.3	Färbungen.....	33
4.2	Nachweis von apoptotischer DNA.....	36
4.2.1	Nachweis in WEHI 231-Zellkultur: TUNEL Durchflusszytometrie.....	36
4.2.2	Nachweis im Serum: Gel-Elektrophorese.....	37
4.3	Applikation von DNA.....	37
4.4	Isolierung mononukleärer Zellen aus der Milz .....	38
4.5	Separation mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Isolierung.....	38
4.6	Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen .....	38
4.7	Reinheitsmessung am Durchflusszytometer .....	39
4.8	RNA-Isolierung aus Zellen .....	40
4.9	DNA-Verdau .....	40
4.10	Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration mit dem Photometer .....	41
4.11	Real-Time RT PCR.....	41
4.12	Relative Quantifizierung der RT-PCR .....	44
4.12.1	Vergleichende CT-Methode ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode).....	44
4.13	Statistik .....	44
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
5.1	Nachweis von TLR9- und TLR3-mRNA in CD11b- und CD11c- positiven Zellen der murinen Milz nach Behandlung mit apoptotischer DNA .....	45
5.1.1	Kontrolle der Apoptose-Rate von PBS-induzierter Apoptose bei WEHI- 231 Zellen im Durchflussfluoreszenz-zytometer .....	45
5.1.2	Elektrophoretische Darstellung der DNA-Fragmente von WEHI 231- Zellen durch Apoptose oder Ultraschall (US).....	46
5.1.3	Reinheitsprüfung mittels Durchflusszytometer.....	47
5.1.4	Apoptotische DNA triggert die TLR9 mRNA-Expression in MZ- Makrophagen der Milz .....	48
5.2	Chloroquin hemmt sowohl die durch apoptotische DNA induzierte IFN $\alpha$ - als auch die gesteigerte TLR9-mRNA-Expression.....	52
5.3	Expression von TLR3 und TLR9 mRNA in MZ-Zellen der murinen Milz unbehandelter Mäuse .....	56
5.3.1	Immunhistochemischer Nachweis des C4-/-IFN $\gamma$ -/- Genotyps.....	57

5.3.2	C4 <sup>-/-</sup> Mäuse haben erhöhte Level von TLR9 vor jeglichen Anzeichen von Autoimmunität.....	58
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
6.1	Apoptotische DNA induziert in wt-Mäusen die IFN $\alpha$ -Produktion über einen TLR9 abhängigen Signalweg. ....	63
6.2	Chloroquin hemmt die IFN $\alpha$ -Synthese. ....	66
6.3	Gesteigerte Expression von TLR9 bei C4-defizienten Mäusen vor Autoimmunitätszeichen. ....	69
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>72</b>
<b>V</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>VI</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....</b>	<b>83</b>
<b>VII</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>VIII</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>85</b>

## II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über das Komplementsystem .....	16
Abb. 2: Übersicht der wichtigsten Toll-like Rezeptoren und ihrer Liganden .....	23
Abb. 3: IFN $\alpha$ mRNA-Expression in CD11b+ Zellen nach Behandlung mit apoptotischer DNA <sup>88</sup> .....	25
Abb. 4: Apoptose-Zeitkinetik von WEHI 231-Zellen: TUNEL-Positivität einer Langzeitkultur in PBS im Durchflusszytometer. ....	46
Abb. 5: Gelelektrophoretische Darstellung von DNA aus WEHI 231-Zellen nach Apoptose oder Ultraschall. ....	47
Abb. 6: Beispiel einer Reinheitsmessung CD11b-aufgereinigter Zellen am Durchflusszytometer. ....	47
Abb. 7: Expression von TLR9/3 CD11b-positiver Zellen nach Behandlung von Wt-Mäusen mit 4 $\mu$ g DNA .....	49
Abb. 8: Expression von TLR9/3 CD11c-positiver Zellen nach Behandlung von Wt-Mäusen mit 4 $\mu$ g DNA .....	51
Abb. 9: TLR9/3 mRNA Expression in CD11c+ Zellen einzelner Wt-Mäuse nach Behandlung mit apoptotischer DNA.....	51
Abb. 10: Expression von IFN $\alpha$ , TLR9 und TLR3 mRNA nach Behandlung mit 4 $\mu$ g apoptotischer DNA ohne/mit Vorbehandlung mit 5 $\mu$ g/g KG Chloroquin.....	54
Abb. 11: Expression von IFN $\alpha$ , TLR9 und TLR3 mRNA nach Behandlung mit apopt. DNA ohne/mit Vorbehandlung mit Chloroquin in einzelnen Mäusen. ....	55
Abb. 12: Immunhistochemische Darstellung der marginalen Zone der Milz von Wt, C4 <sup>-/-</sup> und IFNR <sup>-/-</sup> C4 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	57
Abb. 13: Expression von IFN $\alpha$ , TLR9 und TLR3 mRNA bei CD11b+ Zellen unbehandelter Mäuse.....	59
Abb. 14: TLR9/3 mRNA-Expression bei CD11c+ Zellen unbehandelter Mäuse. ....	61

### III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mechanismen der zentralen Toleranzentwicklung von B-Zellen <sup>21</sup> .....	12
Tab. 2: Modell der peripheren Toleranzinduktion <sup>25</sup> .....	12
Tab. 3: ACR-Kriterien .....	18
Tab. 4: Beispiele für mikrobielle Liganden von TLR3 und TLR9 <sup>72</sup> .....	24
Tab. 5: Darstellung des Medianes der relativen Werte für TLR9 (A) und TLR3 (B) von CD11b+ Zellen aus unbehandelten Wt-Mäusen sowie nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA bzw. nativer DNA. ....	50
Tab. 6: Darstellung des Medianes der relativen Werte für TLR9 (A) und TLR3 (B) von CD11c+ Zellen aus unbehandelten Wt-Mäusen sowie nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA bzw. nativer DNA. ....	52
Tab. 7: Darstellung des Medianes der relativen Werte für IFNα (A), TLR9 (B) und TLR3 (C) von CD11b+ Zellen aus unbehandelten Wt-Mäusen sowie nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA ohne bzw. mit vorheriger Gabe von 5µg/g KG Chloroquin. ....	56
Tab. 8: Darstellung des Medianes der relativen Werte für IFNα (A), TLR9 (B) und TLR3 (C) mRNA von CD11b+ Zellen aus unbehandelten Mäusen.....	60
Tab. 9: Darstellung des Medianes der relativen Werte für TLR9 (A) und TLR3 (B) mRNA von CD11c+ Zellen aus unbehandelten Mäusen. ....	62

## IV Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind alle verwendeten Abkürzungen mit Ausnahme der im Duden zugelassenen Standardabkürzungen aufgeführt.

AG	Antigen
AK	Antikörper
BE	Blutentnahme
C	Komplementkomponente
C4-/-	C4 defizient (Mäuse)
C4-/-IFR-/-	C4- und IFN-Rezeptor- defizient (Doppel-Knockout, Mäuse)
CD	Differenzierungsantigene (Cluster of differentiation)
CD11b+	CD11b positiv
CD11b-	CD11b negativ
CD11c+	CD11c positiv
CD11c-	CD11c negativ
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CR	Komplementrezeptor
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc	fragment crystallizable (z.B. FcγR oder FcγRIIa)
FCS	Fetales Kälberserum (Foetal Calf Serum)
FDC	Folikulär dendritische Zellen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEK293-Zelle	human embryonic 293-Zelle
Ig	Immunglobulin (z.B. Immunglobulin G oder M)
IgM-IC	IgM anti-dsDNA-Immunkomplex
IFRG28	Interferon Regulated Gene 28
IC	Immunkomplex
IFN	Interferon
IFN-α	Interferon alpha
IFR-/-	Interferon-Rezeptordefizienz
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase

IRF7	Interferon regulierender Faktor 7
IU	Internationale Einheit
i.v.	Intravenös
Lprlpr	Lupus-Modell-Mausstamm (Lymphoproliferationsmutation)
MAC	Membranangriffskomplex
MASP	MBL-aktivierte Protease
MBL	Mannose bindendes Lektin
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mDC	myeloide dendritische Zelle
mRNA	messenger RNA
MyDD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
MZ	Marginalzone
MZ B-Zellen	Marginalzonen B-Zellen
MZ Makrophagen	Marginalzonen Makrophagen
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NZW/NZB	Lupus-Modell-Mausstamm (New Zealand white/black)
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
pDC	Plasmazytoide dendritischen Zelle
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
Poly(I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleprotein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TANK	TRAF family member-associated NF-kappa-B activator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TIRAP	Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNP	2,4,6-Trinitrophenyl
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor

TRAM	translocating chain-associated membrane protein
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
rpm	Umdrehungen pro Minute
Unbeh.	Unbehandelt
Wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

Der systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine komplexe chronisch-inflammatorische Autoimmunerkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis, welcher zur Gruppe der Kollagenosen gezählt wird. Charakterisiert durch einen Verlust der B-Zell-Toleranz, kommt es beim SLE zur Generierung von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) und doppelsträngige DNA (dsDNA) und schließlich Ablagerung von Immunkomplexen im Bindegewebe von Haut und Gefäßen verschiedener Organe. Klinisch hat dies rezidivierende Organentzündungen und Arthritiden zur Folge, gefürchtet ist der fulminante Verlauf. Auf genetischer Ebene lässt sich sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell eine Assoziation von SLE mit einer Defizienz von Faktoren des klassischen Komplementaktivierungsweges (C1q, C4 und C2) beobachten. Dabei werden als Erklärungsmodelle momentan sowohl eine unzureichende B-Zell-Regulation als auch eine mangelhafte Clearance apoptotischer Körperchen und daraus folgende Akkumulation autoreaktiver Antigene diskutiert, ohne dass der genaue Mechanismus jedoch bisher vollständig geklärt ist. Neuere Ergebnisse deuten auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Komplementmangel und einer über Toll-like Rezeptoren vermittelten Aktivierung des Interferon- $\alpha$ -Systems hin. Erhöhte Spiegel von IFN $\alpha$  konnten insbesondere während akuter Krankheitsschübe im Serum von SLE-Patienten nachgewiesen werden.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem Verlust der Toleranz am Beispiel des SLE im Mausmodell und soll in diesem Rahmen die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren und ihren Zusammenhang zum aktivierten IFN $\alpha$ -System untersuchen.

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem (vom lateinischen *immunis* unberührt, frei, rein) ist das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen, welches Gewebeschädigungen durch Krankheitserreger verhindert. Es entfernt in den Körper eingedrungene Mikroorganismen, fremde Substanzen und ist außerdem in der Lage, fehlerhaft gewordene körpereigene Zellen zu zerstören.

Man unterteilt das Immunsystem in einen angeboren, unspezifischen und einen erworbenen, spezifischen Teil. Zum angeboren, entwicklungsgeschichtlich älteren Teil des Immunsystems gehören unter anderen phagozytäre Zellen, welche in der Lage sind eine breite Gruppe eindringender Erreger anhand bestimmter feststehender

Oberflächenmoleküle als fremd zu erkennen und schnell unschädlich zu machen. Das erworbene, auch als adaptiv bezeichnetes Immunsystem reagiert zwar zunächst langsamer, ist jedoch in der Lage auf eine spezifische Struktur zu reagieren und ein Gedächtnis zu entwickeln, woraufhin die Immunantwort beim Zweitkontakt schneller und effektiver erfolgt. Zu ihm werden u.a. T- und B-Lymphozyten gezählt, die in ihrer Entwicklung die Fähigkeit erwerben, mit Hilfe spezifischer Rezeptoren (T-Zell-Rezeptor, Immunglobuline der B-Zellen) ein bestimmtes Antigen zu erkennen und eine gezielte Immunantwort einzuleiten.

Dabei treten angeborenes und erworbenes Immunsystem nicht getrennt voneinander auf, sondern arbeiten zusammen, um so die komplexe Immunreaktion des Körpers zu ermöglichen<sup>11</sup>.

Es besteht jedoch die Gefahr, dass Zellen entstehen, die körpereigene Antigene fälschlicherweise als fremd erkennen und bekämpfen. Physiologischerweise sorgen verschiedene Mechanismen, wie die Induktion des Zelltods („Apoptose“) oder die Inaktivierung („Anergie“) solcher autoreaktiver Zellen, für die Toleranz des Immunsystems dem eigenen Körper gegenüber. Diese Toleranzinduktion ist sehr effektiv und wird durch ein komplexes System reguliert, welches bis heute nicht ganz verstanden ist. Dennoch kommt es immer wieder vor, dass Zellen des Immunsystems, deren Aufgabe es eigentlich ist den Organismus zu schützen, diesen angreifen. Es kommt zur Autoimmunität.

### **1.1.1 Toleranzentwicklung der B-Lymphozyten**

Während der B-Zell-Reifung entstehen Zellen, welche jeweils ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von möglichen Antigenen erkennen. Darunter können auch Selbstantigene, d.h. Merkmale körpereigener Zellen, sein. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Mechanismen herausgebildet, um solche selbstreaktiven Zellen zu identifizieren und unschädlich zu machen. Deren Gesamtheit bezeichnet man als Toleranzentwicklung und unterscheidet je nach dem Ort, an dem sich diese Selektion abspielt, in zentrale und periphere Toleranzinduktion<sup>36</sup>.

Im Knochenmark, dem Ort der zentralen Toleranzentwicklung, sind in der Regel nur körpereigene Antigene präsent, so dass bei der zentralen Toleranzentwicklung alle Zellen, die im Knochenmark Antigen binden, in ihrer Entwicklung unterdrückt werden<sup>91</sup>. Dies hat zur Folge, dass unreife B-Lymphozyten, deren Immunglobulingene zu einem autoreaktiven IgM-Rezeptor rekombiniert wurden, entweder absterben, inaktiviert

überleben („anergisch“ werden)<sup>44,109</sup> oder ihre Immunglobulingene neu arrangieren<sup>118</sup>, mit dem Ziel, nur selbst-tolerante Zellen in die Peripherie zu entlassen.

<b>Zentrale Toleranz von B-Zellen</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• negative Selektion: jedes Antigen im Knochenmark induziert in unreifen B-Zellen Toleranz</li> <li>• hohe Affinität des B-Zell-Rezeptors zu dem präsentierten Antigen/membrangebundenes Antigen: Rezeptoreditierung (Austausch eines Teiles des Rezeptors, „zweite Chance“) oder Apoptose (programmierter Zelltod)</li> <li>• niedrige Affinität des B-Zell-Rezeptors zu dem präsentierten Antigen/ lösliches Antigen: Anergie (Reduzierte Lebensdauer, reduzierte Aktivierbarkeit)</li> </ul>

**Tab. 1: Mechanismen der zentralen Toleranzentwicklung von B-Zellen<sup>21</sup>**

Autoreaktive Zellen, die den zentralen Selektionsprozess überlebt haben (anergische Zellen oder Zellen, die einen Rezeptor für ein nicht im Knochenmark präsent Selbstantigen tragen), können auch später noch im Rahmen der peripheren Toleranzinduktion<sup>87,91</sup> durch mangelnde Aktivierung in den peripheren lymphatischen Geweben (follikuläre Exklusion)<sup>20,24,109</sup> oder direkt über zytotoxische T-Lymphozyten<sup>109</sup> abgetötet werden<sup>43</sup>.

<b>Periphere Toleranz von B-Zellen im Keimzentrum</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Überleben im Keimzentrum nur mit Hilfe kostimulatorischer Signale, bei fehlender Stimulation =&gt; Apoptose der B-Zelle</li> <li>• keine T-Zelle mit einem für das Autoantigen passenden Rezeptor =&gt; keine Kostimulation der autoreaktiven B-Zelle =&gt; Apoptose der autoreaktiven B-Zelle</li> <li>• Antigeninduzierte Apoptose durch hohe Konzentrationen an Antigen (Besetzung der B-Zell-Rezeptoren mit Antigen =&gt; dadurch keine kostimulatorischen Signale von FDC =&gt; Apoptose der B-Zellen)</li> <li>• Fas (CD95)-induzierte Apoptose durch zytotoxische T-Zellen</li> <li>• verschiedene Einflussfaktoren auf die Apoptose im Keimzentrum</li> </ul>

**Tab. 2: Modell der peripheren Toleranzinduktion<sup>25</sup>**

Ein Teil der so entstandenen autoreaktiven B-Zellen wird durch fehlende Kostimulation eliminiert, ohne die die im Keimzentrum proliferierenden B-Zellen (Zentrozyten) nicht überleben können<sup>39</sup>. Aufgrund der Toleranzinduktion in der Entwicklung der T-Lymphozyten sollte es keine T-Helferzelle geben, die dasselbe Antigen wie eine potentiell autoreaktive B-Zelle erkennt und die weitere Entwicklung dieser Zelle

fördert<sup>26,49</sup>, so dass eine solche B-Zelle in den meisten Fällen zu Grunde geht<sup>60,91</sup> und von umliegenden Makrophagen phagozytiert wird.

Liegt eine extrem hohe Konzentration an löslichem Antigen in einem Keimzentrum vor, löst dies in einer für dieses Antigen spezifischen B-Zelle Apoptose (siehe 1.1.2) aus (antigeninduzierte Apoptose). Dieser weitere Mechanismus der Selektion soll den Körper wahrscheinlich vor der Entstehung von Autoantikörpern gegen lösliche, in den Keimzentren in großer Zahl<sup>68</sup> vorhandenen Antigenen - wie beispielsweise den Serumproteinen – schützen.

Auch im Keimzentrum töten zytotoxische T-Lymphozyten autoreaktive B-Zellen über Stimulation von deren Fas-Rezeptor (CD95)<sup>78,87,90,99,109</sup>. Auf welche Signale hin diese Selektion geschieht, ist nicht abschließend geklärt.

Obwohl verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion bekannt sind, ist bislang nicht erforscht, welche bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen versagen, oder ob möglicherweise noch unbekannte Toleranzmechanismen eine Rolle spielen.

### 1.1.2 Apoptose

Als Apoptose (griech. *apo* „weg“ und *ptosis* „Fall“) wird eine Form des programmierten Zelltods bezeichnet<sup>29</sup>, welche von außen angeregt (z.B. durch Immunzellen) oder aufgrund von zellinternen Prozessen (z.B. nach starker Schädigung der Erbinformation) ausgelöst werden kann. Sie ist einer der wichtigsten Mechanismen der Toleranzinduktion und unterliegt strenger Kontrolle, um zu gewährleisten, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. Eine zentrale Rolle spielen Caspasen, Enzyme mit proteolytischer Aktivität, die für den korrekten Ablauf der Apoptose sorgen<sup>91</sup>.

Man unterscheidet zwei verschiedene Formen der Apoptose, die durch unterschiedliche Faktoren induziert werden. Die intrinsische oder mitochondriale Apoptose wird durch Zellgifte, Nährstoffmangel, ionisierende Strahlung oder eine T-Zell-unabhängige Stimulation des Antigenrezeptors ausgelöst<sup>42,86,110</sup>, was einen Zusammenbruch des transmembranen Potentials der Mitochondrienmembran induziert, der zu einer Freisetzung von Cytochrom C führt. Die extrinsische oder TNF-Rezeptor-assoziierte Apoptose wird durch Stimulation von Oberflächenrezeptoren ansonsten intakter Zellen ausgelöst. Diese Rezeptoren, wie der Fas-Rezeptor (CD95), werden durch Ligandenbindung kreuzvernetzt<sup>21,91</sup>. Beide Wege münden in der kaskadenartigen Aktivierung von Caspasen, die das Schrumpfen der Zelle und die

Degradierung des Chromatins steuern. Endonukleasen fragmentieren die DNA, der Zellkern und mikrotubuläre Strukturen werden aufgelöst, während Mitochondrien und andere Zellorganellen zunächst intakt und funktionsfähig bleiben<sup>32</sup>. Am Ende des apoptotischen Programms werden Teile des Zytoplasmas zusammen mit den Zellorganellen und den DNA-Stücken in Vesikel „verpackt“ und ausgeschleust. In vivo werden diese sogenannten apoptotischen Körperchen dann von umliegenden Makrophagen an Oberflächenstrukturveränderungen (z.B. dem Erscheinen von Phosphatidylserin (PS))<sup>76,106</sup> erkannt und phagozytiert, ohne dass entzündungserregende Zellbestandteile in den Extrazellularraum dringen können<sup>79</sup>. Dies unterscheidet die aktiv ablaufende Apoptose<sup>9</sup> normalerweise von anderen, passiven Formen des Zelltodes wie der Nekrose<sup>97</sup>, bei der die Zelle anschwillt, sodass ihre Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zu lokalen Entzündungen, da Zytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden, welche durch Makrophagen (Fresszellen) beseitigt werden müssen. Dennoch kann auch bei dem Prozess der Apoptose eine Immunreaktion gegen Zellbestandteile ausgelöst werden<sup>111</sup> mit apoptotischen Körperchen als potentielle Quelle als Autoantigen. So werden seit einiger Zeit Defekte in der Clearance von apoptotischen Körperchen für die Entstehung von SLE diskutiert<sup>82</sup>.

## 1.2 Das Komplementsystem

Der belgische Bakteriologe Jules Bordet (1870-1961) beschrieb 1896 erstmalig Komplement als einen hitzeempfindlichen Bestandteil des normalen Blutplasmas, welcher die Fähigkeit besitzt mit seinem korrespondierenden Antikörper inkubierte Bakterien zu lysieren. Da dieser Bestandteil somit die Aktivität von Antikörpern bei der Lyse von Bakterien ergänzt (komplementiert), wurde er Komplement genannt. Heute ist jedoch bekannt, dass es auch am angeborenen Immunsystem beteiligt ist.

Beim Komplementsystem handelt es sich um ein System von ca. 30 Plasmaproteinen, dessen Komponenten im Blutplasma oder zellgebunden vorliegen und der Abwehr von Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Pilze) dienen. Des Weiteren hat es auch stark zellzerstörende Eigenschaften und kann bei Fehlregulation im Verlauf vieler Krankheiten (z.B. Glomerulonephritis, HUS, Myokardinfarkt, SLE, Rheumatoide Arthritis) für Gewebeschäden verantwortlich sein.

Die Funktionen sind Opsonierung, Auslösen einer Entzündungsreaktion oder teilweise die direkte Zerstörung von Bakterienmembranen durch Einfügen von Poren in diese.

Des Weiteren wirken die Fragmente einiger Komplementproteine als Chemokine, die Phagozyten anlocken.

Der Großteil der Komplementproteine sind Zymogene, inaktive Vorstufen von in diesem Fall Proteasen, die ihrerseits durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Sie kommen normalerweise reaktionslos überall im Körper vor, werden jedoch im Falle einer Infektion lokal aktiviert und aktivieren weitere Zymogene durch deren Spaltung. Dies führt zu einem exponentiellen Anstieg der Proteine am Ende der Kaskade, was zu einer verstärkten Immunantwort führt<sup>53</sup>.

Es werden drei Aktivierungswege des Komplementsystems unterschieden:

- klassischer Weg (über Antikörper vermittelt)
- Lektin-Weg (über Mannose-bindendes Lektin vermittelt)
- alternativer Weg (spontan, Antikörper-unabhängig)

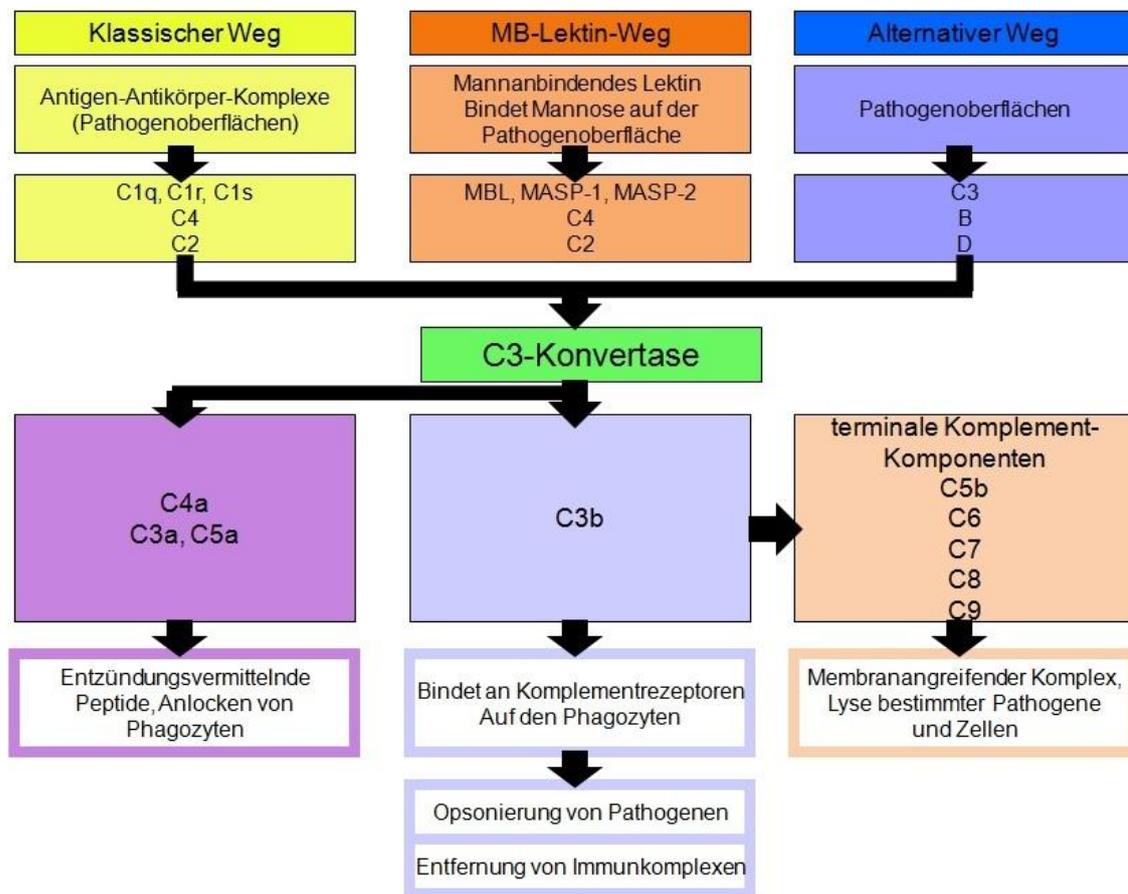
Beim klassischen Weg erfolgt die Komplementaktivierung durch Immunkomplexe, bestehend aus Antigenen (z.B. Epitope auf Krankheitserregern) und Antikörpern wie IgM und IgG. Über die Komplementfaktoren C1q, r und s wird C4 gespalten und damit aktiviert. Das größere Spaltprodukt von C4 - C4b - bindet an eine Zieloberfläche und bildet gemeinsam mit C2 eine C3-Konvertase. Im Lektin-Weg bindet das Mannose-bindende Lektin (MBL) an Mannose oder N-Acetyl-Glukosamin auf der pathogenen Oberfläche (z. B. bakterielles Peptidoglykan) und aktiviert dann die MBL-aktivierten Proteasen MASP-1, MASP-2 und MASP-3. Diese katalysieren dieselben Reaktionen wie im klassischen Weg. Beim alternativen Weg wird die spontan aktivierte Komplementkomponente C3 (durch spontanen Zerfall des instabilen Komplementfaktors C3 in C3a und C3b) direkt an die Pathogenoberfläche gebunden und bildet mit weiteren Faktoren ebenfalls eine C3-Konvertase.

Alle drei Wege haben als Produkt die C3-Konvertase, von dort aus wird die Kaskade einheitlich fortgesetzt. Die C3-Konvertase spaltet C3 und aktiviert es somit. C3b induziert dann die Aktivierung weiterer Komplementfaktoren wie C5-C9. Diese bilden den Membranangriffskomplex (MAC), einen Komplex aus mehreren Proteinen, der die Zielzelle unter anderem durch Porenbildung in der Zellmembran attackiert und zu ihrer Lyse führt<sup>53</sup>.

Die kleinen Spaltprodukte des alternativen und des klassischen Reaktionsweges bewirken zudem als Anaphylatoxine Bronchokonstriktion, Chemotaxis inflammatorischer Zellen und eine Erhöhung der Vasopermeabilität<sup>30</sup>.

Des Weiteren spielen Komplementfaktoren bei der Beseitigung von zirkulierenden Immunkomplexen und apoptotischem Zellmaterial eine zentrale Rolle<sup>76,116</sup>. C1, C4 und

C3 binden an die Immunkomplexe, wobei C1q die Löslichkeit von solchen zirkulierenden Komplexen erhöht, und deren Präzipitation in Geweben verhindert<sup>107</sup>. C3b und C4d fördern wahrscheinlich die Aufnahme der Immunkomplexe über zugehörige Rezeptoren auf Zellen des phagozytären Systems.



**Abb. 1: Übersicht über das Komplementsystem**

Schematische Darstellung der drei Aktivierungswege des Komplementsystems mit den wesentlichen Komponenten und Effektorwirkungen<sup>53</sup>.

### 1.2.1 Komplement und Toleranzinduktion

Das Komplementsystem ist auch an der Regulation<sup>28</sup> und Aktivierung von B-Zellen durch Erkennung von körpereigenen Proteinen beteiligt. Dabei spielen die Komplementrezeptoren CR1 und CR2 (CD35/CD21) eine wichtige Rolle in der Regulation der antikörperproduzierenden B-Zellen<sup>9</sup>, indem durch Bindung der in den Immunkomplexen integrierten Komplementspaltprodukte C3d und C4d eine Kostimulation des B-Zell-Rezeptors ausgelöst wird. Defekte des klassischen Komplementaktivierungswegs oder ein Mangel an Komplementfaktoren führen einerseits zu einer beeinträchtigten humoralen Immunantwort mit einer verminderten Antikörperproduktion<sup>1,28</sup>, 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. Ist die Clearance mangelhaft, werden Immunkomplexe z.B. in den Glomeruli der Niere abgelagert, was eine Nephritis aufgrund einer chronischen Komplementaktivierung als Konsequenz haben kann.

### **1.3 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)**

Beim systemischen Lupus Erythematoses handelt es sich um eine chronische Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, bei der es charakteristischerweise zur Bildung von Autoantikörpern gegen verschiedene nukleäre Antigene wie Doppelstrang-DNA (dsDNA) und Ribonukleoproteinen (RNP: Ro/La/Sm)<sup>121</sup> sowie zur Generierung von Immunkomplexen kommt.

Das Vorhandensein von Antikörpern gegen dsDNA im Serum ist ein wichtiger diagnostischer Marker für SLE. Diese Autoantikörper können direkt Gewebe schädigen oder Immunkomplexe bilden, die sich im Gewebe anlagern und eine inflammatorische Immunantwort auslösen. Dadurch können dann weitere Autoantigene freigesetzt und autoreaktive T- und B-Zellen aktiviert werden.

Das klinische Erscheinungsbild ist durch chronische Entzündungsprozesse von Haut, Gelenken, Niere und Herz, des zentralen Nervensystems und Gastrointestinaltrakts gekennzeichnet. Frauen sind dabei etwa zehnmal häufiger als Männer betroffen. Der systemische Lupus Erythematoses tritt mit einer Inzidenz von 5 – 10/100.000/Jahr und einer Prävalenz von 50 Erkrankungen/100.000 auf<sup>48</sup>.

Die klinische Diagnose erfolgt anhand der seit 1982 geltenden und zuletzt 1997 modifizierten 11 Kriterien des American College of Rheumatology (ACR)<sup>115</sup>.

<b>ACR-Kriterien</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schmetterlingserythem</li> <li>• diskoider Lupus Erythematoses</li> <li>• Photosensibilität</li> <li>• Orale oder nasale Schleimhautulzera</li> <li>• Nichterosive Arthritis von 2 oder mehr Gelenken</li> <li>• Serositis (Pleuritis, Perikarditis)</li> <li>• Nierenbeteiligung (Proteinurie &gt; 0,5 g/d oder Zylindrurie)</li> <li>• ZNS-Beteiligung</li> <li>• hämatologische Befunde: Coombs-positive hämolytische Anämie, Thrombopenie, Leukopenie</li> <li>• immunologische Befunde: anti-dsDNA, anti-Sm, Antiphospholipidantikörper</li> <li>• Antinukleäre Antikörper (ANA) in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie</li> </ul>

**Tab. 3: ACR-Kriterien**

*Die Tabelle zeigt die für die klinische Diagnose maßgeblichen Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) des Systemischen Lupus Erythematoses. Bei mindestens vier positiven Kriterien ist die Diagnose eines SLE zu stellen<sup>48</sup>*

Bei der Ätiologie des SLE handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, wobei die genaueren Mechanismen weitestgehend unbekannt sind. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass Viren oder UV-Licht als ursächliche Faktoren in Frage kommen. Es kommt zur Apoptose von Zellen, so dass ihre Kernbestandteile freigesetzt werden. Dies gilt vor allem dann, wenn die Phagozytose der apoptotischen Zellen gestört ist, wie es für eine Subgruppe der SLE-Patienten beschrieben ist<sup>47</sup>. So zeigen isolierte Monozyten aus peripherem Venenblut von SLE-Patienten eine verminderte Ausprägung des CD44 Oberflächenmoleküls, welches am Phagozytose-Prozess beteiligt ist. Die meisten dieser Monozyten zeigen außerdem morphologische Unterschiede bei SLE-Patienten: sie sind nicht nur vermindert und sterben eher, sondern sie sind auch kleiner und fehlgebildet. Serumkomponenten, wie Komplementfaktoren, CRP und einige Glykoproteine, sind außerdem ausschlaggebend für den funktionierenden Phagozytose-Prozess. Solche Komponenten fehlen oder sind im Serum vieler SLE-Patienten vermindert oder ineffizient<sup>5,35,85</sup>.

Durch die gestörte Clearance häuft sich dieses apoptotisches Material an, das fehlgesteuerte Immunsystem erkennt dieses als fremd und bildet Autoantikörper, welche zusammen mit den Autoantigenen Immunkomplexe bilden und sich an den verschiedensten Orten ablagern (z.B. Gefäßwände, Glomeruli). Durch Komplementaktivierung wird eine Entzündungskaskade in Gang gesetzt<sup>12,15,98,116</sup>.

Die Kernbestandteile werden zusätzlich noch auf der Oberfläche verschiedenster Zellen präsentiert, was zur B-Zell-Aktivierung und Produktion weiterer Autoantikörper führt.

### 1.3.1 Komplement und SLE

Bei Patienten mit renaler Beteiligung des SLE lassen sich Ablagerungen von Immunkomplexen, zusammengesetzt aus Autoantikörpern und Komplement, in den Glomeruli nachweisen. Zudem findet man im akuten Schub im Serum der Patienten erniedrigte Komplementspiegel durch erhöhten Verbrauch von Komplementfaktoren, was ein Aktivitätsmerkmal der Krankheit darstellt.

Zunächst erscheint die Assoziation einer Komplementdefizienz auf genetischer Ebene und die Entstehung von SLE paradox, sollte doch ein unvollständiges Komplementsystem bezüglich des chronisch inflammatorischen Verlaufs des SLE protektiv wirken, wenn akute Schübe der Erkrankung von Komplementaktivierung durch abgelagerte Immunkomplexe im Gewebe gekennzeichnet sind. Ganz im Gegenteil konnte sowohl beim Menschen<sup>5</sup> als auch in tierexperimentellen Studien<sup>85</sup> nachgewiesen werden, dass bei Mangel an Faktoren des klassischen Komplementaktivierungsweges (C1q > C4 > C2) eine Prädisposition für SLE besteht<sup>116</sup>. Defizienzen des Komplementfaktors C1 oder eines seiner Untereinheiten (C1q)<sup>22,83</sup> und des Komplementfaktors C4<sup>83,100</sup> 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 zuzukommen<sup>23</sup>.

Es werden momentan zwei Hypothesen im Zusammenhang zwischen Komplementdefizienz und der Entstehung von SLE diskutiert. Die erste stützt sich auf die Bedeutung von Komplement bei der Regulierung der Entwicklung, Aktivierung und Toleranz der B-Zellen. Fehlen demnach die regulatorischen Signale durch aktivierte Komplementfragmente in B-Zellen, würde die Aufrechterhaltung von peripherer Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen versagen. Dass sowohl der Mangel an C4 als auch eine Defizienz der Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR2 (CD21) einen Einfluss auf die Toleranzinduktion haben<sup>85</sup>, konnte in zwei unabhängigen Toleranzmodellen gezeigt werden. Des Weiteren begünstigt eine gestörte Kostimulation von CD21/CD35 auf B-Zellen die Entwicklung von

Autoimmunphänomenen. Im Gegensatz zu Mäusen mit Defizienz für C1q oder C4 zeigen CD21/CD35-defiziente Mäuse jedoch keine spontane Autoimmunerkrankung<sup>17</sup>. Die zweite Hypothese berücksichtigt die Rolle von Komplement bei der Clearance von Immunkomplexen und apoptotischen Körperchen und vermutet bei Komplementdefekten eine ungenügende Clearance als Initiator des Toleranzverlustes. Es wurde beobachtet, dass in tierexperimentellen Studien intraperitoneal (i.p.) applizierte apoptotische Körperchen weniger gut phagozytiert werden, wenn C1q<sup>12,116</sup> oder C4<sup>116</sup> fehlt. Des Weiteren weisen Makrophagen von SLE-Patienten in vitro eine verminderte Phagozytosefähigkeit von apoptotischen Zellen in Anwesenheit von autologem Serum auf. Komplement spielt somit eine wichtige Rolle in der Clearance von Immunkomplexen und apoptotischen Körperchen. Ist die Elimination gestört, dienen die verbleibenden apoptotischen Körperchen als Autoantigenquelle, zumal man eine Vielzahl der betreffenden Autoantigene bei SLE in oder auf deren Oberfläche findet<sup>15,98</sup>.

Allerdings benötigt die Komplement-vermittelte Phagozytose zumindest teilweise auch C3b. Da aber keine Assoziation zwischen einem Mangel an C3 und SLE besteht, scheinen beide Erklärungsmodelle nicht ausreichend, den Zusammenhang von Komplementmangel und SLE zu erklären<sup>35</sup>.

### 1.3.2 Interferon alpha (IFN $\alpha$ ) und SLE

Interferone (IFN, von engl. *to interfere* eingreifen, sich einmischen) sind Proteine mit immunstimulierender, vor allem antiviraler und antitumorale Wirkung. Sie werden nach einer Virusinfektion gebildet und verhindern ein Übergreifen der Viren auf nicht-infizierte Zellen<sup>52,55</sup>. Man unterscheidet zwei Familien: Typ-I- (IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ) und Typ-II- (IFN $\gamma$ ) Interferone. Die Hauptproduzenten von IFN $\alpha$  sind beim Menschen plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), typischerweise durch Vorliegen von dsRNA bei einer viralen Infektion<sup>94</sup>, was ihnen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems gibt. Als weiterer Stimulus zur IFN $\alpha$ -Produktion in pDCs konnten aus dem Serum von Lupus-Patienten aufgereinigte Immunkomplexe nachgewiesen werden<sup>94,119</sup>. Diese Aktivierung zeigte sich sowohl gegenüber DNase als auch gegen RNase sensitiv<sup>69</sup>. Die von den infizierten Zellen freigesetzten Interferone binden dann sowohl auf virusinfizierten als auch auf nichtinfizierten Zellen über den so genannten Interferonrezeptor (IFNR). Darüber wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die in der Synthese verschiedener Proteine endet, welche einerseits eine weitere Virusproteinsynthese in den infizierten Zellen hemmen und andererseits den Abbau von viraler RNA bewirken<sup>55</sup>. Zusätzlich wird die zelluläre Immunantwort

verstärkt. Dies geschieht über eine gesteigerte Expression von MHC- (Major Histocompatibility Complex) Klasse-I-Molekülen auf den Zelloberflächen. Diese sind notwendig, um den T-Lymphozyten virale Antigene zu präsentieren. Des Weiteren aktivieren Interferone natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), welche der Virus- und Tumorabwehr dienen<sup>55</sup>.

Seit mehreren Jahren wird IFN $\alpha$  zur Therapie der chronischen Hepatitis B- und der akuten und chronischen Hepatitis C-Infektion sowie in der Onkologie (Haarzelleukämie, T-Zell-Lymphom der Haut, Kaposi-Sarkom) eingesetzt. Die antitumorale Wirksamkeit der Alpha-Interferone beruht dabei neben der Aktivierung von NK-Zellen auch auf ihrer antiproliferativen Wirkung. Des Weiteren wird IFN $\alpha$  bei der Therapie der essentiellen Thrombozythämie eingesetzt, wobei die Wirkung auf dem suppressiven Effekt auf das Knochenmark beruht.

Nebenwirkungen einer Interferontherapie sind grippale Symptome wie Fieber (evtl. mit Schüttelfrost), Müdigkeit und Gelenkschmerzen. Infolge des suppressiven Effekts auf das Knochenmark kann es zu Leukopenie und Thrombopenie kommen. Bei einer bereits bestehenden Leberinsuffizienz ist vor allem die weitere Verschlechterung der Leberfunktion gefürchtet<sup>48</sup>.

In frühen klinischen Studien wurde eine Korrelation zwischen überschießender IFN $\alpha$ -Expression und SLE gezeigt. So findet sich beim humanen SLE ein aktiviertes IFN $\alpha$ -System mit erhöhten IFN $\alpha$ -Spiegeln bei an SLE erkrankten Patienten oder eine gesteigerte Expression IFN $\alpha$ -induzierter Gene<sup>84,125</sup>. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Patienten mit malignen Erkrankungen oder chronischen viralen Infektionen unter Therapie mit rekombinantem IFN $\alpha$  Lupus-ähnliche Symptome entwickelten und antinukleäre Antikörper (ANAs) generierten<sup>31,37,57,92,93</sup>.

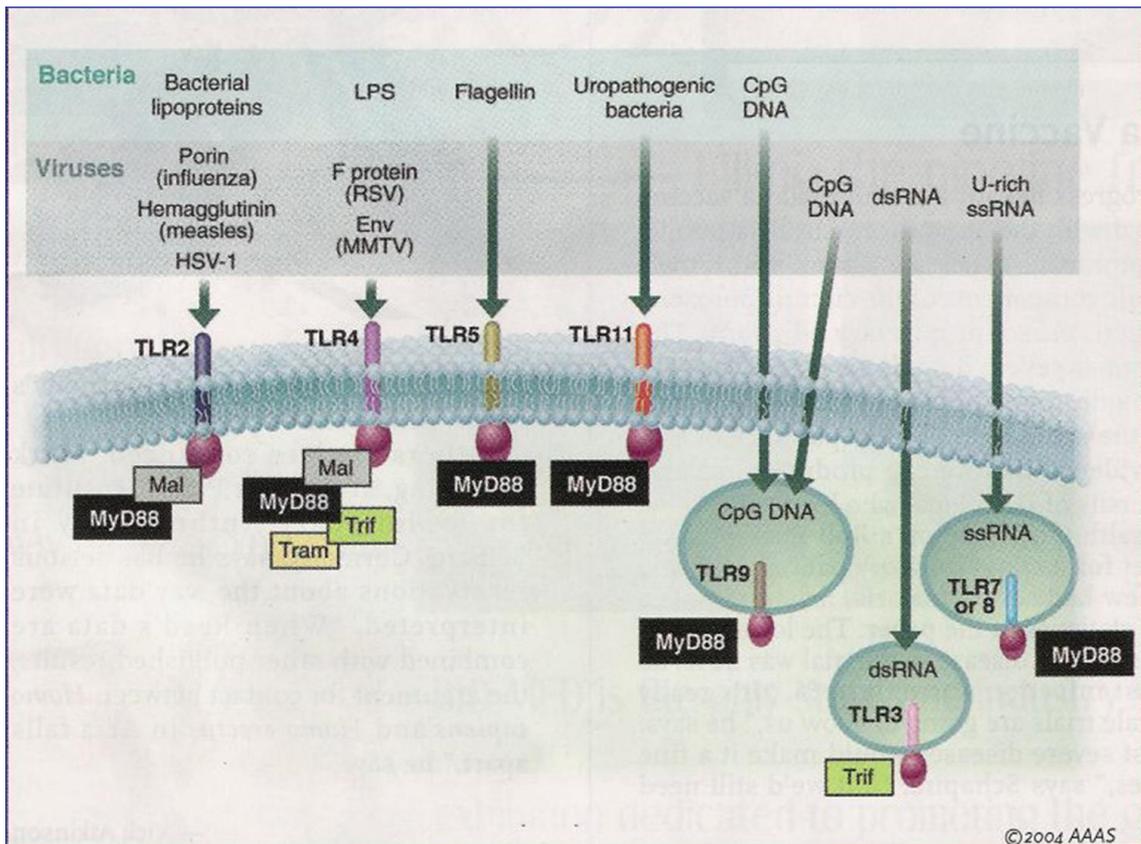
Bei weiblichen C4-defizienten Mäusen wurden bereits vor Entwicklung von Lupus-ähnlichen Symptomen erhöhte IFN $\alpha$ -Spiegel im Vergleich zu gesunden Wt-Mäusen nachgewiesen<sup>27</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von nicht-autoimmunen Mäusen mit apoptotischer DNA einen Anstieg von IFN $\alpha$  zur Folge hat.

## 1.4 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Strukturen des angeborenen Immunsystems und gehören zu einer Gruppe von Rezeptoren welche als PRRs (Pattern Recognition Receptors) bezeichnet werden. Sie dienen der Erkennung von PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) - Antigenen, welche ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vorkommen - und steuern entsprechende Aktivierungen von Genen. Hierdurch wird die Aktivierung des „antigen-spezifischen Immunsystems“ eingeleitet und moduliert. Durch die Toll-like Rezeptoren vermag das angeborene Immunsystem zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ zu unterscheiden<sup>54</sup>. Zu den PAMPs gehören Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA, Lipoteichon acid), Mannane, Glycane, doppelsträngige RNA und bakterielle DNA. Obgleich PRRs ursprünglich als Rezeptoren identifiziert wurden, die mikrobielle molekulare Strukturen vom Wirtsgewebe unterscheiden<sup>75</sup>, mehren sich die Hinweise, dass viele derselben PRRs zusätzlich bei der Immunantwort bei Verletzung, Beseitigung apoptotischer Zelltrümmer und der Reparatur von zerstörtem Gewebe involviert sind<sup>72</sup>.

Der Name Toll-like Rezeptor leitet sich von der Homologie zu einem Protein bei *Drosophila melanogaster* namens Toll ab, das ursprünglich von Christiane Nüsslein-Volhard benannt wurde. Mitte der 1990er wurde durch Forschungen im Bereich der Entwicklungsbiologie von *Drosophila melanogaster* eher zufällig erkannt, dass Toll-negative Mutanten sehr anfällig gegen Pilzbefall waren<sup>66</sup>. Diese Beobachtung leitete eine gezielte Suche nach ähnlichen Proteinen in Säugerzellen ein, die daraufhin bald gefunden und als TLRs bezeichnet wurden. Die Bedeutung der TLR-Familie in der frühen Erkennung von Pathogenen wurde zuerst von Medzhitov und Janeway 1997 erkannt.

Bisher wurden elf humane und 12 murine Rezeptoren identifiziert, die verschiedene funktionale Bestandteile von Viren, Bakterien und Pilzen erkennen und so biochemische Reaktionsketten in den Zellen auslösen können, welche der Abwehr dieser Krankheitserreger dienen<sup>80</sup>.



**Abb. 2: Übersicht der wichtigsten Toll-like Rezeptoren und ihrer Liganden**

Schematische Darstellung von Spezifität, Lokalisation und des Aktivierungsweges der wichtigsten TLRs. Insgesamt sind bisher 11 humane und 12 murine Rezeptoren identifiziert. (Quelle: O'Neill<sup>63</sup>)

Die Chemoattraktorproteine C3a und C5a des Komplementsystems locken Phagozyten wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten an, welche auf ihrer Oberfläche Rezeptoren vom TLR-Typ exprimieren. Die Toll-like Rezeptoren reagieren auf bakterielle Proteoglykane bzw. Lipopolysaccharide (LPS), DNA und RNA (**Abb. 2**). Sie lösen in ihren Trägerzellen eine Signalkaskade aus, die schließlich zur Stimulation der Infektionsabwehr führt. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Rekrutierung von Adapterproteinen (MyD88, TRIF, TRAM, TIRAP).

Man unterscheidet einen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Weg<sup>56,58</sup>. Der MyD88-abhängige Weg wird durch die Assoziation des TLRs ausgelöst, woraufhin Moleküle aus der IRAK-Familie rekrutiert werden. Durch Hyperphosphorylierung von IRAK1 wird die Interaktion mit TRAF6 induziert. Durch den Komplex aus MyD88, IRAK1 und TRAF6 werden die IFN-aktivierenden Faktoren (IRF3, 5 und 7), sowie NF-κB aktiviert, was zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt. Beim MyD88-unabhängigen Weg erfolgt die Rekrutierung über TRIF, was über die Kinase TBK1 IRF3 induziert. NF-κB wird durch TRAF6 und TRIF aktiviert, dabei kommt es zur Bildung von IFNα<sup>3,58,59</sup>.

### 1.4.1 TLR3: Ligand für dsRNA

Der Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) hat als Liganden doppelsträngige RNA (dsRNA)<sup>4</sup>. TLR3 wird im Gegensatz zu den meisten anderen Toll-like Rezeptoren nicht auf der Plasmamembran exprimiert, sondern liegt intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor. Moleküle der Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) dienen als synthetischer TLR3-Agonist und können zur Verstärkung der adaptiven Immunantwort eingesetzt werden<sup>102</sup>. In vivo Studien haben gezeigt, dass TLR3 eine essentielle Komponente bei der NK-Zell-Antwort auf eine virale Infektion darstellt<sup>114</sup>. TLR3 wird vor allem auf menschlichen myeloiden dendritischen Zellen (mDCs), murinen Monozyten und mesangialen Zellen exprimiert<sup>88</sup>.

### 1.4.2 TLR9: Ligand für CpG-Motive

Der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) wurde ursprünglich als ein Rezeptor identifiziert, der zwischen bakterieller (oder viraler) DNA und Säugetier-DNA, basierend auf der hohen Frequenz von hypomethylierten Cytosin-Guanin-Dinukleotidpaaren (CpG)-Motiven in Nicht-Säugetier-DNA, unterscheiden kann<sup>46,61</sup>. Bei Säugetier-DNA liegen 80% der CpG-Motive in methylierter Form vor<sup>10,38</sup>, die Anzahl so genannter stimulatorischer CpG-Motive ist etwa siebenmal geringer (CpG-Suppression)<sup>112</sup>. In TLR9-defizienten Mäusen induziert CpG-DNA weder eine inflammatorische Immunantwort noch Antikörper gegen dsDNA<sup>7,18,46</sup>.

TLR9 wird in dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen ebenfalls im ER exprimiert wie der TLR3. Die Rekrutierung in Lysosomen erfolgt erst wenn die Zelle mit CpG-DNA stimuliert wurde<sup>46,62</sup>, wofür die CpG-DNA zuerst internalisiert werden muss, z.B. durch Clathrin-vermittelte Endozytose<sup>62</sup>.

TLR	Mikrob. Ligand	Endogener Ligand			
		Autoantigen	Natürliche Quelle d. Autoantigens	Experimentelle Quelle des Autoantigens	Krankheits-Assoziation
TLR3	Doppelsträngige RNA (Viren)	dsRNA	Nekrotische Zellen	Synovialflüssigkeit	Arthritis
TLR9	DNA (Bakterien oder HSV)	dsDNA	Tote oder sterbende Zellen	Apoptotische oder nekrotische Zell-Debris	SLE

**Tab. 4: Beispiele für mikrobielle Liganden von TLR3 und TLR9<sup>72</sup>**

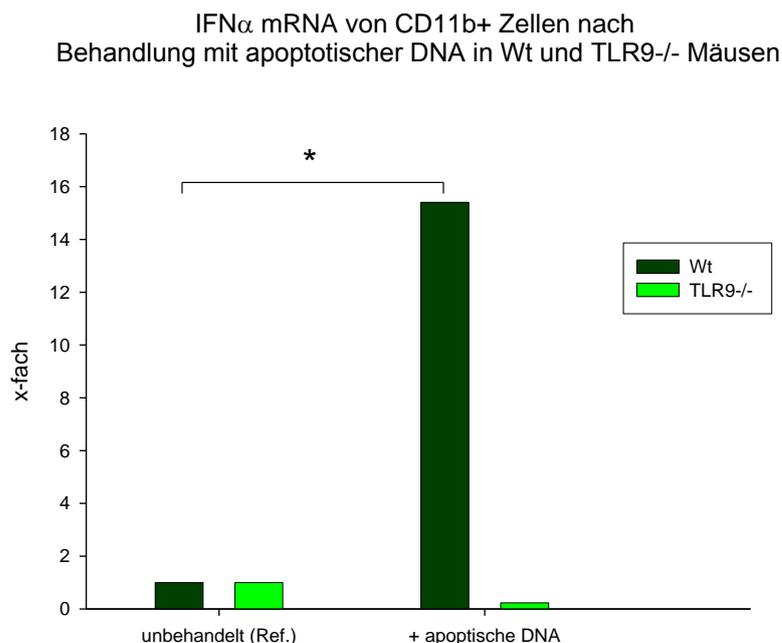
*Dargestellt werden die Beispiele von mikrobiellen und endogenen Liganden für TLR3 und TLR9 im Hinblick auf natürliches Vorkommen, experimentelle Quellen und Krankheitsassoziation. Es zeigt sich dsRNA als Ligand für den TLR3, welche in nekrotischen Zellen vorkommt und aus Synovialflüssigkeit gewonnen werden kann. TLR9 hingegen erkennt dsDNA, typischer Weise aus apoptotischen Zellen.*

HSV = Herpes simplex Virus

### 1.4.3 TLR9 und IFN $\alpha$

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen *in vivo*, dass apoptotische DNA in der Lage ist, IFN $\alpha$  über einen TLR9-abhängigen Signaltransduktionsweg in murinen Makrophagen der marginalen Zone (MZ) zu induzieren<sup>89</sup>. Intravenöse Applikation von 4  $\mu$ g apoptotischer DNA führte nach 6 h in CD11b-positiven Zellen der Marginalen Zone der murinen Milz nicht-autoimmuner Wt-Mäuse, nicht jedoch in TLR9-defizienten Mäusen, zu einer signifikanten Steigerung von IFN $\alpha$  mRNA (**Abb. 3**). Apoptotische DNA ist demnach nicht in der Lage, in TLR9-/- Mäusen die IFN $\alpha$ -Produktion zu induzieren. Somit scheint die IFN $\alpha$ -Produktion von MZ-CD11b+ Zellen durch apoptotische DNA abhängig vom TLR9-Signalweg zu sein.

Verschiedene *in vitro* Studien befassen sich bereits mit den Mechanismen bezüglich DC-Aktivierung durch Nukleinsäuren, ohne dass die Mechanismen *in vivo*, welche hinter der IFN $\alpha$ -Induktion stehen, bisher vollständig verstanden sind.



**Abb. 3: IFN $\alpha$  mRNA-Expression in CD11b+ Zellen nach Behandlung mit apoptotischer DNA<sup>89</sup>**

Abgebildet sind die medianen Werte der relativen Werte der IFN $\alpha$  mRNA-Expression in Wt- und TLR9-/- Mäusen ohne und mit Applikation von 4  $\mu$ g apopt. DNA *i.v.* im Vergleich zur Referenz.

Die Applikation von apoptotischer DNA *i.v.* führte nach 6 h in Wt-Mäusen zu einer signifikanten (\* $p < 0,05$ ) 15,41-fach erhöhten Expression von IFN $\alpha$  mRNA. Bei den TLR9-defizienten Mäusen zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Mäusen eine Expression von 0,32, welche nicht signifikant war.

#### 1.4.4 Toll-like Rezeptoren und SLE

TLR9 wird als der Rezeptor für endogene DNA angesehen und ist neben der IFN $\alpha$ -Induktion offenbar direkt bei der B-Zellregulation und IgM-Produktion involviert<sup>45,101</sup>.

Große Mengen von IFN $\alpha$  werden von den so genannten plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs) produziert<sup>94</sup>, einer Gruppe unreifer dendritischer Zellen, welche durch Toll-like Rezeptoren stimuliert werden. Als Antwort auf eine virale Infektion produzieren diese Zellen IFN $\alpha$  und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Immunkomplexe können dabei ein unerwartet potenter Stimulus für die IFN $\alpha$  Produktion sein, vor allem für pDC-Populationen, die zuvor gegenüber Typ-I-Interferonen exponiert wurden<sup>94,95,119</sup>.

Der Zusammenhang zwischen DNA-haltigen Immunkomplexen und TLR9 wurde durch die Verwendung von TLR9-defizienten Zellpopulationen und TLR9-transfizierten Zell-Linien ermittelt. Chromatin-haltige Immunkomplexe induzieren in murinen, aus dem Knochenmark-stammenden DCs, die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF). Diese Antwort ist von der Fc $\gamma$ R-Expression abhängig und kann durch Inhibitoren von TLR9 blockiert und merklich in Zellen von TLR9-defizienten Mäusen reduziert werden<sup>13</sup>.

Im humanen System konnte gezeigt werden, dass DNA-haltige Immunkomplexe aus dem Serum von SLE-Patienten in der Lage sind, die Produktion von Zytokin-mRNA von HEK293 (human embryonic 293)-Zellen, welche mit TLR9 und Fc $\gamma$ RIIIa transfiziert wurden, zu stimulieren. Außerdem co-lokalisierten sie mit TLR9 und Fc $\gamma$ RIIIa in sauren Lysosomen<sup>74</sup>. Weiterhin können pDCs durch aus dem Serum von SLE-Patienten aufgereinigtem IgG gemischt mit apoptotischer Zell-Debris aktiviert werden<sup>69</sup>. Dies zeigt, dass endogene Nukleinsäuren eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der pDCs einnehmen<sup>72</sup>. Diese IFN $\alpha$ -induzierende Aktivität wird durch Chloroquin inhibiert.

Das ursprünglich in der Malariaprophylaxe eingesetzte Chloroquin findet auch Anwendung bei mildereren Formen des SLE. Mittlerweile ist bekannt, dass Chloroquin offenbar in den Signaltransduktionsweg des TLR9 eingreift, indem es durch die pH-Verschiebung in intrazellulären Lysosomen die TLR9-Aktivierung behindert<sup>101</sup>. Dies wurde allerdings bisher nur *in vitro* nachgewiesen, inwieweit dieses Wirkprinzip auch *in vivo* greift, ist nicht geklärt.

## 2 Zielsetzung

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe demonstrieren bereits, dass Komplement C4 beim Transport und der Clearance von IgM-Immunkomplexen eine besondere Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass diese Immunkomplexe an der marginalen Zone der Milz abgelagert werden und zu einer gesteigerten humoralen Immunantwort führen. Durch die Entdeckung, dass junge C4-defiziente Mäuse spontan eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von IFN $\alpha$  aufweisen und es sich bei den Interferon-produzierenden Zellen um CD11b-positive dendritische Zellen der Marginalen Zone der Milz handelt, konnte die Arbeitsgruppe außerdem bereits einen Zusammenhang zwischen Komplementdefizienz und Aktivierung des IFN $\alpha$ -Systems nachweisen<sup>27</sup>. Interessanterweise tritt diese IFN $\alpha$ -Aktivierung bereits vor ersten Anzeichen einer Autoimmunerkrankung, wie z.B. dem Nachweis von IgG-Antikörpern gegen dsDNA, auf. Basierend auf diesen Ergebnissen haben wir eine Theorie zur Entstehung von SLE entwickelt, welche beide Phänomene in sich vereint und die in dieser Arbeit weiter überprüft werden soll.

Laut dieser Hypothese kommt es durch Mangel von den frühen Komplementkomponenten C1q, C2 und C4 zu einer Akkumulation von endogener DNA, welche sich aufgrund einer ineffizienten Clearance von apoptotischen Körperchen anreichert. Die apoptotische DNA lagert sich an der Marginalen Zone der Milz ab, teilweise unter Bildung von Immunkomplexen mit natürlichen IgM-Antikörpern gegen DNA. Dort bindet sie an Dendritische Zellen (DCs) und induziert über TLR9 eine Aktivierung des IFN $\alpha$ -Systems. Denkbar wäre außerdem eine zusätzliche positive Rückkopplung, bei der IFN $\alpha$  selbst zur verstärkten Expression von TLR9 führt. Sezerniertes IFN $\alpha$  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 TLR9 und IFN $\alpha$  nicht nur eine Bedeutung in der Spätphase der Erkrankung, sondern insbesondere eine wichtige Rolle für die Entstehung von SLE.

Die Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass die Applikation von apoptotischer DNA in Wt-Mäusen, nicht jedoch in TLR9-defizienten Mäusen, bei CD11b-positiven Zellen der Marginalen Zone der murinen Milz eine IFN $\alpha$ -Produktion induziert<sup>89</sup>. Im Rahmen meiner Dissertation soll zunächst untersucht werden, ob sich dieser Effekt

auch durch die Hemmung des TLR9 durch Behandlung der Mäuse mit dem Malariamedikament Chloroquin erreichen lässt.

Des Weiteren soll ein *in vivo* Immunkomplexmodell etabliert werden, in dem verschiedene *in vitro* erzeugte DNA-Formen (mittels Ultraschall fragmentierte DNA und apoptotische DNA) in Wt-Mäuse appliziert werden. Auf mRNA-Ebene sollen anschließend die Induktion von IFN $\alpha$  sowie die Expressionen von TLR3 und TLR9 mittels Real-Time RT-PCR gemessen werden.

Zum Schluss soll die Expression von TLR3 und TLR9 bei unbehandelten, phänotypisch gesunden Mäusen verschiedener Stämme (Wt, C4 $^{-/-}$ , C4 $^{-/-}$ -IFN $\alpha$  $^{-/-}$ ) untersucht werden, um zu überprüfen, ob es bereits dort Unterschiede zu verzeichnen gibt, die evtl. als ursächlich für die bereits nachgewiesenen Unterschiede in der IFN $\alpha$ -Expression gedeutet werden könnten.

Zusammenfassend soll also überprüft werden, ob verschiedene DNA-Präparationen in der Lage sind *in vivo* IFN $\alpha$ , TLR3 oder TLR9 zu induzieren, ob die Blockade des TLR9 durch die Anwendung von Chloroquin zu einer verminderten IFN $\alpha$ -Produktion *in vivo* führt, und ob die Blockade von IFN $\alpha$  zu einer verminderten TLR9-Expression führt, was letztlich einen positiven Rückkopplungsmechanismus darstellen könnte. Insgesamt erhoffe ich mir dadurch ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge in der Frühphase des Systemischen Lupus Erythematodes.

## 3 Material

Im Folgenden sind nur diejenigen Materialien aufgeführt, die zusätzlich zur Standard-Laboraausstattung verwendet wurden.

### 3.1 Mäuse

Verwendet wurden Wildtyp (Wt), Komplement C4-defiziente (C4<sup>-/-</sup>) und Interferon-Rezeptor-defiziente (IFNR<sup>-/-</sup>) Mäuse vom Stamm C57BL/6 (*Charles River Laboratories, Wilmington/USA*). Die IFNR<sup>-/-</sup> Mäuse wurden uns freundlicherweise vom DKFZ Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Die Tierversuchsanträge für dieses Projekt gemäß den Anträgen mit den Nummern 29/c/04 vom 01.04.04 bis zum 30.06.06, 29/d/05 vom 03.01.05 bis zum 30.04.07 und 29/e/07 vom 01.05.07 bis zum 31.05.09 wurden durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

### 3.2 Geräte

- Coulter Counter ACT8 (*Beckman Coulter, Krefeld*)
- Diaplan Lichtmikroskop (*Leitz, Stuttgart*)
- Digitalkamera Canon EOS 10D (*Canon Inc., Tokyo/Japan*)
- Digitalkamera Leica DC350F (*Leica, Bensheim*)
- Durchflusszytometer Cytomics FC 500 (*Beckman Coulter, Krefeld*)
- Gefriermikrotom Kryostat CM 1850 (*Leica, Bensheim*)
- Magnetic cell separator MACS (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*)
- TaqMan Typ 7700 (*Applied Biosystems, Weiterstadt*)

### 3.3 Zellkulturmedien und –zusätze

- Fetales Kälberserum (FCS), Mycoplex (*PAA Laboratories Inc., Österreich*)
- Kulturmedium IMDM (*BioWhittacker, Heidelberg*)
- L- Glutamin (*BioWhittacker, Heidelberg*)
- 2-Mercaptoethanol (*Merck, Darmstadt*)
- Natrium-Pyruvat (*BioWhittacker, Heidelberg*)
- Non-essential amino acids (NEAA) (*BioWhittacker, Cambrex, Belgien*)

- PenStrep (Penicillin 10000 E/ml, Streptomycin 10000 µg/ml) (*PAA Laboratories Inc., Österreich*)

### 3.4 Chemikalien und Reagenzien

- Chloroquin (*Resochin, Bayer AG, Leverkusen*)
- Crystal /Mount Eindeckmedium (*Biomedica USA*)
- Di-ethylpyrocarbonat (DEPC) (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (*PAA Laboratories Inc., Österreich*)
- Fast Blue BB Base (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Ficoll (*Biosearch Technologies, USA*)
- humanes Albumin (*DRK Blutspendedienst, Springe*)
- Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte (*Leica instruments, Nussloch*)
- Levamisole (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Naphthol AS-MX Phosphate (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Natriumcitrat 4 % (ACDA) (*Baxter, München*)
- N,N-Dimethylformamide (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

### 3.5 Antikörper

Alle nicht anderweitig gekennzeichneten Antikörper stammen von der Firma Pharmingen, San Diego/USA.

#### Unkonjugiert:

- Ratte anti-Maus IgG2b CD 16/32. (Fc-Block) [Klon2.4G2]

#### Markierung mit alkalischer Phosphatase:

- Avidin (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

#### Markierung mit Biotin (bio):

- FDC M2 Ratte anti-Maus IgG2a (*ImmunoKontakt, Frankfurt*)

Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC):

- Hamster anti-Maus IgG1 CD11c [Klon HL3 ]
- Ratte anti-Maus CD11b [Klon M1/70]

Markierung mit magnetischen Beads:

- CD11b-Beads (*Miltenyi Biotec, Weilheim*)
- CD11c-Beads (*Miltenyi Biotec, Weilheim*)

**3.6 Primer und Sonden**Primersequenz (TIB Molbiol, Berlin)<sup>27</sup>:

Sequenz IFN  $\alpha$  Forward-Primer 5' CCT gAg AgA gAA gAA ACA CAg C  
 Sequenz IFN  $\alpha$  Reverse-Primer I 5' CAA gTT ggC TgA ggA AgA SA  
 Sequenz IFN  $\alpha$  Reverse-Primer II 5' Cag CAA gTT AAC TgA ggA AgA CA

Sondensequenz von ABI (Applied Biosystems, Weiterstadt):

Sequenz IFN  $\alpha$  5' FAM-CTg TgC CTg ggA ggT ggT CAg AgC-TAMRA

Gebrauchsfertige Sonden/Primer-Kits von ABI (Applied Biosystems, Weiterstadt):

- Rodent GAPDH Control VIC Probe (4308313)
- TLR3 Mix (*Mm01207404\_m1*)
- TLR9 Mix (*Mm00446193\_m1*)

**3.7 Lösungen und Kits (gebrauchsfertig)**

- DNA-free-Kit (*Ambion, Austin/USA*)
- DNeasy DNA-Tissue-Isolations Kit (*Qiagen GmbH, Hilden*)
- In situ cell Death Detection Kit (*Roche, Indianapolis/USA*)
- Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077 (*PAA PAA Laboratories, Pasching/Österreich*)
- One-Step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (*Applied Biosystems, Weiterstadt*)
- RNeasy RNA-Isolations Kit (*Qiagen GmbH, Hilden*)
- Tissue-Tek Ornithincarbamoyltransferase (*Miles, Naperville/USA*)

### 3.8 Zelllinien

Es wurde die Zelllinie WEHI 231 verwendet, Zellen eines B-Zelllymphoms der Maus (BALB/c x NZB), welches durch Mineralölinjektion induziert wurde.

Nährmedium ist IMDM mit 25 mM HEPES (BioWhittaker, Cambrex, Belgien) mit den Zusätzen 10 % FCS (*PAA Laboratories, Pasching/Österreich*), 1% PenStrep (*BioWhittaker, Cambrex, Belgien*), 1 % L-Glutamin (*BioWhittaker, Cambrex, Belgien*), 1 % NEAA (*BioWhittaker, Cambrex, Belgien*), 1 % Natrium-Pyruvat (*BioWhittaker, Cambrex, Belgien*) und 0,0004 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt. Der Mediumswechsel erfolgt zweimal pro Woche, die Kulturdauer beträgt höchstens 6 Monate.

## 4 Methoden

### 4.1 Immunhistochemie

#### 4.1.1 Beschichtung der Objektträger

Die Objektträger werden vor Benutzung für 10 Min. in eiskaltes Aceton getaucht, für 15 Min. getrocknet, dann 10 Min. lang mit 0,01 % Poly-L-Lysin (in Aqua bidest.) beschichtet und anschließend wiederum getrocknet.

#### 4.1.2 Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern

Die der Maus entnommenen Gewebe werden in Einbettmedium (*Tissue-Tek*) platziert und bei - 80° C eingefroren.

Das Schneiden der Gewebe erfolgt mittels Mikrotom (*LEICA CM 1850*), welches auf eine Temperatur von - 20° C gekühlt wird. Die Schnittdicke der Gewebe beträgt 7 µm. Die Gefrierschnitte werden auf die beschichteten Objektträger gebracht und 1 h getrocknet. Anschließend werden sie für 10 Min. in eiskaltem Aceton fixiert und wiederum 1 h luftgetrocknet. Danach können sie bei - 20° C eingefroren und gelagert werden.

#### 4.1.3 Färbungen

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen können auf den Gefrierschnitten spezifische Antigene lokalisiert werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Darstellung, wie die direkte oder indirekte Methode.

Bei der direkten Methode bindet ein spezifischer, konjugierter Antikörper (mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Horseradish Peroxidase (HRP) konjugiert) direkt an ein Gewebeantigen. Bei der indirekten Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Gewebeantigen und mit Hilfe eines Sekundärantikörpers (alkalische Phosphatase oder Horseradish Peroxidase konjugiert), welcher den Primärantikörper erkennt, wird das Gewebeantigen lokalisiert. Sollte der Primärantikörper Biotin-konjugiert sein, so ist mit Hilfe von Avidin als Sekundärantikörper (AP oder HRP konjugiert) ein Nachweis möglich.

Bei allen Methoden entsteht durch Substratumsetzung letztendlich ein gefärbtes Endprodukt.

Die Aufnahmen der Färbungen wurden mit einer Digitalkamera fotografiert und mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (*Adobe, Mountain View, CA, USA*) bearbeitet.

**Waschpuffer**

PBS

**Blockierungspuffer**

PBS/ Tween 0,05 %/ BSA 1 %

**Primärantikörper (AP oder HRP konjugiert bzw. Biotin oder FITC konjugiert)**

1:500 bis 1:1000 in Blockierungspuffer

**Sekundärantikörper (nur bei Biotin- oder FITC-markiertem Primärantikörper)**

1:500 bis 1:1000 in Blockierungspuffer

**Alkalische Phosphatase - Substrat**

Naphthol AS-MX Phosphate

N,N-Dimethylformamide

0,1 M Tris-Puffer

12,1 g (Tris-[ hydroxymethyl ]-aminomethan)

ad 1 Liter Aqua bidest.

pH 8,5

Fast Blue BB Base}

2N HCl

4 % Natriumnitrat

Levamisole

**Horseradish Peroxidase - Substrat**

AEC-Lösung

400 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

ad 25 ml N,N Dimethylformamide

Lichtgeschützt aufbewahren!

0,05 M Natriumacetat-Puffer:

3,4 g Natriumacetat

ad 500 ml Aqua bidest.

pH 5,0

Hydrogenperoxid, 30 % (w/w) (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)**Eindeckmedium**Crystal/Mount (*Biomedica Corp. Foster City/USA*)

#### 4.1.3.1 Zweifarben-Färbung

Bei der Zweifarben-Färbung können gleichzeitig zwei unterschiedliche Antigenstrukturen nachgewiesen werden.

Diese Färbung kann dafür genutzt werden, den Genotyp der C4-/-IFR-/- Zucht zu überprüfen.

- Objektträger auf RT erwärmen und trocknen lassen
- Schnitte mit Liquid-Blocker PAP-Pen umranden und 15min trocknen lassen
- 10 Min auf dem Schüttler in PBS waschen
- 10 Min auf dem Schüttler in PBS/Tween/BSA [1 %] waschen
- Objektträger in eine Feuchtkammer legen
- Primärantikörper (FDC M2 Bio) 1:100 in PBS/Tween/BSA verdünnen, 100 µl pro Schnitt
- 1h im Dunkeln bei RT inkubieren
- Waschen 1x in PBS, 2x in PBS/Tween/BSA, je 5 Min
- HRP 1:100 und Sekundärantikörper (Avidin-AP) 1:1000 verdünnen in PBS/Tween/BSA
- 1h im Dunkeln bei RT inkubieren
- dreimal in PBS waschen
- Substratentwicklung:

##### Fast Blue BB Base (Detektion der Alkalischen Phosphatase)

Farbe: Blau

- 5 mg Naphthol AS-MX Phosphat in 250 µl N,N Dimethylformamid lösen
- Die Lösung zu 40 ml Tris-Puffer hinzufügen
- 10 mg Fast Blue BB Base in 250 µl 2 N HCl lösen, 250 µl 4 % Natriumnitrat hinzufügen und für 2 Min. bei Raumtemperatur inkubieren, dann die Lösung sehr langsam zu der 40 ml Tris-Puffer-Lösung zugeben
- 10 mg Levamisole (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) hinzufügen, um die endogene Alkalische Phosphatase-Aktivität zu inhibieren
- Filtern der Lösung (Filter mit 0,45 µm Porengröße, *Schleicher & Schuell, Dassel*)
- Objektträger im Dunkeln mit der Lösung für 1h bei RT inkubieren (Sichtkontrolle auf eventuelle Überfärbung!)
- dreimal in PBS waschen

##### AEC (Detektion der Horseradish Peroxidase)

Farbe: Rot

- 250 µl AEC-Lösung zu 9,75 ml 0,05 M Natriumacetat-Puffer geben

- Lösung filtern; lichtgeschützt aufbewahren
- vor Gebrauch 5 µl 30 % Hydrogenperoxid zugeben, um endogene Peroxidase-Aktivität zu verhindern; gut mischen
- im Dunkeln Objektträger für 30 Min. (Kontrolle auf eventuelle Überfärbung!) mit der Lösung inkubieren
- zweimal in PBS waschen
- 3 bis 5 Tropfen Crystal/Mount zur Einbettung auf den noch feuchten Schnitt geben, über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen

## 4.2 Nachweis von apoptotischer DNA

### 4.2.1 Nachweis in WEHI 231-Zellkultur: TUNEL Durchflusszytometrie

Für die Herstellung von apoptotischer DNA wurde die Apoptose von WEHI 231-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24h in PBS mittels der TUNEL-Methode (Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase dUTP Nick End Labeling) kontrolliert. Es wurden dazu die entstehenden Strangbrüche in apoptotischen Zellen nachgewiesen, indem die TdT (Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase) dUTPs an die freien 3'OH-Enden knüpft. Die Nukleotide sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC) konjugiert, so dass sich ihre Bindung an die DNA im Durchflusszytometer detektiert lässt.

#### Puffer und Lösungen

- PBS
- PFA (4 %)
  - 1g Paraformaldehyd
  - Ad 25 ml PBS
  - Bei 37 °C lösen
- Triton X 100
  - 1 g Natriumcitrat
  - 100 ml Triton X 100
  - Ad 1 l Aqua dest.
- TUNEL-Kit (*Roche*) Enzym und Labelsolution 1:10

### Durchführung

- $4 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz
- Zellen herunter zentrifugieren, 1200 U/min, 10 Min.
- Waschen in 1 ml PBS, 2000 U/min, 10 Min.
- Fixieren in 1 ml PFA, RT
- 2x Waschen mit PBS, 2000 U/min, 10 Min.
- Zellen perforieren mit 100  $\mu$ l Triton X 100, 2 Min auf Eis
- 1x Waschen 5 Min., 1x Waschen 10 Min. mit PBS
- 50  $\mu$ l TUNEL-Reagenz (1:10), Inkubation für 1h, 37 °C
- 2x Waschen
- Messung

### 4.2.2 Nachweis im Serum: Gel-Elektrophorese

Mittels Gel-Elektrophorese lässt sich apoptotische DNA qualitativ im Serum nachweisen. Charakteristisch ist das Bild des so genannten Laddering, welches auf dem Schneiden der DNA in Nukleosomeneinheiten unterschiedliche Länge durch Endonukleasen beruht.

### 4.3 Applikation von DNA

Apoptotische DNA wurde aus der Hybridomzelllinie WEHI 231 nach einem 24-stündigen Intervall in einem Medium ohne Nährstoffe (in PBS) gewonnen. Die Apoptose wurde mittels eines FACS-TUNEL Assays (*Boehringer*) überprüft (siehe 4.2.1) (> 90% TUNEL-positive Zellen), sowie Laddering in der Gel-Elektrophorese (siehe 4.2.2).

Native DNA wurde aus intakten Zellen isoliert und mittels Ultraschall fragmentiert. Die DNA-Isolierung erfolgte mittels des DNeasy Kit (*Qiagen*).

Die verschiedenen DNA-Aufreinigungen wurden in PBS gelöst (4  $\mu$ g DNA in 150  $\mu$ l) und intravenös (i.v.) nach Erwärmung unter Rotlicht, ohne Narkose, in die Schwanzvene der Mäuse (sterile Kanüle 0,45x13 mm) appliziert. 6 Stunden nach Immunisierung erfolgte die Aufreinigung der Milzzellen.

#### 4.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus der Milz

Die Separation (Ficollierung) mononukleärer Zellen erfolgt nach dem Prinzip der Dichtezentrifugation. Zellen mit höherer Dichte, wie z.B. Erythrozyten, sammeln sich in der Ficoll-Zone während sich Zellen niedriger Dichte in der Interphase anreichern.

##### Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077

#### 4.5 Separation mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Isolierung

- Milz zwischen zwei Objektträgern (beschichtete Seite) zerreiben und in 7 ml PBS aufnehmen
- Zellsuspension durch ein 40 µM Nylon-Zellsieb geben
- 5 ml Ficoll-Separationsmedium vorlegen und Zellsuspension vorsichtig darüber schichten
- Zentrifugation 1200 rpm, 4° C, 20 Min.
- Anschließend die in der Interphase befindlichen mononukleären Targetzellen in ein neues Röhrchen überführen
- 1x mit eiskaltem PBS auffüllen und 10 Min. bei RT 1200 rpm zentrifugieren (Zellen waschen)
- Überstand verwerfen

#### 4.6 Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen

Durch sogenannte magnetische Beads, die an Antikörper gekoppelt sind, können Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker separiert werden. Der eigentliche Aufreinigungsschritt erfolgt über spezielle Säulen und einen Magneten. Die verwendeten Antikörper-Beads wurden von der Firma Miltenyi (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*) bezogen.

##### MACS-Puffer:

- 500 ml PBS
- 0,4 % Natrium-Citrat
- 1 % humanes Albumin
- sterilfiltriert

### **Beads-Aufreinigung**

- Zellpellet (siehe Aufreinigung mononukleärer Zellen) in 5 ml eiskaltem MACS-Puffer aufnehmen, resuspendieren und ein Aliquot von 500 µl zur Bestimmung der Zellzahl am Coulter Counter abnehmen
- Zellsuspension 10 Min. bei RT und 1200 rpm zentrifugieren (Zellen waschen)
- Überstand verwerfen, Zellen in Restflüssigkeit resuspendieren und in ein Microtube überführen
- Zugabe von 0,25 µg Fc-Block (CD16/32 purified)/1 Million Zellen, 10 Min. auf Eis inkubieren
- Anschließend direkt Zugabe von 10 µl Antikörper-Beads/10<sup>7</sup> Zellen, 15 Min. bei 10°C inkubieren
- Mit MACS-Puffer waschen (10 Min. bei 1600 rpm zentrifugieren)
- Überstand verwerfen
- Zellen danach in 500 µl MACS-Puffer aufnehmen
- Säule mit 500 µl MACS-Puffer vorseülen
- Zellsuspension auf die Säule geben und mit 2 ml MACS-Puffer nachspülen, ergibt Negativ-Fraktion
- Die Säule vom Magneten entfernen und die positiven Zellen mit 1 ml MACS-Puffer eluieren
- Nach der ersten Säule die eluierten Zellen auf eine zweite Säule geben, erneut mit 2 ml Puffer waschen und abschließend mit 1 ml MACS-Puffer eluieren
- Kontrolle der Reinheit am Durchflusszytometer (FACS)

## **4.7 Reinheitsmessung am Durchflusszytometer**

Die Durchflusszytometrie stellt ein optisches Messsystem für einzelne, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar und basiert auf dem Prinzip der Fluorochromierung, d.h. der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Das Anwenderspektrum reicht von Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis hin zu funktionellen Untersuchungen, wie z.B. intrazelluläre Stoffwechselforgänge.

Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen FITC- oder PE-markierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Oberflächenmarker inkubiert. Durch Einsatz entsprechender Marker und anschließender Messung der isolierten Zellsuspension, können Zelltyp und das Maß an Verunreinigungen (z.B. B- und T-Zellen bei einer CD11b-Aufreinigung) gemessen werden.

**Reinheitsüberprüfung:**

- 5 – 10 µl FITC-Antikörper
- 10 Min. Inkubation bei RT
- 5 Min. bei 1600 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen in 300 – 500 µl PBS aufnehmen

Es erfolgt eine Einfarbmessung am Durchflusszytometer, wobei jeweils 10.000 Zellen untersucht wurden.

## 4.8 RNA-Isolierung aus Zellen

Die RNA-Isolierung erfolgt mittels Qiagen RNeasy Kit. Die Herstellung der Lösungen und Puffer sowie die Durchführung erfolgten nach Protokoll des Herstellers.

## 4.9 DNA-Verdau

Die isolierte RNA wird von genomischer DNA durch Verdauung dieser mittels des DNA-free Kits befreit, da sie andernfalls zu einer Verfälschung der RT-PCR führen könnte. Das Protokoll des Herstellers richtet sich nach der vorhandenen RNA-Menge.

**DNA-Verdau mit dem DNA-free Kit**

- 0,1 Volumen DNase I Puffer und 1-2 µl DNase I (je nach Zellmenge) zu der RNA hinzufügen, mixen und 45 Min. bei 37 °C inkubieren
- 0,1 Volumen DNase Inactivation Reagent hinzufügen, mixen und 2 Min. bei RT inkubieren
- 1 Min. bei 10.000 g zentrifugieren
- Überstand mit der RNA von dem DNase Inactivation Reagent-Pellet abpipettieren und in ein neues Tube überführen

## 4.10 Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration mit dem Photometer

Die Proteinkonzentration kann mittels Spektrographie bestimmt werden. Diese ist dabei in guter Näherung nach folgender Formel photometrisch gut bestimmbar (Johnstone und Thorp, 1996):

DNA-/RNA-Konzentration (ng/ $\mu$ l) = [Abs(260 nm) – Abs(320 nm)] x OD RNA bzw. DNA x Verdünnungsfaktor

OD<sub>DNA</sub> = 50, OD<sub>RNA</sub> = 40

## 4.11 Real-Time RT PCR

Die Real-time RT (Reverse Transkriptase)-PCR erlaubt eine relative Quantifizierung der mRNA. Dazu wird der Abbau einer fluorogenen Sonde gemessen. Diese spezielle Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff und blockierendem Phosphatrest markiert. Durch die räumliche Nähe zum Quencher wird bei der intakten Sonde trotz Anregung des Reporter-Farbstoffes die Fluoreszenz unterdrückt. Durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Ampli Taq Polymerase wird die hybridisierte Sonde geschnitten und die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter wird unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch. Die Veränderungen der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe werden mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector (*Applied Biosystems, Weiterstadt*) im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.

Aus den isolierten Zellen (siehe 4.5) wurde mRNA gewonnen (siehe 4.8) und die Expression von TLR3 und TLR9 mittels RT-PCR quantifiziert.

### RNasefreies Wasser

- 1  $\mu$ l Di-ethylpyrocarbonat pro 1 ml Wasser
- 12 h bei 37°C inkubieren
- autoklavieren (120°C, 20 Min.)

**PCR-Mastermix (Menge je Probe) für IFN $\alpha$  (steril)**

• 2x Master Mix	25 $\mu$ l
• Multiscribe/RNase Inhibitor	1,25 $\mu$ l
• Forward-Primer IFN $\alpha$ 20 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l
• Reverse-Primer I IFN $\alpha$ 20 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l
• Reverse-Primer II IFN $\alpha$ 20 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l
• Sonde IFN $\alpha$ 5 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Primer I	0,2 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Primer II	0,2 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Sonde	0,2 $\mu$ l
• MgCL <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ l
• Wasser (RNasefrei)	7,6 $\mu$ l

**PCR-Mastermix (Menge je Probe) für TLR3 (steril)**

• 2x Master Mix	12,50 $\mu$ l
• Gebrauchsfertiger Sonde/Primer Mix TLR3	0,15 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Primer I	0,125 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Primer II	0,125 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Sonde	0,125 $\mu$ l
• MgCL <sub>2</sub> 25 mM	2,00 $\mu$ l
• Wasser (RNasefrei)	4,35 $\mu$ l

**PCR-Mastermix (Menge je Tube) für TLR9 (steril)**

• 2x Master Mix	12,50 $\mu$ l
• Multiscribe/RNase Inhibitor	0,63 $\mu$ l
• Gebrauchsfertiger Sonde/Primer Mix TLR9 (1:2 Verdünnung)	0,25 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Primer I	0,10 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Primer II	0,10 $\mu$ l
• Rodent GAPDH Sonde	0,10 $\mu$ l
• MgCL <sub>2</sub> 25 mM	2,00 $\mu$ l
• Wasser (RNasefrei)	4,33 $\mu$ l

**GAPDH-Kontrolle im separaten PCR-Tube**

- 2x Master Mix 25 µl
- Multiscribe/RNase Inhibitor 1,25 µl
- Rodent GAPDH Primer I 0,3 µl
- Rodent GAPDH Primer II 0,3 µl
- Rodent GAPDH Sonde 0,3 µl
- MgCL<sub>2</sub> 25 mM 2 µl
- Wasser (RNasefrei) 10,85 µl

**RT-PCR**

- Ansatz pro tube:

PCR-Mastermix 20 µl

Bei der IFN $\alpha$ -, TLR3- und TLR9-PCR:

RNA-Probe (c=5 ng/1µl) 5 µl

- Thermocycler-Konditionen für IFN  $\alpha$ :

Hold	50°C	0:05 Min.	
Hold	48°C	30:00 Min.	
Hold	95°C	10:00 Min.	
Cycle	95°C	0:15 Min.	
	62°C	1:00 Min.	45x

- Thermocycler-Konditionen für TLR3:

Hold	48°C	30:00 Min.	
Hold	95°C	10:00 Min.	
Cycle	95°C	0:15 Min.	
	62°C	1:00 Min.	45x

- Thermocycler-Konditionen für TLR9:

Hold	48 °C	30:00 Min.	
Hold	95 °C	10:00 Min.	
Cycle	95 °C	0:15 Min.	
	60 °C	1:00 Min.	45x

Zur Überprüfung des erfolgreichen DNA-Verdaus wird in einem Doppelansatz die Multiscribe/RNase Inhibitor (enthält die reverse Transkriptase) weggelassen. In diesem Ansatz darf es zu keiner cDNA-Bildung kommen und somit zu keinem Signal. Befindet sich noch genomische DNA im Ansatz, bewirkt diese eine Positivität. In diesem Fall wird der DNA-Verdau wiederholt und die Probe erneut gemessen.

## 4.12 Relative Quantifizierung der RT-PCR

Bei dieser Form der Quantifizierung soll die Zielsequenz (TLR3, TLR9) relativ in ihrer Expression zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz bestimmt werden. Dabei wird die unbekannte Menge der Zielsequenz semiquantitativ bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz. Als Standard dient das sogenannte Housekeeping-Gen GAPDH (murine Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase).

Für die experimentellen Proben wurde die Ausgangsmenge der Zielsequenz über eine Standardkurve bestimmt und dann durch die Ausgangskopienzahl des Kalibrators (z.B. Wildtyp unbehandelt) dividiert. Der Kalibrator wird dadurch zum 1x-Wert und die unbekanntenen Proben werden als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator bestimmt.

### 4.12.1 Vergleichende CT-Methode ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Sind die Effizienzen für beide Amplicons ungefähr gleich, so nähert sich die Steigung der Geraden 0. Mit Hilfe dieser Vorexperimente kann bei Anwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode gezeigt werden, dass die Effizienzen beider Reaktionen von Zielsequenz und Referenz ungefähr gleich sind. Dabei sollte der absolute Wert der Steigung des Graphen  $<0,1$  sein. Kann dies gezeigt werden, so kann die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewandt werden, ohne dass eine Standardkurve generiert werden muss. Im Folgenden sind die absoluten Werte der Steigung des Graphen für die verschiedenen PCR-Ansätze aufgelistet:

IFN $\alpha$	[0,028]
TLR3	[-0,004712]
TLR9	[0,0128]

Alle Werte sind  $<0,1$ , somit war die Generierung einer Standardkurve nicht notwendig.

## 4.13 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse sowie die Berechnungen der Mediane und 5%- bzw. 95%-Quantile wurden mit GraphPad durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben ermittelt. Dabei wird ein p-Wert unter 0,05 als signifikant betrachtet.

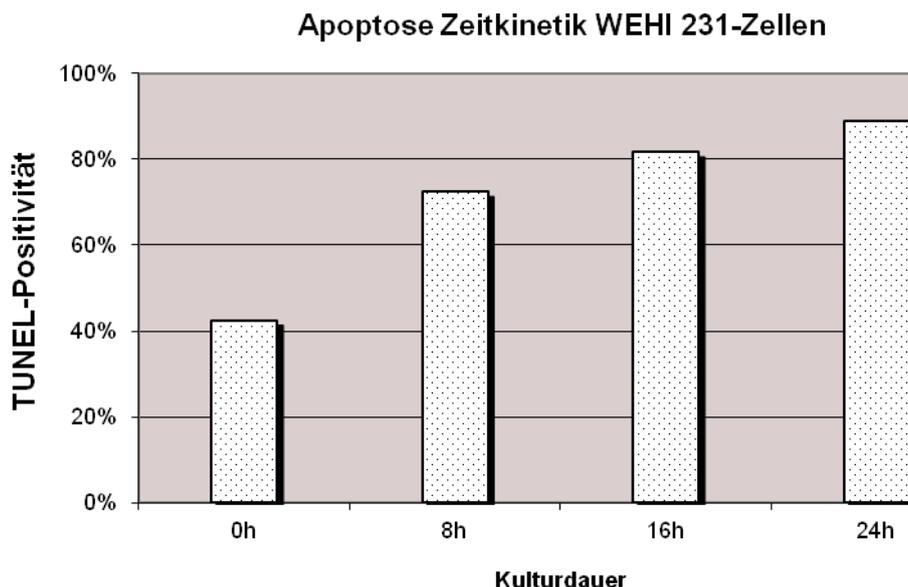
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nachweis von TLR9- und TLR3-mRNA in CD11b- und CD11c-positiven Zellen der murinen Milz nach Behandlung mit apoptotischer DNA

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits die Abhängigkeit der IFN $\alpha$ -Induktion durch apoptotische DNA vom TLR9 nachgewiesen werden. Es sollte nun *in vivo* der Einfluss von *in vitro* hergestellter DNA auf die Expression dieses TLR9-Rezeptors auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR untersucht werden. Dazu wurden Wt-Mäusen 4  $\mu$ g apoptotische DNA bzw. Ultraschall-fragmentierte (US-) DNA in einem Volumen von 100  $\mu$ l intravenös verabreicht. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden (h) wurden die Mäuse getötet und jeweils die Milz entnommen. Es erfolgte die Zellisolierung nach CD11b- oder CD11c-positiven Zellen (siehe 4.6 auf Seite 38), welche bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als die IFN $\alpha$ -Produzenten unseres Immunkomplex-Modells identifiziert wurden. Anschließend wurde mRNA isoliert (siehe Abschnitt 4.8 auf Seite 40) und die Expression von TLR9 mRNA mittels Real-time RT-PCR quantifiziert (siehe 4.11 auf Seite 41). Zusätzlich wurde die mRNA-Expression des TLR3 gemessen, welcher zwar RNA bindet, jedoch ebenfalls die Produktion von Typ-I-Interferonen vermittelt. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse der CD11b- bzw. CD11c-positiven Zellen unbehandelter Wt-Mäuse auf 1 gesetzt und dazu im Verhältnis die der behandelten Mäuse mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (siehe 4.12.1 auf Seite 44) berechnet.

#### 5.1.1 Kontrolle der Apoptose-Rate von PBS-induzierter Apoptose bei WEHI-231 Zellen im Durchflussfluoreszenzzytometer

WEHI-231 Zellen wurden für die Herstellung von apoptotischer DNA zwischen 0h und 24h in PBS kultiviert und die Apoptose-Rate im Durchflusszytometer kontrolliert. Die natürliche Apoptose-Rate, d.h. die Anzahl TUNEL-positiver Zellen unter den üblichen Zellkultur-Konditionen im Medium, lag bei 42,5%. Mit steigender Kulturdauer in PBS nahm die TUNEL-Positivität zu, nach 24 Stunden wurde die höchste Apoptose-Rate mit 89% gemessen (**Abb. 4**)



**Abb. 4: Apoptose-Zeitkinetik von WEHI 231-Zellen: TUNEL-Positivität einer Langzeitkultur in PBS im Durchflusszytometer.**

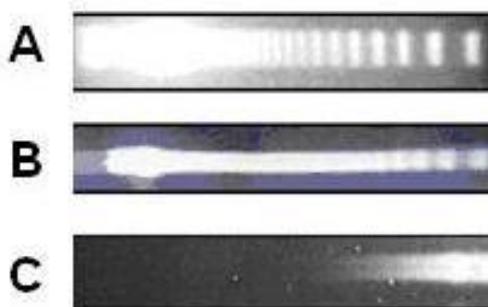
*Mit steigender Kulturdauer nahm die TUNEL-Positivität zu. Unter physiologischen Konditionen in Medium waren bereits 42,5% der Zellen TUNEL-positiv, nach 24 Stunden Kultur in PBS waren 89% aller Zellen apoptotisch.*

### 5.1.2 Elektrophoretische Darstellung der DNA-Fragmente von WEHI 231-Zellen durch Apoptose oder Ultraschall (US)

Zur qualitativen Kontrolle der aus WEHI 231-Zellen isolierten DNA, wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Im frühen Stadium der Apoptose wird DNA durch Endonukleasen zu Fragmenten degradiert, so dass Nukleosomeneinheiten verschiedener Länge entstehen. In der Gel-Elektrophorese zeigt sich eine charakteristische Leiter, das so genannte Laddering (**Abb. 5**). Eine Fragmentierung von DNA durch Ultraschall führt zu einer unspezifischen Degradierung der DNA in Fragmente undefinierter Größe und zeigt somit im Gel kein Laddering.

Nach 24 Stunden Zellkultur in PBS zeigte die DNA das für apoptotische DNA charakteristische Laddering, während DNA aus physiologischer Kultur nach Ultraschallbehandlung unspezifisch degradiert erschien.

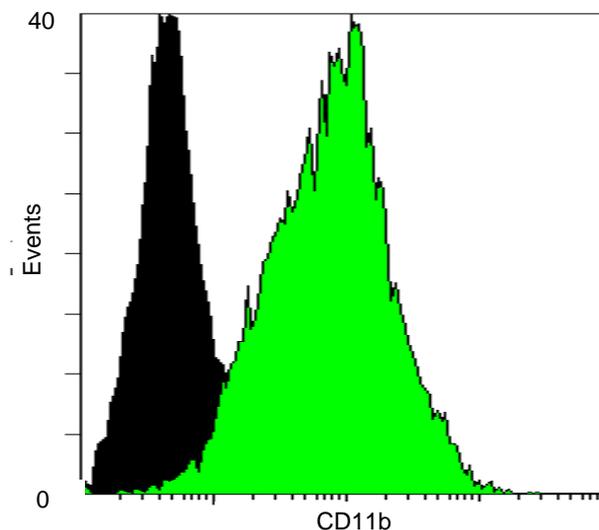


**Abb. 5: Gelelektrophoretische Darstellung von DNA aus WEHI 231-Zellen nach Apoptose oder Ultraschall.**

*DNA nach 24 Stunden Apoptose (B) zeigte eine spezifische Degradierung als Laddering von Fragmenten unterschiedlich definierter Größe. Ultraschallbehandlung (C) von DNA führte zu einer unspezifischen Fragmentierung in DNA-Stücke undefinierter Länge.*

### 5.1.3 Reinheitsprüfung mittels Durchflusszytometer

Nach jeder Aufreinigung erfolgte die Reinheitsprüfung mittels FACS-Analyse (siehe Abschnitt 4.7 auf Seite 39), wobei die Negativ-Fraktion mit der Positiv-Fraktion verglichen wurde. Es ergaben sich im Durchschnitt bei der Aufreinigung von CD11b-Zellen Reinheiten von ~90 % (**Abb. 6**), bei der Aufreinigung von CD11c-Zellen von ~75 %.



**Abb. 6: Beispiel einer Reinheitsmessung CD11b-aufgereinigter Zellen am Durchflusszytometer.**

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

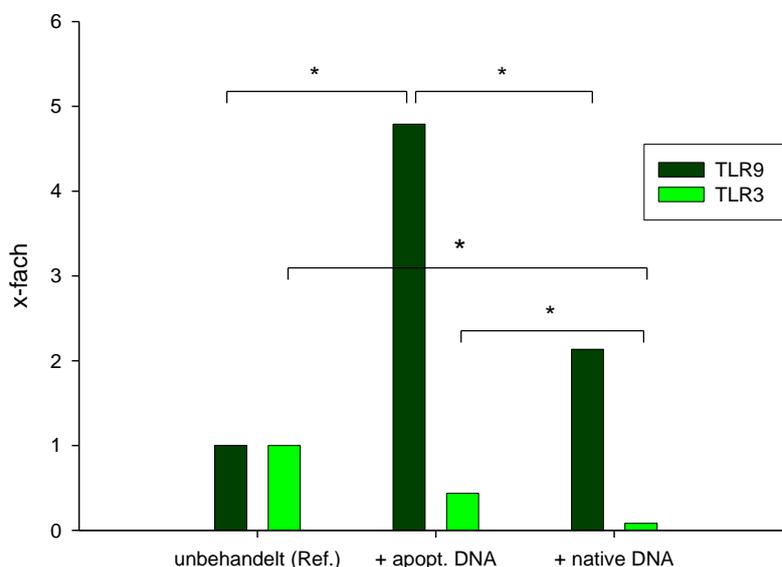
#### 5.1.4 Apoptotische DNA triggert die TLR9 mRNA-Expression in MZ-Makrophagen der Milz

In der CD11b-Population zeigte sich 6 h nach i.v.-Injektion von apoptotischer DNA kein signifikanter Einfluss auf die Expression von TLR3, da diese im Vergleich zur Expression bei unbehandelten Wt-Mäusen gleiche bzw. sogar geringere Werte zeigte. Im Gegensatz dazu ließen sich nach Behandlung signifikant fast fünffach gesteigerte Expressionen von TLR9 ermitteln (**Abb. 7**). Dieser Anstieg fand sich dabei ausschließlich in der CD11b-positiven Fraktion, die CD11b-negative Fraktion war nicht betroffen (Daten nicht dargestellt). Somit hat apoptotische DNA keinen wirklichen Effekt auf die Expression von TLR3 mRNA, führt jedoch bei für die IFN $\alpha$ -Produktion verantwortlichen CD11b-positiven Zellen zu einer erhöhten Expression von TLR9 mRNA. Bei der Betrachtung von einzelnen Mauswerten, welche keiner Gaußschen Normalverteilung unterliegen, zeigt sich, dass die Mehrheit der mit apoptotischer DNA behandelten Mäuse im Vergleich zum Median der unbehandelten Mäuse gleiche oder sogar niedrigere Level von TLR3 exprimierten. Im Vergleich dazu exprimierten fast alle getesteten, mit apoptotischer DNA behandelten Mäuse mehr TLR9 mRNA als der Median der unbehandelten Tiere (**Abb. 7**).

Nach Behandlung mit US-DNA ließ sich eine mehr etwa doppelt so hohe Expression von TLR9 mRNA im Vergleich zur Referenz nachweisen, welche im Vergleich zu mit apoptotischer DNA behandelten Mäusen, nicht jedoch zur Referenz signifikant war.

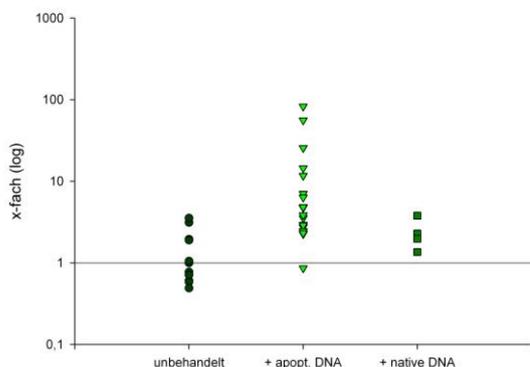
A

TLR9/3-Expression nach Behandlung mit 4 µg DNA i.v. 6h  
CD11b-Aufreinigung



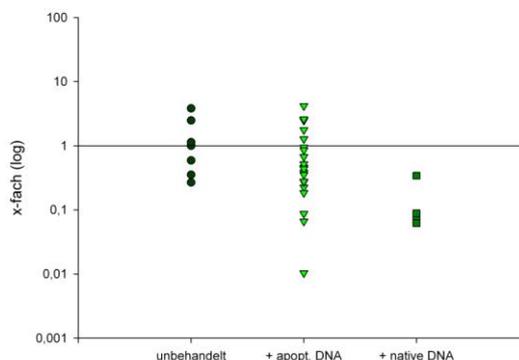
B

TLR9 mRNA bei CD11b+ Zellen  
nach Behandlung mit DNA in Wt-Mäusen



C

TLR3 mRNA in CD11b+ Zellen  
nach Behandlung mit DNA in Wt-Mäusen



**Abb. 7: Expression von TLR9/3 CD11b-positiver Zellen nach Behandlung von Wt-Mäusen mit 4 µg DNA**

Dargestellt sind die medianen Werte (A) der relativen Werte der Expressionen von TLR9 und TLR3 mRNA im Vergleich zur Referenz, sowie die einzelnen relativen Werte der Expressionen von TLR9 (B) und TLR3 (C) mRNA.

Die Applikation von 4 µg apoptotischer DNA führte nach 6h in Wt-Mäusen zu einer signifikanten (\*) 4,79-fachen Expressionssteigerung von TLR9 mRNA (A: dunkelgrün) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. Bei Behandlung mit US-DNA kam es zu einer Steigerung der TLR9 mRNA-Expression um 2,13, welche im Vergleich zur Referenz nicht, im Vergleich zu mit apoptotischer DNA behandelten Mäusen jedoch signifikant war. Die Expression von TLR3 (A: hellgrün) sank nach Behandlung mit apopt. DNA auf das 0,48-fache der Referenz und nach US-DNA auf das 0,09-fache. Signifikant war dort jeweils die Behandlung mit US-DNA im Vergleich zu unbehandelten als auch zu mit apopt. DNA behandelten Mäusen.

## A

TLR9 bei Wt-Mäusen	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	* p	
Unbehandelt (Referenz)	1,0	0,54	3,32		
+ apoptotische DNA	4,79	2,195	57,43	*0,0002	
+ US-DNA	2,13	1,45	3,56	0,078	*0,033

## B

TLR3 bei Wt-Mäusen	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	* p	
Unbehandelt (Referenz)	1,0	0,30	3,29		
+ apoptotische DNA	0,48	0,08	2,89	0,342	
+ US-DNA	0,09	0,07	0,34	*0,025	*0,035

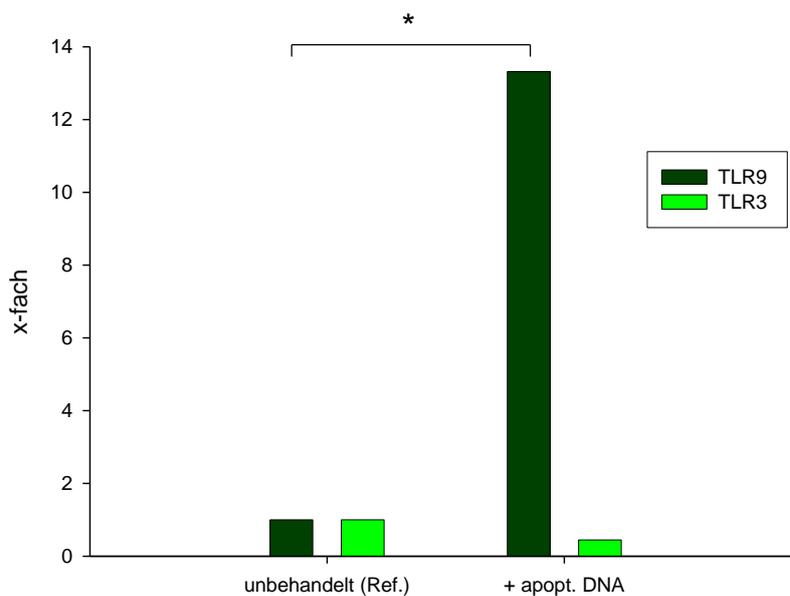
**Tab. 5:** Darstellung des Medianes der relativen Werte für TLR9 (A) und TLR3 (B) von CD11b+ Zellen aus unbehandelten Wt-Mäusen sowie nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA bzw. nativer DNA.

Die Mediane der  $\Delta C_T$ -Werte für TLR9 (n=11) und TLR3 (n=9) unbehandelter Mäuse wurde jeweils als Referenz 1,0 gesetzt. Die relativen Werte von TLR9 (n=20, n=4) und TLR3 (n=21, n=4) nach Applikation von 4µg apoptotischer bzw. nativer DNA stellen 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 im Bezug auf die Referenz bzw. auf die Behandlung mit apopt. DNA.

In der CD11c-Population zeigte sich nach i.v.-Injektion von apoptotischer DNA ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf die Expression von TLR3 mRNA, diese war im Vergleich zur Referenz auf das 0,45-fache verringert. In der CD11c-positiven Fraktion hingegen ließ sich ein signifikanter Anstieg der Expression von TLR9 mRNA um das 13,32-fache ermitteln (**Abb. 8**).

Beim Vergleich einzelner Mauswerte (**Abb. 9**) zeigte sich, dass alle CD11c+ Zellen mehr TLR9 mRNA als die Referenz, jedoch weniger TLR3 mRNA exprimierten. Dabei liegen die Werte von TLR9 zu 90% bei unbehandelten Mäusen in einem Intervall von 0,34 und 8,04, bei behandelten Mäusen zwischen 2,00 und 28,99. Die Werte für TLR3 liegen zu 90% bei unbehandelten Mäusen zwischen 0,10 und 13,20 und bei Mäusen nach Applikation von apopt. DNA zwischen 0,23 und 0,64.

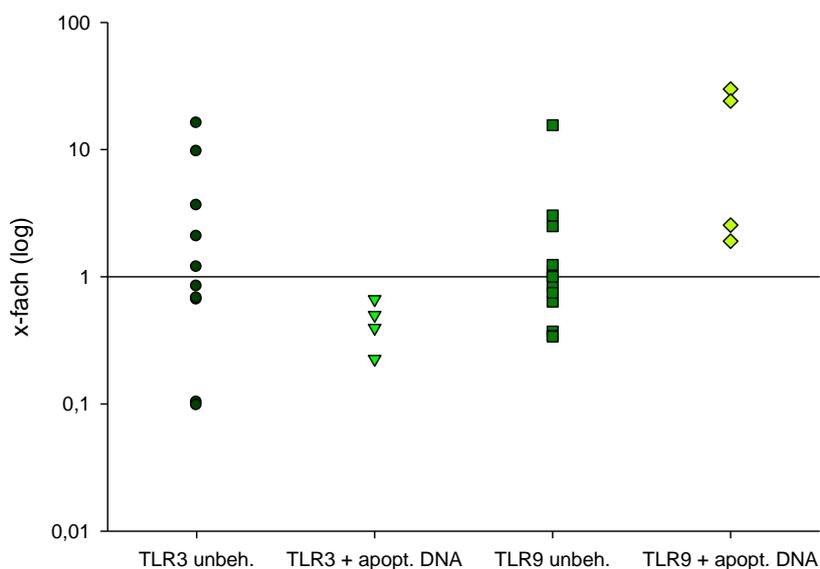
TLR9/3-Expression nach Behandlung mit 4 µg DNA i.v. 6h  
CD11c+ Zellen



**Abb. 8: Expression von TLR9/3 CD11c-positiver Zellen nach Behandlung von Wt-Mäusen mit 4 µg DNA**

6 h nach Applikation von 4 µg apoptotischer DNA i.v. zeigen CD11b+ Zellen eine signifikante, 13,32-fach gesteigerte Expression von TLR9 mRNA im Vergleich zur Referenz, die TLR3 mRNA-Expression ist im Vergleich zur Referenz auf das 0,45-fache vermindert.

einzelne Expressionen von TLR3/9 mRNA in CD11c+ Mäusen  
nach Behandlung mit apopt. DNA



**Abb. 9: TLR9/3 mRNA Expression in CD11c+ Zellen einzelner Wt-Mäuse nach Behandlung mit apoptotischer DNA**

Nach Applikation von 4 µg apoptotischer DNA i.v. in Wt-Mäuse zeigt sich nach 6 h, dass alle Mäuse weniger TLR3 mRNA jedoch mehr TLR9 mRNA exprimieren als die Referenz (Cut-off = 1).

## A

TLR9 bei Wt-Mäusen	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	* p
Unbehandelt (Referenz)	1,0	0,34	8,04	
+ apoptotische DNA	13,32	2,00	28,99	*0,0201

## B

TLR3 bei Wt-Mäusen	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	* p
Unbehandelt (Referenz)	1,0	0,10	13,20	
+ apoptotische DNA	0,45	0,25	0,64	0,119

**Tab. 6:** Darstellung des Medianes der relativen Werte für TLR9 (A) und TLR3 (B) von CD11c+ Zellen aus unbehandelten Wt-Mäusen sowie nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA bzw. nativer DNA.

Die Mediane der  $\Delta C_T$ -Werte für TLR9 (n=13) und TLR3(n=10) unbehandelter Mäuse wurde jeweils als Referenz 1,0 gesetzt. Die relativen Werte von TLR9 (n=4) und TLR3 (n=4) nach Applikation von 4µg apoptotischer DNA stellen 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 im Bezug auf die Referenz bzw. auf die Behandlung mit apopt. DNA.

## 5.2 Chloroquin hemmt sowohl die durch apoptotische DNA induzierte IFN $\alpha$ - als auch die gesteigerte TLR9-mRNA-Expression

Chloroquin ist bekannt für die Inhibierung der Ansäuerung von intrazellulären Lysosomen. *In vitro*-Studien zeigen, dass es als wirksamer Inhibitor der Signaltransduktion endosomaler Toll-like-Rezeptoren wirkt<sup>13,64,65</sup>, in wieweit dies jedoch *in vivo* gilt ist bisher nicht geklärt.

Da gezeigt werden konnte, dass apoptotische DNA IFN $\alpha$  mRNA TLR9-abhängig induziert (siehe 1.4.3, **Abb. 3**) und dass apoptotische DNA die Expression von TLR9 triggert (siehe 5.1.4, **Abb. 7 A+B**), sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob Chloroquin *in vivo* Einfluss auf diesen Signalweg nehmen kann.

Dazu wurden die Expressionen von IFN $\alpha$ , TLR3 und TLR9 mRNA in CD11b-positiven Zellen von Wt-Mäusen 6h nach intravenöser Injektion von 4 µg apoptotischer DNA mit oder ohne Vorbehandlung durch 5 µg/g KG Chloroquin mittels Real-time RT-PCR gemessen.

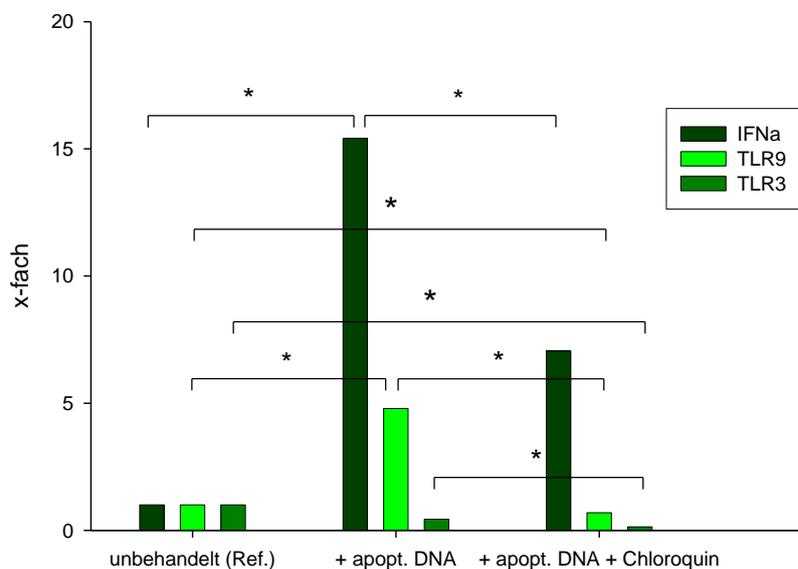
Es zeigte sich, dass im Vergleich zu Mäusen, welche lediglich apoptotische DNA injiziert bekommen hatten, die Expression von IFN $\alpha$  mRNA bei Mäusen mit

zusätzlicher Chloroquin-Behandlung signifikant reduziert war (**Abb. 10**). Bei Betrachtung der einzelnen Mauswerte zeigt sich, dass fast alle getesteten Tiere IFN $\alpha$  mRNA-Level jenseits des Medianes unbehandelter Mäuse haben (**Abb. 11 A**). Dabei exprimieren 90% der CD11b+ Zellen IFN $\alpha$  mRNA Level zwischen 0,10 und 163,33.

Des Weiteren zeigte sich, dass Chloroquin sowohl einen Einfluss auf die Expression von TLR3 mRNA wie auf die von TLR9 hatte. Im Vergleich zu unbehandelten Mäusen und zu solchen, welche lediglich apoptotische DNA erhielten, zeigte sich nach Vorbehandlung mit Chloroquin eine signifikante Reduktion von TLR3 mRNA. Vergleicht man einzelne Mauswerte untereinander, so zeigt sich, übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (**Tab. 6 B, Abb. 7 C**), dass die Mehrheit der Mäuse gleiche oder niedrigere TLR3 Level nach Behandlung mit apoptotischer DNA exprimierten, als unbehandelte Mäuse (**Abb. 11 C**). Dabei liegen das 5% Quantil bei 0,05 und das 95% Quantil bei 0,36. Vorbehandlung mit Chloroquin führte jedoch zu einer signifikant verringerten TLR3 mRNA-Expression gegenüber unbehandelten und lediglich mit apoptotischer DNA behandelten Mäusen.

Chloroquin bewirkte weiterhin einen signifikant reduzierenden Einfluss auf die durch apoptotische DNA induzierte erhöhte TLR9 mRNA-Expression (**Abb. 10**). Beim Vergleich einzelner Mäuse untereinander zeigt sich, dass diese nach einer Vorbehandlung mit Chloroquin und anschließender Immunisierung mit apoptotischer DNA ähnlich viel TLR9 mRNA exprimieren wie unbehandelte Mäuse (**Abb. 11 B**). 90% der TLR9 mRNA-Expression liegt bei Werten zwischen 0,31 und 2,93.

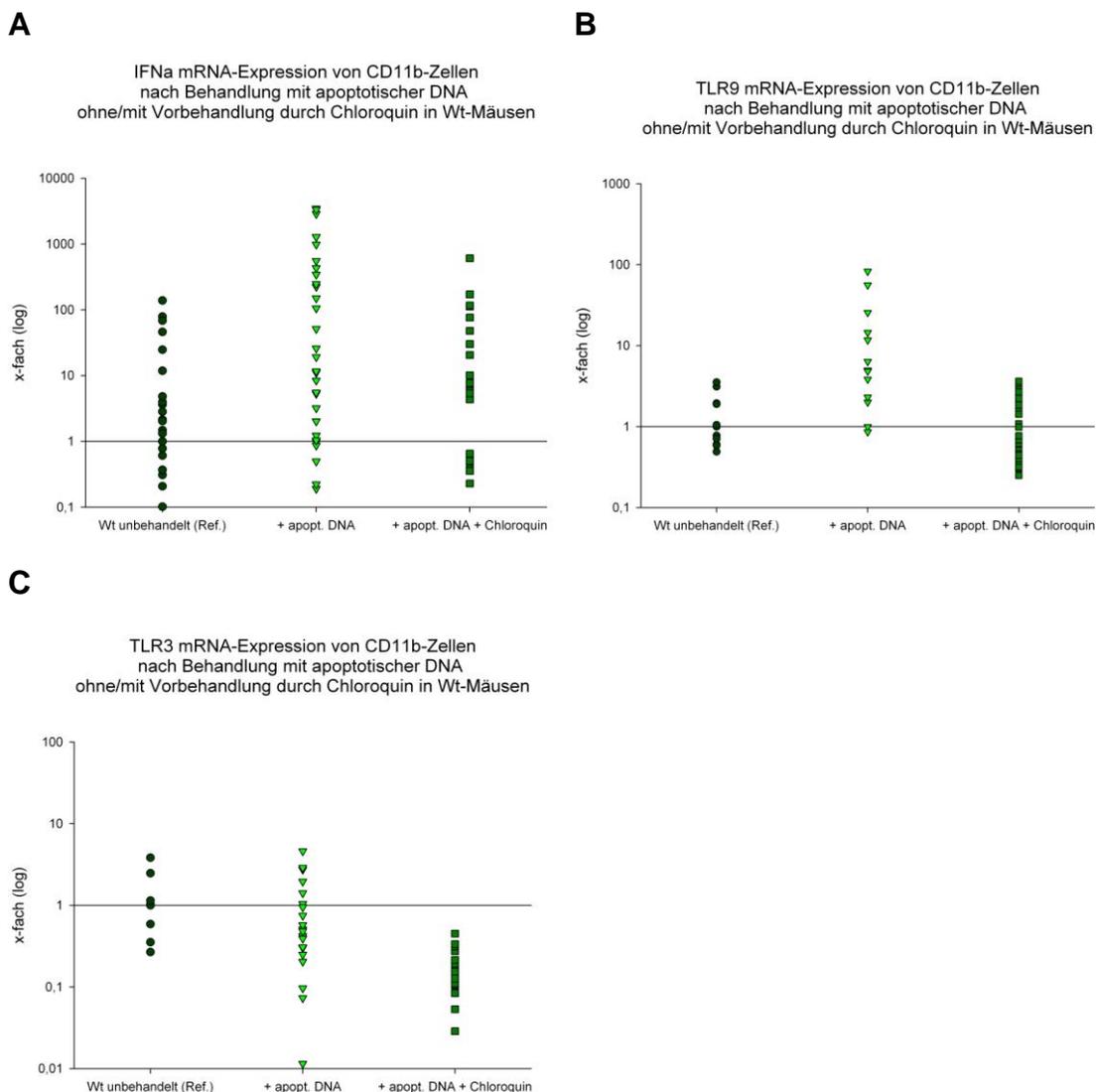
**IFN $\alpha$  und TLR9/3-Expression von CD11b<sup>+</sup> Zellen  
nach Behandlung mit apoptotischer DNA  
ohne/mit Vorbehandlung durch Chloroquin in Wt-Mäusen**



**Abb. 10: Expression von IFN $\alpha$ , TLR9 und TLR3 mRNA nach Behandlung mit 4  $\mu$ g apoptotischer DNA ohne/mit Vorbehandlung mit 5  $\mu$ g/g KG Chloroquin**

Dargestellt sind die medianen Werte der relativen Werte der Expression von mRNA von IFN $\alpha$  (dunkelgrün), TLR9 (hellgrün) und TLR3 (grün) im Vergleich zur jeweiligen Referenz, welche 1,0 gesetzt wurde.

Nach zusätzlicher Behandlung mit 5  $\mu$ g/g KG Chloroquin exprimieren CD11b<sup>+</sup> Zellen von Wt-Mäusen signifikant (\*) weniger IFN $\alpha$ -, TLR9- und TLR3 mRNA als nach alleiniger Behandlung mit apopt. DNA.



**Abb. 11: Expression von IFN $\alpha$ , TLR9 und TLR3 mRNA nach Behandlung mit apopt. DNA ohne/mit Vorbehandlung mit Chloroquin in einzelnen Mäusen.**

Dargestellt sind die relativen Werte der Expression von mRNA von IFN $\alpha$  (A), TLR9 (B) und TLR3 (C) einzelner Mäuse nach Applikation von 4  $\mu$ g apopt. DNA i.v. ohne und mit Vorbehandlung durch 5  $\mu$ g/g KG im Vergleich zur jeweiligen Referenz, welche 1,0 gesetzt wurde.

Nach Vorbehandlung durch Chloroquin exprimieren fast alle CD11b+ Zellen mehr IFN $\alpha$  mRNA als die Referenz (Cut-off = 1), im Schnitt jedoch weniger als nach alleiniger Applikation von apopt. DNA. TLR9 mRNA wird nach Vorbehandlung mit Chloroquin ähnlich viel und weniger exprimiert als in unbehandelten Wt-Mäuse, TLR3 mRNA in allen Mäusen weniger als die Referenz.

## A

IFN $\alpha$ bei Wt-Mäusen	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	* p	
Unbehandelt (Referenz)	1,0	0,00	74,75		
+ apoptotische DNA	15,41	0,13	3082,28	*0,0006	
+ Chloroquin + apoptotische DNA	7,05	0,10	163,33	*0,0193	0,1319

## B

TLR9 bei Wt-Mäusen	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	* p	
Unbehandelt (Referenz)	1,0	0,54	3,32		
+ apoptotische DNA	4,79	2,195	57,43	*0,0280	
+ Chloroquin + apoptotische DNA	0,69	0,31	2,93	0,1956	*<0,001

## C

TLR3 bei Wt-Mäusen	x-fach (Median)	5% Quantil	95% Quantil	* p	
Unbehandelt (Referenz)	1,0	0,30	3,39		
+ apoptotische DNA	0,39	0,08	2,86	*0,0193	
+ Chloroquin + apoptotische DNA	0,14	0,05	0,36	*0,0002	*0,0009

Tab. 7: Darstellung des Medianes der relativen Werte für IFN $\alpha$  (A), TLR9 (B) und TLR3 (C) von CD11b+ Zellen aus unbehandelten Wt-Mäusen sowie nach Applikation von 4 $\mu$ g apoptotischer DNA ohne bzw. mit vorheriger Gabe von 5 $\mu$ g/g KG Chloroquin.

Der Median der  $\Delta C_T$ -Werte für IFN $\alpha$  (n=29), TLR9 (n=11) bzw. TLR3 (n=9) unbehandelter Wt-Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Der relative Wert von IFN $\alpha$ , TLR9 bzw. TLR3 nach Applikation von 4 $\mu$ g apoptotischer DNA mit (n=24, n=36, n=16) und ohne (n=32, n=20, n=22) vorherige Gabe von 5 $\mu$ g/g Chloroquin 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 im Bezug auf die Referenz sowie zur alleinigen Behandlung mit apopt. DNA.

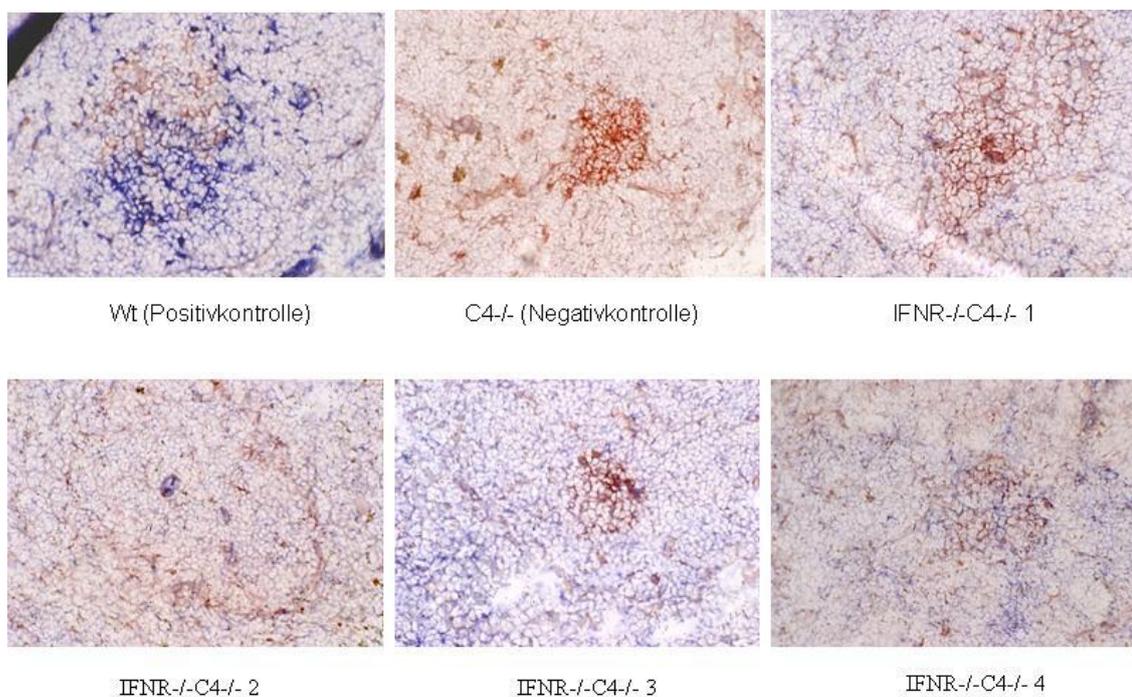
### 5.3 Expression von TLR3 und TLR9 mRNA in MZ-Zellen der murinen Milz unbehandelter Mäuse

Im Vorfeld konnten im Serum junger C4-defizienter Mäuse bereits erhöhte Spiegel endogener DNA einhergehend mit spontan erhöhter IFN $\alpha$  mRNA in CD11b-positiven Zellen der Milz nachgewiesen werden, bevor diese Anzeichen von Autoimmunität zeigten. Gedenk der Ergebnisse, dass apoptotische DNA die TLR9 mRNA-Expression

triggert (**Abb. 7, Abb. 10**) und dieser Rezeptor für die durch Nukleinsäuren induzierte Produktion von IFN $\alpha$  zuständig sein soll, wurde die konstitutive Expression von TLR3 und TLR9 in CD11b-positiven Milzzellen junger C4-defizienter Mäuse und C4/IFNR-Doppel-knock-outs vor Anzeichen einer Autoimmunerkrankung untersucht.

### 5.3.1 Immunhistochemischer Nachweis des C4-/IFNR-/ Genotyps

Die Doppelknock-outs wurden durch Kreuzung von C4 $^{+/-}$  Mäusen und IFNR $^{-/-}$  selbst gezüchtet. Parallel zu jeder Zellaufreinigung wurde jeweils ein Stück der Milz kryokonserviert und anschließend immunhistochemisch gefärbt (siehe 4.1.3, auf Seite 33), um erneut die C4-Defizienz nachzuweisen. Wie erwartet zeigen sich alle als Doppelknockouts deklarierte Mäuse defizient für C4.



**Abb. 12: Immunhistochemische Darstellung der marginalen Zone der Milz von Wt, C4 $^{-/-}$  und IFNR $^{-/-}$ C4 $^{-/-}$  Mäusen**

*Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen der Milz von Wt (Positivkontrolle), C4 $^{-/-}$  (Negativkontrolle) und IFNR $^{-/-}$ C4 $^{-/-}$  Mäusen zur Testung der C4-Defizienz. Es zeigen sich alle Doppelknockouts wie erwartet negativ für C4.*

### 5.3.2 C4<sup>-/-</sup> Mäuse haben erhöhte Level von TLR9 vor jeglichen Anzeichen von Autoimmunität

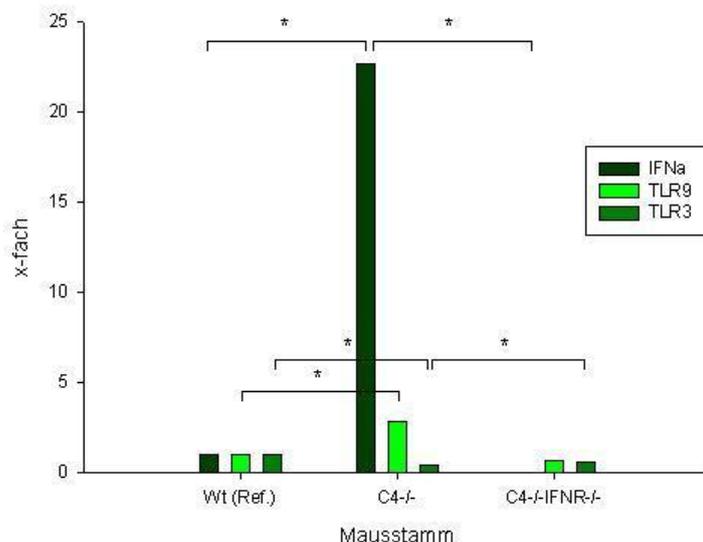
Im Vergleich zu Wt-Mäusen und C4<sup>-/-</sup>/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten CD11b-positive Zellen von C4<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erniedrigte TLR3 mRNA-Expressionen, wohingegen sich zwischen Wildtyp-Mäusen und C4/IFN $\gamma$ -Doppel-Knockouts kein signifikanter Unterschied verzeichnen ließ. (**Abb. 13, Tab. 8 C**). Bei der Betrachtung einzelner Mauswerte zeigt sich, dass TLR3 mRNA von allen CD11b<sup>+</sup> Zellen aus C4-defizienten und von der Mehrzahl der aus C4<sup>-/-</sup>/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen weniger als die Referenz exprimiert wird (**Abb. 13 C**). Dabei exprimieren 90% der CD11b<sup>+</sup> Zellen aus C4<sup>-/-</sup>-Mäusen zwischen 0,18 und 0,40-mal so viel TLR3 mRNA wie die Referenz, die aus C4<sup>-/-</sup>/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen zwischen 0,31 und 1,48-mal so viel.

Dem entgegengesetzt zeigten C4-defiziente Mäuse eine bereits im nicht-autoimmunen Status signifikant erhöhte Expression von TLR9-mRNA in CD11b-positiven Zellen (das 2,87-fache der Referenz, **Tab. 8 B**). 90% liegen dabei zwischen Expressionen von 0,85 und 6,60. C4<sup>-/-</sup>/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäuse hingegen zeigen im Vergleich zur Referenz eine nicht-signifikant erniedrigte TLR9 mRNA-Expression. Das 5% Quantil beträgt 0,46 und das 95% Quantil 3,32. Bei der Betrachtung einzelner Mauswerte zeigt sich, dass bis auf in einer C4<sup>-/-</sup>/IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Maus die CD11b<sup>+</sup> Zellen ähnlich viel TLR9 mRNA exprimieren wie Wt-Mäuse, während die CD11b<sup>+</sup> Zellen in C4<sup>-/-</sup> Mäusen fast alle höhere TLR9 mRNA-Level aufweisen (**Abb. 13 B**).

Diese Ergebnisse zeigen die gleichen Tendenzen der TLR9 mRNA-Erhöhung durch apoptotische DNA in Wt-Mäusen und lassen eine Rolle des TLR9 bei den beobachteten spontan erhöhten IFN $\alpha$ -Leveln in diesen Mäusen vermuten.

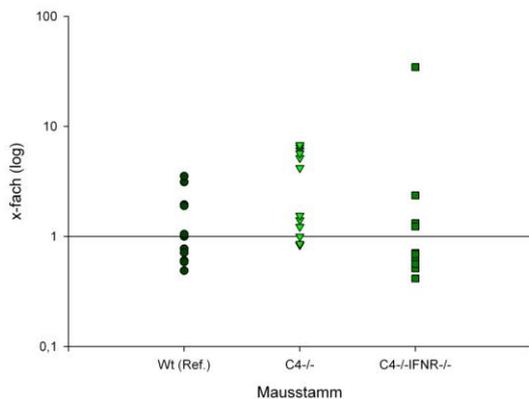
A

### IFN $\alpha$ , TLR9 und TLR3 mRNA Expression bei unbehandelten Mäusen, CD11b+Zellen



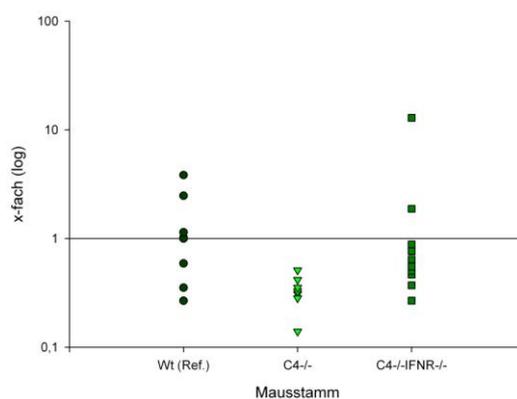
B

### TLR9 mRNA-Expression von CD11b+ Zellen in einzelnen Wt und komplementdefizienten Mäusen



C

### TLR3 mRNA-Expression von CD11b+ Zellen in einzelnen Wt und komplementdefizienten Mäusen



### Abb. 13: Expression von IFN $\alpha$ , TLR9 und TLR3 mRNA bei CD11b+ Zellen unbehandelter Mäuse

Dargestellt sind die medianen Werte (A) der Expression von TLR9 und TLR3 mRNA in CD11b+Zellen, sowie die Werte einzelner Mäuse für TLR9- (B) und TLR3- (C) mRNA von unbehandelten Wt-, C4-/- und C4-/-IFN-/- Mäusen im Vergleich zur Referenz (medianer Wert unbehandelter Wt-Mäuse =1). CD11b+ Zellen unbehandelter C4-/- Mäuse zeigen im Vergleich zu denen von Wt-Mäusen eine signifikante (\*) Expressionssteigerung von IFN $\alpha$  mRNA um das 22,74-fache und von TLR9 mRNA um das 2,87-fache. Die Expression von TLR3 mRNA ist im Vergleich zur Referenz auf das 0,33-fache verringert. CD11b+ Zellen unbehandelte C4-/-IFN-/- Mäuse zeigen sowohl in der Expression von IFN $\alpha$ , als auch in der von TLR9 und TLR3 geringere Werte als die jeweilige Referenz, ohne jedoch signifikant zu sein.

## A

IFN $\alpha$	x-fach (Median)	5 % Quantil	95 % Quantil	* p	
Wt	1,0	0,00	74,75		
C4-/-	22,74	0,30	340,41	*0,0043	
C4-/- IFNR-/-	0,03	0,02	19,51	0,1678	*0,002

## B

TLR9	x-fach (Median)	5 % Quantil	95 % Quantil	* p	
Wt	1,0	0,54	3,32		
C4-/-	2,87	0,84	6,60	*0,0267	
C4-/- IFNR-/-	0,70	0,53	20,08	0,8182	0,2771

## C

TLR3	x-fach (Median)	5 % Quantil	95 % Quantil	* p	
Wt	1,0	0,30	1,94		
C4-/-	0,33	0,18	0,40	*0,0337	
C4-/- IFNR-/-	0,60	0,31	1,48	0,7438	*0,0093

**Tab. 8:** Darstellung des Medianes der relativen Werte für IFN $\alpha$  (A), TLR9 (B) und TLR3 (C) mRNA von CD11b+ Zellen aus unbehandelten Mäusen.

Der Median der  $\Delta C_T$ -Werte für IFN $\alpha$  (n=29), TLR9 (n=11) bzw. TLR3 (n=9) unbehandelter Wt-Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Die relativen Werte von IFN $\alpha$ , TLR9 bzw. TLR3 in C4-/- (n=25, n=11, n=7) und C4-/-IFNR-/- (n=8, n=11, n=10) Mäusen stellen 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 im Bezug auf die Referenz sowie zu unbehandelten C4-/- Mäusen.

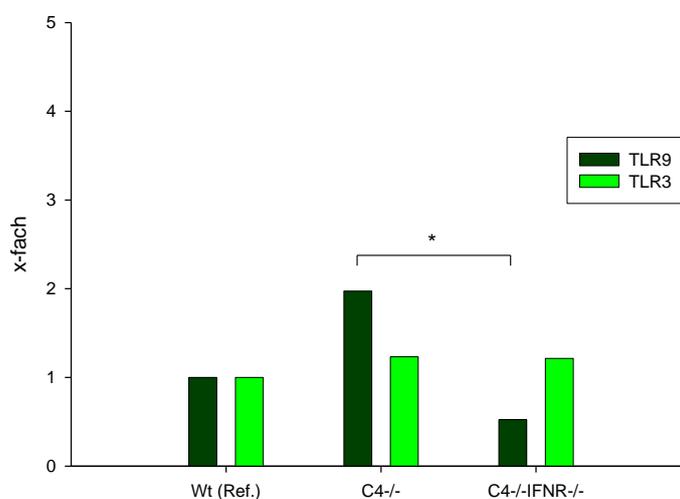
Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Betrachtung von CD11c-positiven Mäusen. Es ergaben sich eine nicht-signifikante doppelt so hohe Expression von TLR9 bei C4-defizienten im Vergleich zu Wildtypmäusen, sowie gleich hohe Expressionen zwischen IFNR/C4-defizienten Mäusen und der Referenz. Im Vergleich zwischen C4-defizienten und den Doppelknockouts zeigte sich jedoch eine signifikant verminderte TLR9 mRNA Expression für die IFNR/C4-defizienten Mäuse. Die Expression von TLR3 zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp-, C4-defizienten und C4/IFNR-defizienten Mäusen. **(Abb. 14 A)**

Bei Betrachtung einzelner Mauswerte **(Abb. 14 B+C)** zeigt sich, dass alle CD11c+ Zellen der verschiedenen Mausstämme etwa gleiche Mengen an TLR3 mRNA exprimieren, jeweils etwas mehr oder weniger als die Referenz (Cut-off = 1). Dabei lagen die Expressionen von TLR3 mRNA bei C4-/- Mäusen zu 90% zwischen 0,55 und

3,67, bei C4<sup>-/-</sup>-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> zwischen 0,63 und 2,09. Im Gegensatz dazu exprimieren alle C4-defizienten Mäuse gleichviel oder mehr TLR9 mRNA als die Referenz, wobei sich dies jedoch in der gleichen Größenordnung wie die Streuung der Wt-Mäuse bewegt. Das 5% Quantil liegt bei 0,93, das 95% Quantil bei 9,48. Dafür exprimieren alle C4<sup>-/-</sup>-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäuse weniger TLR9 mRNA als die Referenz, jedoch ebenfalls nicht weniger als die Streuung der Wt-Mäuse. 90% lagen in einem Intervall zwischen 0,47 und 0,72.

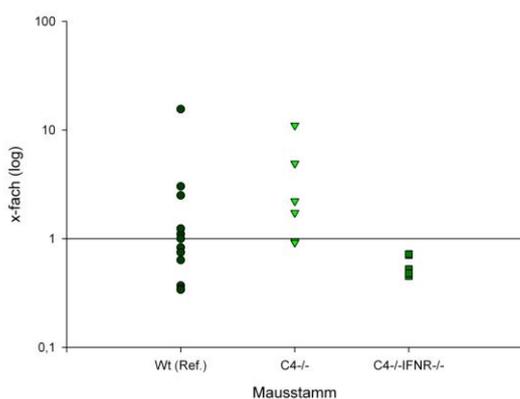
A

### TLR9/3 mRNA-Expression bei unbehandelten Mäusen CD11c-positiver Zellen



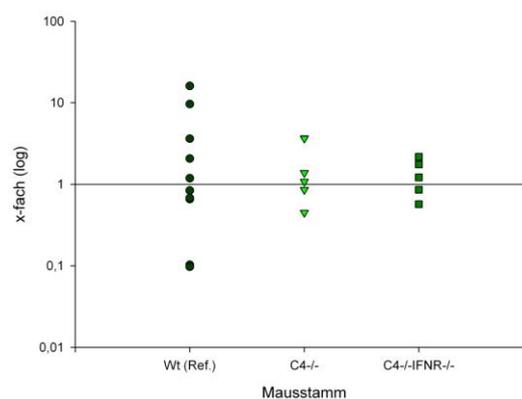
B

### TLR9 mRNA Expression unbehandelter, einzelner Mäuse bei CD11c+ Zellen



C

### TLR3 mRNA Expression unbehandelter einzelner Mäuse bei CD11c+ Zellen



**Abb. 14: TLR9/3 mRNA-Expression bei CD11c+ Zellen unbehandelter Mäuse.**

Dargestellt sind die medianen Werte (A) der Expression von TLR9 und TLR3 mRNA, sowie die Werte einzelner Mäuse für TLR9- (B) und TLR3- (C) mRNA von unbehandelten Wt-, C4<sup>-/-</sup> und C4<sup>-/-</sup>-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zur Referenz (medianer Wert unbehandelter Wt-Mäuse = 1). CD11c<sup>+</sup> Zellen unbehandelter Mäuse exprimieren sowohl in Wt- als auch in C4<sup>-/-</sup> und C4<sup>-/-</sup>-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen gleiche Mengen an TLR3 mRNA. Tendenziell exprimieren sie mehr TLR9 mRNA in C4<sup>-/-</sup> Mäusen und weniger in C4<sup>-/-</sup>-IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> Mäusen als die Referenz (unbehandelte Wt-Mäuse).

## A

TLR9	x-fach (Median)	5 % Quantil	95 % Quantil	* p	
Wt	1,0	0,34	8,04		
C4-/-	1,97	0,93	9,48	0,1475	
C4-/- IFNR-/-	0,52	0,47	0,72	0,1388	*0,0043

## B

TLR3	x-fach (Median)	5 % Quantil	95 % Quantil	* p	
Wt	1,0	0,10	13,20		
C4-/-	1,23	0,55	3,67	0,7040	
C4-/- IFNR-/-	1,21	0,63	2,09	0,9511	0,8548

**Tab. 9: Darstellung des Medianes der relativen Werte für TLR9 (A) und TLR3 (B) mRNA von CD11c+ Zellen aus unbehandelten Mäusen.**

Der Median der  $\Delta C_T$ -Werte für TLR9 ( $n=13$ ) bzw. TLR3 ( $n=10$ ) unbehandelter Wt-Mäuse wurde als Referenz 1,0 gesetzt. Die relativen Werte von TLR9 bzw. TLR3 in C4-/- ( $n=6$ ,  $n=6$ ) und C4-/-IFNR-/- ( $n=5$ ,  $n=5$ ) Mäusen stellen 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 im Bezug auf die Referenz sowie zu unbehandelten C4-/- Mäusen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Apoptotische DNA induziert in Wt-Mäusen die IFN $\alpha$ -Produktion über einen TLR9 abhängigen Signalweg.

In dieser Arbeit wurde zunächst *in vivo* untersucht, ob verschiedene DNA-Präparationen die mRNA-Expression von TLR9 und TLR3 beeinflussen. Es zeigte sich, dass die intravenöse Applikation von apoptotischer DNA in unbehandelten Wt-Mäusen zu einer erhöhten Expression von TLR9 mRNA, nicht jedoch von TLR3 mRNA, in CD11b- und CD11c-positiven Zellen der Milz führte. Mittels Ultraschall fragmentierte DNA war in diesen Zellen ebenfalls - wenn auch im geringeren Maße - in der Lage, TLR9 mRNA zu induzieren. Durch fragmentierte DNA wird also die Expression von TLR9, nicht jedoch von TLR3 mRNA gesteigert, dabei wirkt die apoptotische DNA stärker induzierend als durch Ultraschall fragmentierte DNA.

Toll-like Rezeptoren sind eine Gruppe von Rezeptoren der angeborenen Immunität, die strukturelle Komponenten von Mikroorganismen erkennen und eine pro-inflammatorische Immunantwort triggern. Nukleinsäuren werden durch eine besondere Gruppe von intrazellulär liegenden TLRs erkannt. So erkennt der TLR3 dsRNA und der TLR9 CpG-reiche DNA<sup>67</sup>. Nach Aktivierung wird mit Hilfe von Adapterproteinen (MyD88 bzw. TRIF) schnell die Transkription von Interferonen und anderen pro-inflammatorischen Mediatoren (z.B. IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ <sup>8,51</sup>) induziert. Des Weiteren führen sie zur Hochregulation von IFN-induzierten Genen<sup>19</sup> sowie Rekrutierung von T-Helferzellen und unterstützen die B-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion<sup>96</sup>.

Ursprünglich wurde der TLR9 als Rezeptor für bakterielle und virale DNA identifiziert. Später zeigte sich, dass der eigentliche Ligand eine Sequenzfolge aus unmethylierten CG-Dinukleotiden ist<sup>7,61</sup>, nachdem entdeckt wurde, dass solche von Bakterien abgeleiteten Muster einen ausgesprochen stimulatorischen Effekt bezüglich der B-Zell-Proliferation und der IFN $\alpha$ -Produktion in pDCs sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen haben<sup>61,74,120</sup>. Im Vergleich zu bakterieller und viraler DNA ist Säugetier-DNA im Allgemeinen ein schwacher Stimulator einer Immunantwort<sup>39,61,112</sup> möglicherweise aufgrund der geringeren Frequenz an CpG-Mustern. Studien mit verschiedenen synthetischen CpG-Motiv-enthaltenden Oligonukleotiden (CpG ODN) konnten neue Einblicke in die Natur der Ligandenbindung des TLR9 geben, brachten jedoch auch widersprüchliche Daten hervor. So zeigte einzelsträngige CpG-DNA Sequenz- und pH-abhängig<sup>101</sup> eine starke direkte Bindung an TLR9. Für doppelsträngige CpG-DNA wurde eine sehr schwache Bindungsaktivität nachgewiesen, trotz der Tatsache, dass

natürliche dsDNA von Bakterien den TLR9 gut aktiviert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Oligonukleotide, denen CpG fehlte (Nicht-CpG-ODN) ebenso TLR9-abhängige Immunstimulation nach forcierter endosomaler Translokation vermitteln konnten<sup>120,123,124</sup>. Somit scheint eine Aktivierung des TLR9 auch unabhängig von einer Infektion z.B. durch endogene Liganden möglich und wird im Zusammenhang mit dem Toleranzverlust gegenüber Autoantigenen diskutiert. Dabei wird der intrazellulären Lokalisation des TLR9 eine besondere Bedeutung beigemessen. Er zeichnet sich wie die beiden anderen endosomalen Toll-like Rezeptoren (TLR3 und TLR7) durch die Erkennung von Nukleinsäuren aus<sup>6</sup>. Alle anderen, extrazellulär exprimierten TLRs, erkennen Liganden, welche nicht in Vertebraten vorkommen.

Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe konnten CD11b-positive Zellen aus der marginalen Zone der murinen Milz als die IFN $\alpha$ -produzierenden Zellen charakterisieren. Nach Virusstimulation konnte mittels Immunhistochemie eine Co-Lokalisation von IFN $\alpha$  und CD11b nachgewiesen werden<sup>27</sup>. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe befassten sich mit der Charakterisierung verschiedener Populationen von murinen Milz-Makrophagen der marginalen Zone anhand ihrer Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse. Die mDCs zeigten sich dabei hoch positiv für CD11c und intermittierend positiv für CD11b, die pDCs ebenfalls hoch positiv für CD11c und negativ für CD11b<sup>50</sup>, so dass in Zusammenschau der Ergebnisse die IFN $\alpha$ -produzierenden Zellen als mDCs identifiziert wurden. Die TLR-Expressionsprofile unterscheiden sich bei Menschen und Mäusen. Die natürlichen IFN $\alpha$ -Produzenten des Menschen sind die pDCs, bei der Maus die mDCs. Daher kann man die Ergebnisse dieser Arbeit nicht direkt auf den Menschen übertragen, sondern muss sie vor dem Hintergrund der verschiedenen Expressionsprofile kritisch betrachten. Da die untersuchten murinen mDCs jedoch sowohl TLR9 als auch TLR3 tragen, bleibt die Relevanz der Ergebnisse bezüglich IFN $\alpha$ -Produktion nach apoptotischer DNA im Bezug auf die Entstehung eines SLE auch im humanen System bestehen.

Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass auch DNA-enthaltene Immunkomplexe in murinen CD11b-positiven Zellen der Marginalen Zone (MZ) eine Produktion von IFN $\alpha$  induzieren. Diese scheinen auf bestimmte Rezeptoren angewiesen zu sein, da die Applikation des T-Zellunabhängigen TNP-Ficoll, welches sich ebenfalls an der MZ ablagert, nicht zu einer IFN $\alpha$ -Produktion führte<sup>27</sup>. *In vitro* wurde bereits mehrfach gezeigt, dass ein Aktivierungsweg der IFN $\alpha$ -Produktion durch Immunkomplexe, welche Chromatin bzw. DNA enthalten, über den TLR9 führt<sup>13,65,74</sup>. Dabei werden murine DCs anscheinend über eine kooperative Interaktion zwischen TLR9 und Fc $\gamma$ RIII (CD16)<sup>13</sup> aktiviert. In humanen pDCs scheint Fc $\gamma$ RIIa (CD32) an der

Internalisierung von Immunkomplexen beteiligt zu sein und sie dem TLR9 zuzuführen<sup>74</sup>. Meiner Arbeitsgruppe gelang es vor kurzem *in vivo* diesen TLR9-abhängigen Signalweg nachzuweisen, da die Applikation von apoptotischer DNA in TLR9-/- Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zu keiner erhöhten IFN $\alpha$ -Produktion führte<sup>89</sup>. Allerdings ist in TLR9-/- und MyD88-/- Mäusen die Aktivierung muriner mDCs nicht komplett inhibiert, was auf das Vorhandensein eines zusätzlichen TLR9- oder MyD88-unabhängigen Weges hindeutet<sup>13</sup>.

Auch fragmentierte DNA kann ein effizienter Induktor von IFN $\alpha$  in CD11b-positiven Zellen aus der Marginalen Zone der Milz in nicht-autoimmunen Mäusen sein. Dabei konnte gezeigt werden, dass apoptotische DNA stärker induzierend wirkt als durch Ultraschall fragmentierte DNA<sup>89</sup>. Gleiches ließ sich in dieser Arbeit auch für die Expressionsinduktion für TLR9 mRNA zeigen. Dies zusammen deutet auf die Wichtigkeit der apoptotisch-induzierten DNA-Fragmentierung in der Aktivierung von IFN $\alpha$  hin. Dabei ist für apoptotische DNA charakteristisch, dass eine vermehrte Hypomethylierung sowie einen erhöhten Gehalt an CpG-reichen Regionen vorliegt<sup>7</sup>.

Die Produktion des antiviralen Zytokins IFN $\alpha$  in der marginalen Zone der Milz folgt einem durch Nukleinsäuren induzierten angeborenen Mechanismus. Die Art dieser Antigene (RNA, dsRNA, CpG-Motive) und ihre Internalisierung sind entscheidende Faktoren, da die korrespondierenden Toll-like Rezeptoren intrazellulär lokalisiert sind<sup>2,6</sup>. Die Aufnahme geschieht über Fc- oder B-Zell-Rezeptoren (BCR) von TLR9-exprimierenden Zellen<sup>33</sup>. Dabei ist für eine funktionierende Signaltransduktion von CpG-DNA mittels des TLR9 eine Azidifizierung des Endosoms notwendig<sup>41</sup>. Es wird angenommen, dass durch das saure Milieu, welches chemisch reduzierend wirkt, die Aufspaltung der dsCpG-DNA in ssCpG-DNA erfolgt, da nur für ssCpG-DNA bisher eine direkte Bindung an den TLR9 nachgewiesen werden konnte<sup>101</sup>. Nach Internalisierung in die Zellen werden TLR-enhaltende Endosomen rekrutiert, um ein Autophagosom zu formen, worin die TLRs die internalisierten Antigene aufnehmen<sup>16</sup>. Dies induziert in pDCs die Produktion von Typ I IFN, in B-Zellen wird das BCR-Signal verstärkt und die Antikörperproduktion gesteigert<sup>33</sup>.

Die intrazelluläre Lage der entsprechenden TLRs scheint insgesamt ein wichtiger Mechanismus in der Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ zu sein. Somit scheint es möglich, dass im Falle einer Internalisierung von endogenen Nukleinsäuren diese als Trigger für eine IFN $\alpha$ -Produktion fungieren können und somit als ein wichtiger Faktor in der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung zu bewerten sind.

Bisher konnte die Regulation der TLR-Expression nicht ausreichend geklärt werden. Scheinbar herrscht ein sensibles Gleichgewicht zwischen den einzelnen Rezeptoren des gleichen Zelltyps. So wurde bereits beschrieben, dass bei gleichem Signaltransduktionsweg die Aktivierung eines TLR mit der Supprimierung anderer TLRs einhergeht<sup>18,103</sup>. In dieser Arbeit zeigte sich nach Applikation von apoptotischer DNA eine Hochregulation des TLR9 bei gleichzeitig tendenziell verminderter Expression von TLR3 (siehe 5.1.4). Dies deutet auf eine kompetitive Hemmung hin, wie es bereits für die Wirkung von LPS auf die einerseits vermehrte Expression von TLR2 und TLR4 und zeitgleiche Herunterregulation von TLR5<sup>77</sup> gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend scheint also apoptotische DNA in der Lage zu sein, TLR9-abhängig die Produktion von IFN $\alpha$  in CD11b- und CD11c-positiven Zellen zu induzieren. Dass dabei möglicherweise eine gegenseitige Abhängigkeit besteht lassen die Untersuchungen von Thibault et al. von 2009<sup>117</sup> mittels des Pristane-Models des murinen SLE vermuten. Pristane gilt als suffizienter Induktor für Lupus-assoziierte Antikörper in nicht autoimmunen Mäusen<sup>104</sup>. Dabei induziert Pristane die Apoptose in murinen peritonealen Zellen (v.a. myeloide und lymphatischen DCs), wahrscheinlich durch Einlagerung in die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran, was eine Störung der Zellmembranintegrität zur Folge hat<sup>14</sup>. Thibault et al. konnten kürzlich nachweisen, dass bei Mäusen ohne funktionierenden Interferonrezeptor (IFNAR2-/-) die B-Zellen nach Pristane-Stimulation im Vergleich zu Wt-Mäusen weniger der typischen Antikörper produzierten und es zu einer gestörten Hochregulation von TLR9 (und TLR7) nach IFN $\alpha$ -Stimulation kam. Dies untermauert eine wichtige Verbindung zwischen dem IFN-I Signalweg und der Regulation der TLR9-spezifischen B-Zell-Aktivierung im murinen Lupus-Model und deutet darauf hin, dass die Aktivierung des IFN $\alpha$ -Systems bei SLE nicht die Folge der Krankheit ist, sondern vielmehr eine Grundvoraussetzung.

## 6.2 Chloroquin hemmt die IFN $\alpha$ -Synthese.

Die durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesene Abhängigkeit der IFN $\alpha$ -Produktion durch Signaltransduktion über den TLR9<sup>89</sup> (1.4.3) nach exogener Applikation von apoptotischer DNA *in vivo* lässt auf einen Feedback-Mechanismus für TLR9 und IFN $\alpha$  schließen. Da sich in Mäusen ohne funktionellen TLR9-Rezeptor (TLR9-/-) kein IFN $\alpha$  durch apoptotische DNA induzieren ließ, untersuchte eine weitere Versuchsreihe die Wirkung des TLR9-Signaltransduktion-Hemmers Chloroquin auf die

Expression von IFN $\alpha$ -, TLR9- und TLR3-mRNA nach Applikation von apoptotischer DNA in Wt-Mäusen. Es zeigte sich, dass die zusätzliche Applikation von Chloroquin eine verminderte IFN $\alpha$ -Produktion im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit apoptotischer DNA zur Folge hat. Allerdings war in meinem Versuchsmodell diese Hemmung weder signifikant noch vollständig. So zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Mäusen die Produktion von IFN $\alpha$  mRNA nach Applikation von Chloroquin und apoptotischer DNA weiterhin erhöht, wenn auch im geringeren Maße als ohne Vorbehandlung mit Chloroquin. Des Weiteren ließ sich zeigen, dass die Vorbehandlung mit Chloroquin eine erhöhte Expression von TLR9 mRNA nach Applikation von apoptotischer DNA in Wt-Mäusen verhindern konnte, da sich kein Unterschied zur TLR9 mRNA-Expression der Referenzmäuse nachweisen ließ und sich im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit apoptotischer DNA ein signifikanter Unterschied ergab. Die Expression von TLR3 zeigte sich nach Chloroquin-Applikation im Vergleich zu Wt-Mäusen sogar vermindert.

Das Antimalariamittel Chloroquin wird ebenfalls in der Therapie von leichteren Formen des SLE eingesetzt. Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass es die Aktivierung von B-Zellen, pDCs und mDCs durch DNA- und RNA-enthaltende Immunkomplexe inhibieren kann<sup>13,64,65</sup>. Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass Chloroquin die TLR9-vermittelte Zellaktivierung durch CpG-DNA hemmt, wobei der genaue Wirkmechanismus *in vivo* bisher nicht vollständig geklärt ist. Es wird zurzeit davon ausgegangen, dass es in den Signaltransduktionsweg des TLR9 eingreift, indem es die TLR9-Aktivierung durch eine pH-Verschiebung in intrazellulären Lysosomen behindert. Dabei interferiert es anscheinend mit der Azidifizierung des Endosoms, welche für die Aktivierung des endosomalen Rezeptors essentiell ist<sup>70,101</sup>.

Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass der therapeutische Effekt von Chloroquin bei Autoimmunerkrankungen nicht nur in der Alkalisierung im Endosom besteht. So konnte gezeigt werden, dass Chloroquin *in vitro* auch die Signaltransduktion von CpG-DNA bei Konzentrationen blockiert, die für eine endosomale pH-Verschiebung nicht ausreichende gewesen wären<sup>70</sup>. Es wird vermutet, dass Chloroquin auch als TLR9-Antagonist wirkt, indem es direkt die Bindung von CpG-DNA an TLR9 beeinflusst<sup>108</sup>.

Meine Ergebnisse differieren mit denen anderer Arbeitsgruppen, wo bereits geringe Konzentrationen von Chloroquin zu einer vollständigen Hemmung von IFN $\alpha$  führten<sup>73,122</sup>. Der Großteil dieser Untersuchungen erfolgte allerdings *in vitro*, was man bei der Interpretation berücksichtigen muss. Möglicherweise reicht die einmalige Applikation von Chloroquin *in vivo* - wie in meinem Versuchsaufbau geschehen - nicht

für eine vollständige Hemmung aus, so dass eine Mehrfachgabe indiziert wäre, um einen ausreichenden Wirkspiegel zu erreichen. Dennoch scheint Chloroquin auch in diesem Versuchsmodell in der Lage zu sein, den hypothetischen IFN $\alpha$ /TLR9-Feedbackmechanismus zu stören, da die Hemmung der IFN $\alpha$ -Induktion scheinbar ausreichend war, um eine Hochregulierung des TLR9 im Sinne einer positiven Rückkopplung zu verhindern.

Die Expression des ebenfalls intrazellulär lokalisierten TLR3 wurde durch Chloroquin sogar noch auf Werte unterhalb der konstitutiven Expression unbehandelter Mäuse herunter reguliert. Es konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden, dass proinflammatorische Zytokine zu einer Reduktion der TLR3 mRNA-Expression führen. Bislang konnte dies jedoch nicht ausreichend erklärt werden<sup>77</sup>.

Insgesamt ließ sich also zeigen, dass in dieser Arbeit Chloroquin *in vivo* einen teilweise hemmenden Einfluss auf die Induktion der IFN $\alpha$ -mRNA Expression nach apoptotischer DNA hat, während eine gesteigerte TLR9-Expression komplett unterbunden wird, da diese auch nach Behandlung mit apoptotischer DNA im Mittel gleiche Werte wie die Referenz bestehend aus unbehandelten Wt-Mäusen ergab. Diese Ergebnisse deuten zwar auf das Vorhandensein eines IFN $\alpha$ /TLR9-Feedbackmechanismus wie laut oben genannter Hypothese hin, leider reicht die Art der Chloroquin-Verabreichung (Art/Zeitpunkt/Anzahl der Injektionen) anscheinend nicht aus, um eine vollständige IFN $\alpha$ -Induktionshemmung nach Applikation von apoptotischer DNA zu erreichen. Dennoch ließ sich im Versuchsmodell eine Hemmung des TLR9 nachweisen, so dass Chloroquin scheinbar zumindest das Potential haben muss, Einfluss auf die IFN $\alpha$ -Induktion nach apoptotischer DNA zu nehmen. Diese Hemmung hätte theoretisch sowohl die Expression von TLR9- als auch die IFN $\alpha$ -mRNA beeinflussen müssen, nicht zuletzt aufgrund der verminderten Anzahl an signaltransduzierenden Rezeptoren für apoptotische DNA sowie als Folge des Feedback-Mechanismus. Als Erklärung wären das Vorhandensein eines zusätzlichen TLR9-unabhängigen Signalweges zur IFN $\alpha$ -Induktion oder aber ein noch nicht ausgereifter Versuchsaufbau die Medikamentendosierung, Applikationsart/-häufigkeit und/oder Inkubationsdauer betreffend denkbar.

In wieweit die Behandlung mit Chloroquin im Falle einer Komplementdefizienz mit erhöhten Spiegeln endogener DNA eine erste Aktivierung des Interferonsystems unterbinden und damit den Toleranzverlust verhindern kann, muss jedoch genauer untersucht werden, um eine mögliche Bedeutung in der frühen Entstehungsphase des SLE zu klären.

### 6.3 Gesteigerte Expression von TLR9 bei C4-defizienten Mäusen vor Autoimmunitätszeichen.

Um näher zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit nachgewiesene gesteigerte TLR9-Expression direkt mit dem Vorhandensein von endogener bzw. apoptotischer DNA zusammenhängt oder ob eine Rückkopplung mit IFN $\alpha$  ursächlich ist, wurde die konsekutive Expression von TLR9- und TLR3-mRNA in C4 $^{-/-}$ , und C4/IFR-Doppelknockouts (C4 $^{-/-}$  Mäuse ohne funktionierenden IFN-Rezeptor) gemessen und mit der in Wt-Mäusen verglichen.

Dabei ließ sich nachweisen, dass C4-defiziente Mäuse gegenüber unbehandelten Wt-Mäusen neben den bereits bekannten signifikant erhöhten IFN $\alpha$ -Spiegel auch eine vermehrte Expression von TLR9, nicht jedoch von TLR3 mRNA zeigen. Die TLR3 mRNA-Expression zeigte sich in dieser Arbeit sogar bei C4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wt-Mäusen vermindert. In C4 $^{-/-}$ /IFR $^{-/-}$  Mäusen hingegen ließen sich in beiden Populationen keine Unterschiede zu Wt-Mäusen verzeichnen. Dabei stellen sich für die TLR9-mRNA Expression sogar im Vergleich zur Referenz leicht erniedrigte Werte dar, ohne jedoch signifikant zu sein.

Die gemessenen Unterschiede zwischen unbehandelten Wt- und C4 $^{-/-}$  Mäusen ließen sich sowohl für CD11b $^{+}$  als auch für CD11c $^{+}$  Zellen nachweisen, wobei sich allerdings lediglich bei den CD11b-positiven Zellen signifikante Unterschiede bei der Expression vom TLR9- bzw. TLR3-mRNA ergaben. Dabei ist es denkbar, dass die fehlende Signifikanz aufgrund der geringeren erreichten Reinheit bei der CD11c-Auffreinigung (75% vs. 95 % bei CD11b siehe 4.7) zustande kommt. Insgesamt zeigen sich jedoch bei nach CD11c-aufgereinigten Zellen die gleichen Tendenzen wie bei der CD11b-Auffreinigung.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass in C4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wt-Mäusen höhere Spiegel von endogener DNA vorkommen. Des Weiteren ließ sich in diesen Mäusen eine gesteigerte IFN $\alpha$ -Produktion nachweisen schon bevor lupus-ähnliche Krankheitsmerkmale auftraten. Auch gelang die Induktion der IFN $\alpha$ -Expression in Wt-Mäusen durch die Applikation von apoptotischer DNA. Die Clearance apoptotischer Zellen in DNase I-defizienten<sup>78,124</sup> oder C4-defizienten Mäusen<sup>27</sup> sowie in Makrophagen von SLE-Patienten scheint beeinträchtigt zu sein<sup>47</sup>, daher scheint in der Pathogenese des SLE die Freigabe von degraderter und gereinigter DNA durch apoptotische Zellen ein entscheidender Schritt zu sein. Es erscheint nahe liegend, dass endogene DNA, welche als Ligand von TLR9 fungiert, als

chronischer Stimulus für die IFN $\alpha$ -Produktion dienen kann. Interferone können durch Mitwirken vieler TLRs, einschließlich TLR3, 4, 7 und 9, produziert werden. Seitdem Beweise existieren, welche eine Immunogenität für Säugetier-DNA vermuten lassen, hat der Signalweg des TLR9 spezielles Interesse geweckt, um die Rolle der erworbenen Immunabwehr gegen Nukleinsäuren zu berücksichtigen.

Für andere Toll-like Rezeptoren wurde bereits gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine und nicht die entsprechenden Liganden die Expression beeinflussen<sup>81,117</sup>. Auch in dieser Arbeit ist die erhöhte Expression von TLR9-mRNA scheinbar eher eine Folge der durch vermehrt vorhandenen endogenen DNA induzierten IFN $\alpha$ -Produktion, als eine direkte Folge der DNA, da C4-/-IFR-/- Mäusen sowohl reduzierte Mengen an IFN $\alpha$ - als auch an TLR9-mRNA im Vergleich zu C4-Knockouts mit funktionellem IFN-Rezeptor aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die Untersuchungen von Thibault et al<sup>117</sup>. Untersuchungen mit Pristane, einem Induktor für Lupus-assoziierte Antikörper in nicht autoimmunen Mäusen<sup>104</sup>, zeigten, dass bei Mäusen ohne funktionierenden Interferonrezeptor (IFNAR2-/-) die B-Zellen nach Pristane-Stimulation im Vergleich zu Wt-Mäusen weniger der typischen Antikörper produzierten und es zu einer gestörten Hochregulation von TLR9 (und TLR7) nach IFN $\alpha$ -Stimulation kam. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe, welche die Abhängigkeit der IFN $\alpha$ -Produktion *in vivo* nach exogener Applikation von apoptotischer DNA durch Signaltransduktion über den TLR9 zeigte<sup>89</sup>, da sich in Mäusen ohne funktionellen TLR9-Rezeptor (TLR9-/-) kein IFN $\alpha$  durch apoptotische DNA induzieren ließ, wurde die Hypothese eines Feedback-Mechanismus für TLR9 und IFN $\alpha$  aufgestellt. Laut dieser bewirkt IFN $\alpha$  nach TLR9-abhängiger Induktion durch apoptotische DNA wiederum über eine positive Rückkopplung eine Expressionssteigerung des TLR9. Bei fehlendem oder unwirksamem IFN-Rezeptor wird dieser Regelkreis durchbrochen, die TLR9-Hochregulation unterbleibt. Ein ähnlicher Feedbackmechanismus wurde bereits für die Generierung einer vollständigen IFN $\alpha$ -Antwort beschrieben<sup>71</sup>. Es zeigte sich, dass der zuerst sezernierte IFN $\alpha$ -Subtyp auf autokrine Weise über den IFN-Rezeptor zur Expression des Interferonregulierenden Faktors 7 (IRF7) führt, welcher dann für die Produktion der anderen IFN $\alpha$ -Subtypen verantwortlich ist, um zusammen zu einer suffizienten Immunantwort zu führen<sup>105</sup>.

Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die gesteigerte Expression von TLR9 mRNA durch erhöhte Spiegel endogener DNA abhängig von einem funktionsfähigen IFN $\alpha$ -Signalweg zu sein scheint. Bei Vorliegen dieses IFN $\alpha$ /TLR9-Feedbackmechanismus könnte daraus bei gleichzeitig bestehendem Clearancedefekt

von endogener DNA, wie z.B. bei C4-Defizienz nachgewiesen, eine durchgehende IFN $\alpha$ -Aktivierung resultieren, die eine Toleranzüberwindung denkbar macht. Inwieweit und an welcher Stelle ein Eingreifen in diesen Feedbackmechanismus möglich ist, bedarf der weiteren Erforschung. Es ergeben sich möglicherweise interessante Ansätze für neue Therapieverfahren sowie ein tieferes Verständnis bezüglich Entstehung und Verlauf des SLE sowie anderer Autoimmunerkrankungen.

## 7 Zusammenfassung

Der systemische Lupus Erythematoses ist eine chronische Autoimmunerkrankung, gekennzeichnet durch erhöhte Spiegel von endogener DNA, Ablagerung von Immunkomplexen, dem Vorkommen von antinukleären Antikörpern und ein aktiviertes IFN $\alpha$ -System. Dabei führt ein Mangel an frühen Komplementfaktoren zu einer gestörten Clearance von apoptotischen Körperchen, welche dann als Trigger für die Bildung von Autoantikörpern wirken.

Meine Zielsetzung war zu überprüfen, ob verschiedene DNA-Präparationen in der Lage sind *in vivo* IFN $\alpha$ , TLR3 oder TLR9 zu induzieren, ob die Blockade des TLR9 durch die Anwendung von Chloroquin zu einer verminderten IFN $\alpha$  Produktion *in vivo* führt, und ob die Blockade von IFN $\alpha$  zu einer verminderten TLR9-Expression führt.

Wir konnten zeigen, dass die intravenöse Applikation von apoptotischer DNA im Gegensatz zu fragmentierter DNA in gesunden Wt-Mäusen neben einer bereits bekannten Induktion von IFN $\alpha$  zu einer gesteigerten Expression von TLR9-, nicht jedoch von TLR3-mRNA führt.

Dieses Phänomen lässt sich durch Applikation des Malariamittels Chloroquin, einem Inhibitor von TLR9, welches ebenfalls in der Therapie von leichten Formen des humanen SLE eingesetzt wird, zum Teil unterbinden, und konnte von der Arbeitsgruppe auch durch die Verwendung von TLR9-knock-out Mäusen bestätigt werden.

Des Weiteren zeigen C4-defiziente Mäuse bereits vor jeglichen Anzeichen einer Erkrankung erhöhte TLR9-mRNA Spiegel, nicht jedoch erhöhte TLR3-Spiegel. In diesen Mäusen zeigten sich bereits in Voruntersuchungen erhöhte Spiegel endogener DNA und ein aktiviertes IFN $\alpha$ -System, so dass ein Zusammenhang nahe liegend erscheint. Erstaunlicherweise zeigen sich in Mäusen, die sowohl defizient für C4 als auch für den IFN-Rezeptor sind (Doppel Knock-outs) keine erhöhten mRNA-Spiegel von TLR9. Es ist denkbar, dass TLR9 nicht nur die Expression von IFN $\alpha$ -mRNA vermittelt, sondern durch erhöhtes IFN $\alpha$  selbst hochreguliert wird. Dies zeigt, dass offenbar eine positive Rückkopplung zwischen TLR9 und IFN $\alpha$  besteht, die möglicherweise in der Krankheitsentstehung eine wichtige Rolle spielt.

Insgesamt scheint für die Entwicklung eines systemischen Lupus Erythematoses ein TLR9-abhängiger Interferon-alpha-Signalweg ursächlich zu sein. Dabei legt meine Arbeit nahe, dass eine positive Rückkopplung zwischen TLR9 und IFN $\alpha$  besteht und die Durchbrechung dieses Regelkreises mit anti-IFN $\alpha$  oder anti-TLR9 (z.B. Chloroquin) und die Fortentwicklung dieser Werkzeuge neue Behandlungswege für den Systemischen Lupus Erythematoses aufzeigen.

## V Literaturverzeichnis

1. **Ahearn JM, Fearon DT:** Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv. Immunol.* 46:183-219., 183-219 (1989).
2. **Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H:** Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments., *Eur J Immunol.*, 32(7):1958-1968 (2002).
3. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O:** Pathogen recognition and innate immunity., 124:783 (2006).
4. **Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA:** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3., *Nature*, 413(6857):732-738 (2001).
5. **Atkinson JP:** Complement deficiency: predisposing factor to autoimmune syndromes. *Clin. Exp. Rheumatol.* 7 Suppl 3:95-101., S95-101 (1989).
6. **Barton GM, Kaşan JC, Medzhitov R:** Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA., *Nature Immunology*, 7:49-56 (2006).
7. **Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB:** Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:9237-9242 (2001),
8. **Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm GV, Vallin H, Rönnblom L:** Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus*. 9:664-671 (2000).
9. **Benner R, Hijmans W, Haaijman JJ:** The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.* 46, 1-8 (1981).
10. **Bird AP:** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 321(6067):209-13 (1986).
11. **Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ:** How Specific Should Immunological Memory Be? *J Immunol.* 163:569-575 (1999).
12. **Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ:** Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19, 56-59 (1998).

13. **Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR:** Toll-like Receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunglobuline G complexes. *J Exp Med* 2004, 199: 1631-1640 (2004).
14. **Calvani M, Caricchio R, Tucci M, Sobel ES, Silvestris F, Tartaglia P, Richards HB:** Induction of Apoptosis by the Hydrocarbon Oil Pristane: Implications for Pristane- Induced Lupus. *J Immunol.* 175:4777-4782 (2005)
15. **Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A:** Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.*, 179(4):1317-30 (1994).
16. **Chaturvedi A, Dorward D, Pierce SK:** The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity.* 28(6):799-809 (2008).
17. **Chen Z, Koralov SB, Kelsoe G:** Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2. *J. Exp. Med.* 192, 1339-1352 (2000).
18. **Christensen SR, Kashgarian M, Alexopoulou L, Flavell RA, Akira S, Shlomchik MJ:** Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *JEM.* 202:321-331 (2005).
19. **Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uzé G:** Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 34(3):796-805 (2004).
20. **Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC:** Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature.* 371:389-395 (1994).
21. **Defrance T, Casamayor-Palleja M, Krammer PH:** The life and death of a B cell. *Adv. Cancer Res.* 86:195-225., 195-225 (2002).
22. **Dragon-Durey MA, Quartier P, Fremeaux-Bacchi V, Blouin J, de Barace C, Prieur AM, Weiss L, Fridman WH:** Molecular basis of a selective C1s deficiency associated with early onset multiple autoimmune diseases. *J Immunol.*, 166(12):7612-6 (2001).
23. **Einav S, Pozdnyakova OO, Ma M, Carroll MC:** Complement C4 is protective for lupus disease independent of C3. *J. Immunol.* 168: 1036-1041 (2002).
24. **Ekland EH, Forster R, Lipp M, Cyster JG:** Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells. *J Immunol.*172:4700-4708 (2004).

25. **Faust K:** Der Einfluss früher Komplementfaktoren auf die Apoptose von B-Zellen im Rahmen der peripheren Toleranzinduktion, Med.Diss. Lübeck (2005).
26. **Fields ML, Seo SJ, Nish SA, Tsai JH, Caton AJ, Erikson J:** The regulation and activation potential of autoreactiv B cells. *Immunol Res*, 27: 219-233 (2003).
27. **Finke D, Randers K, Hoerster R, Hennig H, Zawatzky R, Marion T, Brockmann Ch, Klempt-Giessing K, Jacobsen K, Kirchner H, Goerg S:** Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN- $\alpha$  in complement C4-deficient mice: Implications for induction of systemic lupus erythematosus *Eur. J Immunol.*, 37:1702–1709 (2007).
28. **Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS, Carroll MC:** Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement. *J. Immunol.* 157, 549-556 (1996).
29. **Fishelson Z, Attali G, Mevorach D:** Complement and apoptosis. *Mol Immunol.* 38:207-219 (2001).
30. **Frank MM, Fries LF:** The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12, 322-326 (1991).
31. **Fritzler MJ:** Drugs recently associated with lupus syndromes. *Lupus.* 3(6):455-459 (1994).
32. **Garland JM, Halestrap A:** Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. *J. Biol. Chem.* 272, 4680-4688 (1997).
33. **Gilliet M, Cao W, Liu YJ:** Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 8(8):594-606 (2008).
34. **Gilliet M, Lande R:** Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol.* 20(4):401-407 (2008).
35. **Goerg S:** The association between systemic lupus erythematosus and deficiencies of the complement system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 48(3):237-45 (2002).
36. **Goodnow CC, Adelstein S, Basten A:** The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* 248, 1373-1379 (1990).
37. **Gota C, Calabrese L:** Induction of clinical autoimmune disease by therapeutic interferon- $\alpha$ . *Autoimmunity.* 36:511-518 (2003).
38. **Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H, Razin A:** Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett.* 124(1):67-71 (1981).

39. **Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM:** Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol.* 171(3):1393-1400 (2003).
40. **Guzman-Rojas L, Sims-Mourtada JC, Rangel R, Martinez-Valdez H:** Life and death within germinal centres: a double-edged sword. *Immunology.* 107:167-175 (2002).
41. **Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H:** CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17(21):6230-6240 (1998).
42. **Han S, Zheng B, Dal Porto J, Kelsoe G:** In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance. *J. Exp. Med.* 182, 1635-1644 (1995).
43. **Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G:** Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol.* 155, 556-567 (1995)
44. **Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, Goodnow CC:** Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell.* 72(3):325-35 (1993).
45. **He B, Qiao X, Cerutti A:** CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol.* 173(7):4479-4491 (2004).
46. **Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S:** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 408:740-745 (2000).
47. **Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR:** Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 41(7):1241-50 (1998).
48. **Herold G und Mitarbeiter:** Innere Medizin, Eine vorlesungsorientierte Darstellung, Köln, Seite 598-602 (2007).
49. **Hollmann C, Gerdes J:** Follicular dendritic cells and T cells: nurses and executioners in the germinal centre reaction. *J Pathol.* 189:147-149 (1999).
50. **Hoerster R:** Die Bedeutung von Interferon alpha für das Mikromilieu der Marginalen Zone der Mausmilz in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses, Med.Diss. Lübeck (2009).

51. **Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan JM, Ouabed A, Heslan M, Josien R:** Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J Immunol.* 177(2):1007-1016 (2006).
52. **Isaacs A, Lindenmann J:** Virus interference: I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 147:258-267 (1957).
53. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M:** Immunologie. 5. Aufl. - Heidelberg; Berlin: Spektrum, AKAD: Verl.; Seite 46-66 (2002).
54. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M:** Immunologie. 5. Aufl. - Heidelberg; Berlin: Spektrum, AKAD: Verl.; Seite 68-73 (2002).
55. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M:** Immunologie. 5. Aufl. - Heidelberg; Berlin: Spektrum, AKAD: Verl.; Seite 86-87 (2002).
56. **Kaisho T, Akira S:** Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin. Immunol.* 11:97 (2006).
57. **Kälkner KM, Rönnblom L, Karlsson Parra AK, Bengtsson M, Olsson Y, Öberg K:** Antibodies against double-stranded DNA and development of polymyositis during treatment with interferon. *QJM,* 91(6):393-9 (1998).
58. **Kawai T, Akira S:** Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 17:388 (2005).
59. **Kawai T, Akira S:** TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13:816 (2006).
60. **Kelsoe G:** The germinal center reaction. *Immunol. Today.* 16:324-326 (1995).
61. **Krieg AM:** CpG DNA: A pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol.,* 15(6):284-92 (1995).
62. **Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT:** Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res.,* 10:406-412 (2004).
63. **Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT:** TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 5:190-198 (2004).
64. **Lau ChM, Broughton Ch, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, Christensen SR, Shlomchik MJ, Viglianti GA, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A:** RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *JEM,* 202:1171–1177 (2005).
65. **Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A:** Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature,* 416:603-607 (2002).

66. **Lemaitre, B, E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann:** The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults, *Cell* 86 (1996) 973– 983
67. **Lenert P, Yasuda K, Busconi L, Nelson P, Fleenor C, Ratnabalasuriar RS, Nagy PL, Ashman RF, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A:** DNA-like class R inhibitory oligonucleotides (INH-ODNs) preferentially block autoantigen-induced B-cell and dendritic cell activation in vitro and autoantibody production in lupus-prone MRL-Fas(lpr/lpr) mice in vivo. *Arthritis Res Ther.* 11(3):R79 (2009).
68. **Liu YJ und Arpin C:** Germinal center development. *Immunol. Rev.* 156:111-26., 111-126 (1997).
69. **Lövgren T, Eloranta M-L, Bave U, Alm GV, Rönnblom L:** Induction of Interferon- $\alpha$  Production in Plasmacytoid Dendritic Cells by Immune Complexes Containing Nucleic Acid Released by Necrotic or Late Apoptotic Cells and Lupus IgG., 50:1861–1872 (2004).
70. **Macfarlane DE, Manzel L:** Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol.* 160(3):1122-1131 (1998).
71. **Marié I, Durbin JE, Levy DE:** Differential viral induction of distinct interferon- $\alpha$  genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.*, 17:6660-6669 (1998).
72. **Marshak-Rothstein A:** Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.*, 6:823-835 (2006).
73. **Martinson JA, Montoya CJ, Usuga X, Ronquillo R, Landay AL, Desai SN:** Chloroquine modulates HIV-1-induced plasmacytoid dendritic cell  $\alpha$  interferon: implication for T-cell activation. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(2):871-81 (2010).
74. **Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD:** Human lupus antibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest.*, 115(2):407-417 (2005).
75. **Medzhitov R, Janeway CA jr:** Innate immune recognition: mechanism and pathways. *Immunol Rev.*, 173:89-97 (2000).
76. **Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB:** Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J. Exp. Med.* 188, 2313-2320 (1998).

77. **Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A:** Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.*, 164:5998-6004 (2000).
78. **Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Möröy T:** Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet.* 25(2):177-181 (2000).
79. **Navratil JS, Ahearn JM:** Apoptosis, clearance mechanisms, and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr. Rheumatol. Rep.* 3, 191-198 (2001).
80. **O'Neill LAJ:** After the toll rush. *Science*, 303:1481-1482 (2004).
81. **O'Mahony DS, Pham U, Lyer R, Hawn TR, Liles WC:** Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci.* 5(1):1-8 (2008).
82. **Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ:** Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv. Immunol.* 76:227-324., 227-324 (2000).
83. **Pickering MC, Walport MJ:** Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. 39:133-141 (2000).
84. **Preble OT, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J:** Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leucocyte interferon. *Science* 216:429-431 (1982).
85. **Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, Goodnow CC, Carroll MC:** A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity.* 9, 721-731 (1998).
86. **Pulendran B, Kannourakis G, Nouri S, Smith KG, Nossal GJ:** Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature* 375, 331-334 (1995).
87. **Pulendran B, Van DR, Nossal GJ:** Immunological tolerance in germinal centres. *Immunol. Today* 18, 27-32 (1997).
88. **Rahman AH, Eisenberg RA:** The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol.* 28(2):131-143 (2006).
89. **Randers K:** TLR9 abhängige IFN- $\alpha$  Aktivierung durch apoptotische DNA in vivo: Bedeutung für die Entstehung des Systemischen Lupus Erythematoses bei Komplementdefizienz, *Biol.Diss. Lübeck* (2009).

90. **Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, Goodnow CC:** CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 376, 181-184 (1995).
91. **Rathmell JC:** Apoptosis and B cell tolerance. *Curr. Dir. Autoimmun.* 6:38-60., 38-60 (2003).
92. **Rönnblom LE, Alm GV, Öberg KE:** Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *J Intern Med.* 227(3):207-210 (1990).
93. **Rönnblom LE, Alm GV, Öberg KE:** Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Ann Intern Med.*, 115(3):178-83 (1991).
94. **Rönnblom L, Alm GV:** A Pivotal Role for the Natural Interferon  $\alpha$ -producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) in the Pathogenesis of Lupus. *J Exp Med.*, 194:F59–F63 (2001).
95. **Rönnblom L, Alm GV:** An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE. *Trends Immunol.*, 22:427-431 (2001).
96. **Rönnblom L, Pascual V:** The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus.* 17(5):394-399 (2008).
97. **Roos, A. et al.** Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 921-929 (2004).
98. **Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J:** Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med.*, 181(4):1557-61 (1995).
99. **Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, Foote LC, Wang Z, Stanger B, Cui H, Ju ST, Marshak-Rothstein A:** Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature* 374, 163-165 (1995)
100. **Rupert KL, Moulds JM, Yang Y, Arnett FC, Warren RW, Reveille JD, Myones BL, Blanchong CA, Yu CY:** The molecular basis of complete complement C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes. *J. Immunol.* 169, 1570-1578 (2002).
101. **Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S:** Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol.*, 34:2541-2550 (2004).
102. **Salem ML, Kadima AN, Cole DJ, Gillanders WE:** Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J Immunother.*, 28(3):220-8 (2005).

103. **Sato S, Takeuchi O, Fujita T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S:** A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *Int Immunol.*, 14:783-791 (2002).
104. **Satoh M, Reeves WH:** Induction of Lupus-associated Autoantibodies in BALB/c Mice by Intraperitoneal Injection of Pristane. *J Exp Med.*, 180:2341-2346 (1994).
105. **Satoh M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N:** Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.*, 441:106-110 (1998).
106. **Savill J, Fadok V:** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407:784-788 (2002).
107. **Schifferli JA, Steiger G, Schapira M:** The role of C1, C1-inactivator and C4 in modulating immune precipitation. *Clin. Exp. Immunol.* 60, 605-612 (1985).
108. **Schilling PJ, Kurzrock R, Kantarjian H, Gutterman JU, Talpaz M:** Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 68:1536-1537 (1991).
109. **Seo SJ, Mandik-Nayak L, Erikson J:** B cell anergy and systemic lupus erythematosus. *Curr. Dir. Autoimmun.* 6:1-20., 1-20 (2003)
110. **Shokat KM, Goodnow CC:** Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature*, 375:334-338 (1995).
111. **Skoberne M, Beignon AS, Larsson M, Bhardwaj N:** Apoptotic cells at the crossroads of tolerance and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289:259-92., 259-292 (2005).
112. **Stacey KJ, Young GR, Clark F, Sester DP, Roberts TL, Naik S, Sweet MJ, Hume DA:** The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J Immunol.* 170(7):3614-3620 (2003).
113. **Stone NM, Williams A, Wilkinson JD, Bird G:** Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency. *Br. J. Dermatol.* 142, 521-524 (2000).
114. **Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B:** Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection., *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:3516-3521 (2004)
115. **Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ:** The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25, 1271-1277 (1982).

116. **Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ:** A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 359-366 (2000).
117. **Thibault DL, Graham KL, Lee LY, Balboni I, Hertzog PJ, Utz PJ:** Type I interferon receptor controls B-cell expression of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and autoantibody production in a murine model of lupus. *Arthritis Res Ther.* 11(4):R112 (2009).
118. **Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D:** Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells., *J Exp Med.*, 177:1009-1020 (1993).
119. **Vallin H, Blomberg G, Alm GV, Cederblad B, Rönnblom LE:** Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp immunol*, 115:196-202 (1999).
120. **Vollmer J, Weeratna RD, Jurk M, Samulowitz U, McCluskie MJ, Payette P, Davis HL, Schetter C, Krieg AM:** Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation., *Immunology*, 113:212-223 (2004).
121. **Wallace DJ:** Chloroquine and cytokines. *J Rheumatol.* 24(10):2051-2052 (1997).
122. **Wenzel J, Tüting T:** Identification of type I interferon-associated inflammation in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus opens up options for novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol.* 16(5):454-63 (2007).
123. **Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ, Schlatter B, Schmitz F, Heit A, Bauer S, Hochrein H, Wagner H:** Endosomal Translocation of Vertebrate DNA activates Dendritic cells via TLR9-dependent and –independent pathways., *J Immunol.*, 174:6129-6136 (2005).
124. **Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y:** Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 28(4):313-314 (2001).
125. **Ytterberg SR, Schnitzer TJ:** Serum Interferon Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism.* 25:401-406 (1982).
126. **Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS:** Effect of cytofectins on the immune response of murine macrophages to mammalian DNA. *Immunology.*, 109(2):255-62 (2003).

## VI **Publikationen und Kongressbeiträge**

### **Publikationen:**

**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- $\alpha$  and TLR9 via a positive feedback mechanism. Eingereicht.

### **Kongressbeiträge:**

**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 2008.

**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 2007.

### **Poster:**

**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 2008.

## VII Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. med. Siegfried Görg für die Bereitstellung des Themas und der Forschungsmaterialien, die Ideen und die unermüdliche konstruktive Kritik.

Ich danke meiner Arbeitsgruppe für die schöne Zusammenarbeit, insbesondere Kirsten Jacobsen, die mir in allen methodischen Fragen stets gerne mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie Doreen Finke, die mir zu Beginn das Thema näher brachte und mich selbst als sie die Arbeitsgruppe bereits verlassen hatte nicht im Stich ließ.

Nicht zu vergessen Katharina Randers, von deren Untersuchungen sich auch in meiner Arbeit sehr viel wieder findet. Erst durch die anregenden Diskussionen mit ihr und dem Zusammenführen unserer Teilergebnisse war es mir letztendlich möglich, meine Arbeit in dieser Form fertig zu stellen.

Ich danke meinen Eltern, durch deren Erziehung und Vorbild ich zu der Frau wurde, die ich heute bin, und die mir immer wieder vor Augen führten, dass es nichts bringt, Dinge auf die lange Bank zu schieben. Auch danke ich meinen Brüdern, von denen jeder auf seine Weise zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke meinen Freunden, die mich in Momenten kreativer Sackgassen auf andere Gedanken brachten und mich stets ermutigten, nicht aufzugeben.

## VIII Lebenslauf



### PERSÖNLICHE DATEN

Name	Telja Pursche
Geburtsdatum	19.02.1983

### BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 03/2009	Assistenzärztin an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH, Campus Lübeck
--------------	--

### HOCHSCHULSTUDIUM

2006-2011	Anfertigen der Dissertation am Institut für Transfusionsmedizin an der Universität zu Lübeck
10/2008	Staatsexamen (zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung)
08/2007 – 07/2008	Praktisches Jahr (PJ)
2004 – 2008	Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck, klinischer Teil
08/2004	Physikum (Ärztliche Vorprüfung)
2002 – 2004	Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck, Vorklinik

### SCHULABSCHLUSS

2002	Abitur am Hölty Gymnasium Wunstorf
------	------------------------------------