

Endogene Immunstimulation durch zelluläre DNA bei HIV-1 Infektionen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Im Fachbereich 10, Mathematik und Naturwissenschaften
Universität Kassel

Durchgeführt am Virologischen Institut
Universitätsklinikum Erlangen

von

Philipp Moritz Ries

aus Karlsruhe

Vorgelegt

Oktober 2012

Prüfungskommission:

Prof. Dr. Markus Maniak

Prof. Dr. Barbara Schmidt

Prof. Dr. Hellmuth Zöltzer

Prof. Dr. Wolfgang Nellen

Datum der Prüfung: 13.11.2012

And for every question an answer is found

thousands of voices are screaming new questions out loud

-vanCanto

1	Zusammenfassung	5
2	Summary	6
3	Einleitung	8
4	Ziel der Arbeit	16
5	Material und Methoden	17
5.1	Material.....	17
5.2	Methoden.....	27
5.3	Statistische Auswertung.....	37
6	Ergebnisse	39
6.1	Immunstimulatorische Kapazität zellulärer DNA Spezies.....	39
6.2	Interferon- Induktion durch mitochondriale CpG-Inseln.....	44
6.3	Identifikation und Charakterisierung mitochondrialer ODN.....	52
6.4	Das mitochondriale Oligodeoxynukleotid mt2234_31.....	61
7	Diskussion	75
7.1	Effekte verschiedener DNA Spezies.....	75
7.2	CpG-reiche Abschnitte der mtDNA.....	76
7.3	Charakterisierung der mitochondrialen Oligodeoxynukleotide.....	77
7.4	Migration und Maturation PDC durch mtODN.....	79
7.5	Anheftung von mtODN an Zellen im peripheren Blut.....	79
7.6	Aufnahme von mtODN2234_31 in Zellen.....	81
7.7	Aufnahme der DNA als Protein/DNA Komplex.....	82
8	Literaturverzeichnis	86
9	Verzeichnis der Vorveröffentlichungen	95
10	Abkürzungsverzeichnis	96
11	Lebenslauf	98
12	Danksagung	99
13	Erklärung	100

1 Zusammenfassung

Endogene Gefahrensignale, die das Immunsystem aktivieren, sind ein neues Konzept der Immunbiologie. Sie spielen eine Rolle für eine Vielzahl von viralen und bakteriellen Erkrankungen und werden als massgebliche Ursache für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen diskutiert.

Diese Arbeit testet die Hypothese, dass fragmentierte mitochondriale DNA (mtDNA) immunstimulatorische DNA-Motive beinhaltet, die in der Lage sind, eine Immunantwort durch plasmazytoide dendritische Zellen (PDC, engl. *plasmacytoid dendritic cells*) zu vermitteln. Daher wurden mtDNA und genomische DNA aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) und Thrombozyten isoliert. Diese DNA-Spezies wurde mithilfe des liposomalen Transfektionsreagenzes DOTAP in PBMC transfiziert und die Immunaktivierung anhand des Interferon-alpha Spiegels im Zellkulturüberstand gemessen. Beide DNA-Spezies induzierten eine vergleichbare Interferon-Produktion. Eine Verkürzung der mtDNA zu CpG-Inseln verstärkte die immunstimulatorische Kapazität, abhängig vom Vorhandensein unmethylierter CpG-Motive. Die Komplexierung der CpG-Inseln mit dem humanem Cathelicidin LL-37 führte auch ohne DOTAP Transfektion zu einer Interferon-Antwort. Ein weiteres Verkürzen der mtDNA zu mitochondrialen Oligodeoxynukleotiden (mtODN) mit Sequenz- und Strukturähnlichkeiten zu kommerziellen CpG-ODN, lieferte Sequenzen mit starker Interferon-Induktion und der Fähigkeit, PDC zu maturieren und migrieren. Insbesondere waren zwei mtODN mit Doppelpalindromstruktur in der Lage, PDC spontan ohne Transfektion oder als Immunkomplex zu aktivieren. Durchflusszytometrie, Lebendzell- und konfokale Laserscanningmikroskopie zeigte die Anheftung und Aufnahme eines der mtODN in endosomale Kompartimente und Kolo-kalisation mit TLR9. Auch konnte eine schwache aber signifikante PDC-, B-Zell- und NK-Zell- Aktivierung durch dieses ODN gezeigt werden.

Zusammengefaßt deuten unsere Daten darauf hin, dass fragmentierte mitochondriale DNA aus apoptotischen oder nekrotischen Zellen als Gefahrensignal für das

Immunsystem fungieren kann und so über Stimulation von PDC zur akuten oder chronischen Immunaktivierung und damit zur Immunpathogenese von HIV-Infektionen beitragen kann.

2 Summary

Endogenous danger signals, which activate the immune system, are a novel concept in immunobiology. They are discussed as causative or supporting agent in a plethora of viral and bacterial infections and autoimmune diseases.

This study tested the hypothesis that mitochondrial DNA (mtDNA) fragments carry immunostimulatory motifs that naturally induce immune activation by plasmacytoid dendritic cells (PDC). For these purposes, mtDNA and genomic DNA were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and platelets. After transfection into PBMC using the liposomal transfection reagent DOTAP, the immune activation was measured as induction of interferon alpha in the cell culture supernatants. Both DNA species induced similar interferon (IFN)-alpha production. Shortening of mtDNA to CpG islands enhanced the immunostimulatory activity, based on the presence of unmethylated CpG DNA motifs. Notably, the addition of the human cathelicidin LL-37 to CpG islands induced spontaneous PDC IFN-alpha production. Further shortening of mtDNA into mitochondrial oligodeoxynucleotides (mtODN), which exhibited similarities to commercial CpG ODN, resulted in a strong immunostimulatory activity in addition to induction of PDC maturation and migration markers. Specifically, two doublestranded phosphodiester mtODN with a double-palindromic structure induced IFNalpha production in the absence of DOTAP. Flow cytometry, life-cell and confocal imaging revealed attachment and spontaneous uptake of one of these mtODN into PDC, colocalizing with Toll-like receptor 9 in early endosomal vesicles. This process was accompanied by a moderate, but significant PDC maturation in addition to B cell and natural killer cell activation. Altogether, our data indicate that fragmented mtDNA, which may be released as a consequence of apoptotic, necrotic, and necroptotic cell death, can act as damage-associated molecular pattern. For the first time, our study provides a mechanism how longer and shorter mtDNA fragments can naturally be taken

up by the PDC. The resulting acute and chronic immune activation may be an important factor in the HIV-1 immunopathogenesis.

3 Einleitung

Im Sommer 1981 wurden vermehrt Fälle homosexueller Männer mit einer opportunistischen *Pneumocystis carinii* Infektion im Rahmen einer erworbenen Immunschwäche (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) in Los Angeles, USA beschrieben (Girard et al., 2011). Dieser Ausbruch opportunistischer Infektionen kennzeichnete den Beginn der weltweiten AIDS-Epidemie, die in den letzten 30 Jahren über 25 Millionen Tote gefordert hat. Im Jahr 1983 wurde ein Retrovirus als auslösendes Agens durch den Direktor des Pasteur-Instituts in Paris, Luc Montagnier und Robert Gallo, dem Leiter des Tumorstoff-Labors an den *National Institutes of Health*, beschrieben (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983; Girard et al., 2011). 1986 wurde die Nomenklatur vereinheitlicht und das beschriebene humane T-Zell-Leukämie-Virus III (HTLV III), das AIDS-assoziierte Retrovirus (ARV) und das Lymphadenopathie-assoziierte Virus (LAV) in HIV (engl. *Human Immunodeficiency Virus*) umbenannt (Levy et al., 1984). Ebenfalls im Jahr 1986 wurde ein weiteres HI-Virus (HIV-2) bei afrikanischen AIDS-Patienten beschrieben (Clavel et al., 1986). Somit unterteilte man ab diesem Zeitpunkt das HI-Virus in HIV-1 und HIV-2, welche wiederum in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Bei HIV-1 werden vier Gruppen unterschieden: M (*Major*), O (*Outlier*), N (*Non M, non O*) sowie P. Weltweit ist Gruppe M am weitesten verbreitet und divers. Sie wird weiter in zehn Subtypen (A-K) differenziert, wobei Subtyp C mit fast 50% aller Infektionen der häufigste Subtyp ist (Girard et al., 2011).

Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmungen mit dem SIV (engl. *Simian Immunodeficiency Virus*) aus Primaten, ließen sich vier unabhängige Übertragungen von Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) auf den Menschen zeigen (HIV-1 Gruppe M, N und O). Die HIV-1 Gruppe P weist dagegen einen hohen Verwandtschaftsgrad mit SIV_{gor}, durch Gorillas (*Gorilla gorilla*) übertragen, auf. HIV-2 ist eine Zoonose aus der Rußmangabe (*Cercocebus atys*) (Girard et al., 2011).

HIV ist Mitglied der Familie Retroviridae und der Gattung Lentiviren. Das Virion misst ca. 100nm im Durchmesser, das Genom ist etwa 9,8 Kilobasenpaare groß. Klassisches

Charakteristikum dieser Viren ist das Kapsid, mit einem diploiden, ungespleißten +Strang RNA Genom (Levy, 1993). Die RNA weist die für eukaryonte mRNA übliche Struktur mit 5'-Cap und 3'-polyA auf (Whitcomb and Hughes, 1992). Zudem finden sich im Kapsid die Reverse Transkriptase (RT), Integrase und Protease wieder. Auf der Oberfläche des umhüllten Virions dient das Env-Glykoprotein, bestehend aus dem Oberflächenprotein gp120 und dem Transmembranprotein gp41, zur Bindung an CD4 und einem Korezeptor an der Zielzelle.

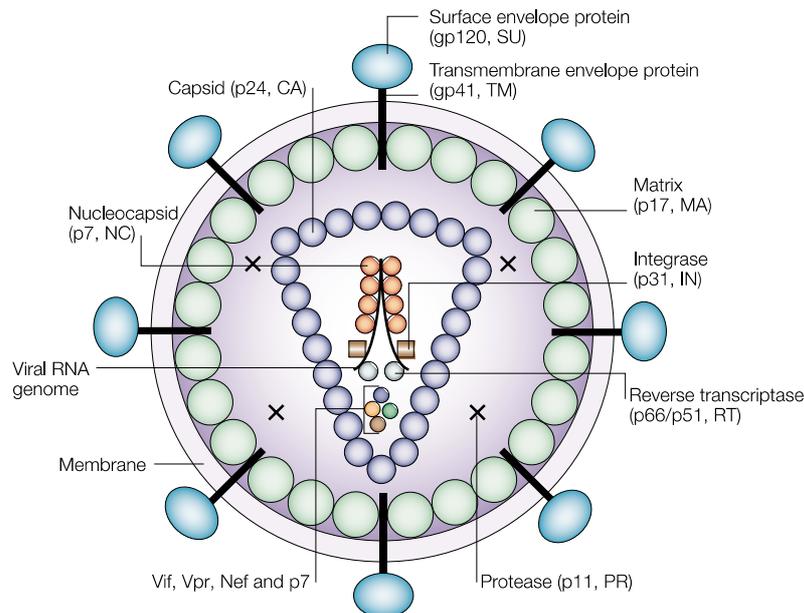


Abbildung 1 Morphologie HIV-1 (Robinson, 2002)

Das Genom kodiert für neun virale Gene in drei Leserahmen. Dazu gehören die drei Strukturgene *gag* (engl. *group-specific antigen*), *pol* (engl. *polymerase*) und *env* (engl. *envelope*). *Env* und *gag* kodieren für die Hüllproteine bzw. das Nukleokapsid. *Pol* (gp180) bildet Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Kapsid (CA), Matrix (MA) und Link-Protein (LI) werden aus dem Vorläuferprotein Pr55 aus *gag* proteolytisch gespalten. *Env* wird zu gp120 und gp41 prozessiert. Daneben sind sechs regulatorische und akzessorische Gene kodiert, *tat*, *vif*, *nef*, *vpr*, *vpu* und *rev*. *Tat* und *rev* sind regulatorische Proteine für Transkription und Export neusynthetisierter viraler RNA in das Zytoplasma (Freed, 2001). *Nef* reguliert CD4 und HLA-Klasse-I auf infizierten Zellen herab; eine Rolle für die AIDS-Pathogenese wird diskutiert (Kirchhoff, 2009). *Vpr* ist wichtig für den Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern, *vpu* spielt eine

Rolle bei der Verpackung viraler Proteine und Knospung von der Zelloberfläche. *Vif* ist Antagonist des zellulären Restriktionsfaktors APOBEC-3G (engl. *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3*), der sonst zu einer Hypermutation des viralen Genoms führen und es folglich inaktivieren würde (Mangeat et al., 2003).

Neben CD4 auf der Zielzelle sind zwei Korezeptoren für die Infektion *in vivo* essentiell. CXCR4 (CD184) (Feng et al., 1996) und CCR5 (CD197) (Deng et al., 1996). Isolate, welche CCR5 als Korezeptor verwenden, infizieren überwiegend Makrophagen und *Memory T*-Zellen in Schleimhäuten (Asjö et al., 1986; Collman et al., 1989), das CXCR4 Molekül findet sich hingegen auf CD4⁺ T-Zellen. Anhand der Nutzung der Korezeptoren werden HIV-1 Isolate als X4- bzw. R5-trop eingeteilt (Feng et al., 1996). Eine sexuelle Transmission von HIV findet – soweit bekannt – fast ausschließlich über R5-trope Viren statt, X4-trope Viren finden sich erst im späteren Verlauf der Krankheit und sind mit einer Progression zu AIDS assoziiert (Tripathi and Agrawal, 2007).

Auch wenn eine Abnahme der CD4-Zellzahl mit der Progression, der Infektion und schließlich AIDS korreliert, ist der Grund des Helferzell-Abfalls noch Gegenstand der Forschung. Nach dem aktuellen Seneszenzmodell ist die Zahl der CD4⁺-Zellen, die gebildet werden können, begrenzt. Die andauernde Immunaktivierung und der resultierende hohe Zytokinpiegel im Blut führen zu einer wiederholten T-Zell-Stimulation (Appay et al., 2007). Deren klonale Vermehrungskapazität ist jedoch limitiert (Effros et al., 2003). Ebenso kann es zur aktivierungsbedingten Apoptose von T-Zellen kommen. So verursachen erhöhte IL-6 Spiegel, wie sie in HIV-Patienten vorhanden sind, die Apoptose unreifer Thymuszellen (Haynes et al., 2000), während inflammatorische Prozesse Fibrose von lymphatischem Gewebe herbeiführen können. Das führt dann zu einer verminderten Kapazität, T-Zellen neu zu bilden. Ein weiterer Faktor ist die andauernde Produktion des antiviralen Zytokines Interferon-alpha, das im Blut vorwiegend von den plazmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) gebildet wird. Die Aktivierung der PDC erfolgt dabei überwiegend durch HIV-infizierte Zellen und weniger durch das Virus selbst (Schmidt et al., 2005; Lepelley et al., 2011). Interferon-alpha reguliert das Apoptose-verursachende Molekül TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) in löslicher und membrangebundener Form sowie dessen Ligand DR5 (engl. *death receptor 5*) auf HIV-stimulierten Zellen hoch (Herbeuval and Shearer, 2007).

Da nur etwa 1% der HI-Virionen überhaupt infektiös sind (Dimitrov et al., 1993; Girard et al., 2011), wird der Großteil der T-Zell-Apoptose durch nicht-infektiöse Viruspartikel vermittelt, die immer noch Interferon-alpha induzieren können. Durch diesen Mechanismus werden neben infizierten auch uninfizierte T-Zellen in die Apoptose getrieben. Somit wird eher eine Überreaktion des Immunsystems als Ursache für AIDS bei der HIV-1 Infektion diskutiert denn Effekte des Virus selbst.

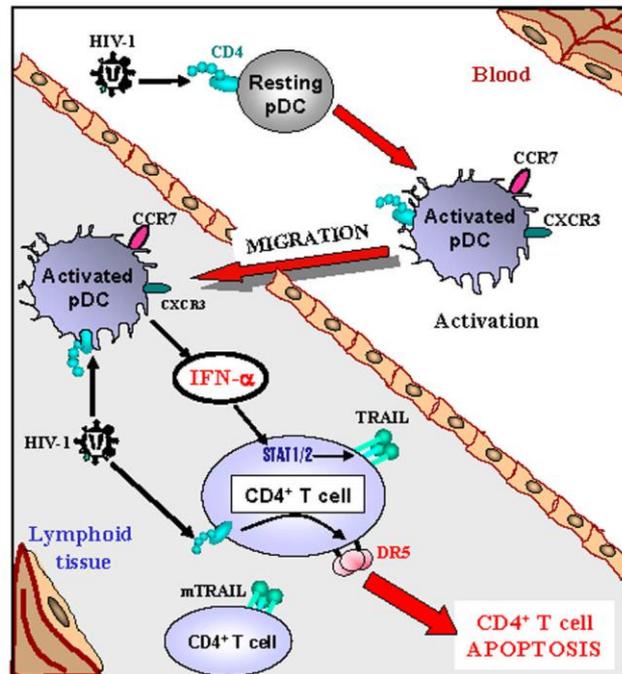


Abbildung 2 Model der T-Zell Apoptose in HIV (Herbeuval and Shearer, 2007)

Weiter unterstützt wird diese Hypothese durch Vergleiche der HIV-1-Pathogenese mit dem Verlauf von Infektionen mit pathogenen und nicht-pathogenen SI-Viren bei Affenspezies (Kirchhoff, 2009). Infektionen, die während der chronischen Phase eine dauerhafte Immunaktivierung und Interferon-alpha Ausschüttung etablieren, führen zu einer dysregulierten Immunantwort und schließlich zu AIDS. Die molekularen Ursachen dieses Effektes sind ebenfalls noch Gegenstand der Forschung (Levy et al., 1984; Herbeuval, 2005; Sary et al., 2009). Ein weiterer Aspekt der Immunaktivierung ist die Depletion von T-Zellen im gastrointestinalen Trakt, verbunden mit einer erhöhten Durchlässigkeit für mikrobielle Erreger. Diese exprimieren sogenannte Musterantigene (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Besonders bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), aber auch bakterielle DNA, werden als Agens für eine

Aktivierung des Immunsystems und eine weitere Freisetzung proinflammatorischer Zytokine betrachtet.

Plasmazytoide dendritische Zellen sind maßgeblich für die Produktion von Interferon-alpha im Blut verantwortlich. 1999 wurde diese Zellpopulation von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben (Clavel et al., 1986; Cella et al., 1999; Siegal, 1999). Zunächst wurden sie als Zellen innerhalb der mononukleären Zellen im peripheren Blut (PBMC, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) identifiziert, die HLA-DR⁺, CD4⁺, CD45RA⁺ sowie CD123⁺ exprimierten (Olweus et al., 1997; Girard et al., 2011), aber negativ für Linienmarker (CD3⁻, CD14⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD20⁻, CD56⁻) waren. Inzwischen sind zwei PDC-spezifische Marker beschrieben, BDCA-2 (CD303) und BDCA-4 (CD304) (engl. *blood dendritic cell antigen*) (Dzionek et al., 2000). PDC exprimieren die beiden endosomalen Toll-ähnlichen Rezeptoren TLR7 und TLR9 für die Detektion viraler Nukleinsäuren und stellen mit ihrer Zytokinsekretion ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Eine Rolle der PDC bei Autoimmunkrankheiten (systemischer Lupus erythematodes, Polymyositis, Psoriasis und Systemischer Sklerose) wird beschrieben (Whitcomb and Hughes, 1992; Lande et al., 2007; Ronnblom and Pascual, 2008; Finke et al., 2009).

Die Detektion konservierter molekularer Muster von Pathogenen sowie von körpereigenen Gefahren-Signalen durch geschädigte Zellen, sogenannter DAMP (engl. *damage associated molecular patterns*), durch das angeborenen Immunsystem erfolgt unter anderem durch Toll-ähnliche Rezeptoren (engl. *Toll-like receptors*, TLR). Die TLR sind dabei spezifisch für konservierte Charakteristika von Pathogenen, wie z.B. Lipopolysaccharide oder Peptidoglykane in bakterieller Zellwand (Robinson, 2002; Takeda, 2004; Barchet et al., 2005; Uematsu and Akira, 2006). Bisher wurden 13 TLR beschrieben, davon zehn im Menschen (TLR1- TLR10). TLR10 ist im murinen System nicht funktionell, dafür werden dort TLR11/12/13 exprimiert (Wolowczuk et al., 2008; Kirchhoff, 2009).

Der zytoplasmatische Teil der TLR ähnelt dem der Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor Familie und wird daher als TIR (Toll/Interleukin-1 Rezeptor) Domäne bezeichnet. Der extrazelluläre Teil beinhaltet Leucin-reiche-Elemente (engl. *leucin rich repeats*, LRR),

bestehend aus 19-25 Kopien des LLR und formt eine hufeisenförmige Tertiärstruktur (Akira, 2003). Der intrazelluläre Signalweg erfolgt entweder über MyD88 (engl. *myeloid differentiation primary-response protein 88*) oder TRIF (engl. *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta*). Im MyD88-Weg dimerisieren die TIR-Domänen des TLR und MyD88, was zur Rekrutierung der Interleukin-1R assoziierten Kinase IRAK-4 führt, die wiederum IRAK-1 phosphoryliert. IRAK-1 bindet an TRAF6, ein weiteres Adapterprotein, das zwei Signalwege aktiviert. Ein Weg aktiviert den Transkriptionsfaktor IRF-7 (engl. *Interferon regulatory factor 7*), der in den Zellkern transloziert und dort die Gene für Interferon-alpha und Interferon-beta aktiviert. Der andere Weg aktiviert den I κ B Kinasekomplex aus IKK-alpha und IKK-beta sowie der regulatorischen Untereinheit IKK-gamma (engl. *NF-Kappa essential modulator*, NEMO). Phosphorylierung und Freisetzung von NF κ B führen zur Expression proinflammatorischer Zytokine (Mangeat et al., 2003; Uematsu and Akira, 2006). Der MyD88-abhängige Signalweg führt zur Sekretion von Interferonen, über die Interaktion von TRIF mit TBK1 (engl. *tank binding kinase*) und IKKi wird IRF-3 aktiviert. IRF-3 wandert daraufhin in den Zellkern und aktiviert den Interferon-Promotor. Mit Ausnahme von TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, also den für Nukleinsäuren spezifischen TLR, die im Endosom lokalisiert sind, sind alle anderen TLR auf der Plasmamembran lokalisiert und somit frei zugänglich (Feng et al., 1996; Ishii and Akira, 2006). Bei den endosomalen TLR wird ein Mechanismus postuliert, der den Transport der TLR aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Endosom zu den aufgenommenen Liganden über das Protein UNC93B1 vermittelt (Deng et al., 1996; Brinkmann et al., 2007). Neben der TLR-Familie wurden bislang zwei weitere Familien zytosolischer RNA-Rezeptoren (RIG-I ähnliche Rezeptoren) (engl. *Rig-I-like receptors*, RLR) und NOD-1 ähnlicher Rezeptoren (engl. *Nod-like receptors*, NLR) beschrieben. Eine Rolle zytoplasmatischer DNA-Sensoren für die Interferon-Produktion in PDC wird noch diskutiert (Asjö et al., 1986; Collman et al., 1989; Kawasaki et al., 2011).

Ligand für den in PDC endosomal exprimierten TLR9 sind sogenannte CpG-Motive, bestehend aus unmethylierten Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden, wobei das optimale Hexamer aus „CG“ mit zwei 5'-Purinen und zwei 3'-Pyrimidinen besteht. Die Sequenz ist das klassische 5'-GACGTT-3' im humanen bzw. 5'-GTCGTT-3' im murinen System (Krieg et al., 1995; Feng et al., 1996; Hemmi et al., 2000; Krieg, 2001; Kadowaki and Liu, 2002;

Appay et al., 2007; Tripathi and Agrawal, 2007; Netea et al., 2011). Im Gegensatz dazu sind am 5'- Kohlenstoffatom des Cytosins methylierte CpG-Motive nicht immunstimulatorisch. Unmethylierte CpG-Motive in genomischer DNA finden sich überwiegend in Promotorregionen, wo sie nur zu 30 - 40% statt 70% methyliert sind (Dörfler, 1981; Effros et al., 2003). Statistische Häufungen von CG-Motiven werden als „CpG-Insel“ bezeichnet. Definierendes Charakteristikum dieser Inseln sind sieben oder mehr CGs auf 200 Basenpaare und ein C+G-Gehalt von über 50% (Gardiner-Garden and Frommer, 1987; Haynes et al., 2000).

Ausgehend von den immunstimulatorischen Eigenschaften werden vier Klassen synthetischer Einzelstrang-CpG-Oligodeoxynukleotide unterschieden. CpG-A, mit dem optimalen CpG-Hexamer, zeichnet sich durch einen palindromen Mittelteil, ein Poly-G-Motiv am 3'-Ende sowie Phosphorothioat-Enden aus. CpG-A (auch D-Typ) führt zu einer starken PDC Aktivierung und Interferon-Freisetzung. CpG-B (auch K-Typ) aktiviert Natürliche Killer (NK)- und B-Zellen, was zu einer TH₁-gewichteten Immunantwort und der Freisetzung von TNF-alpha, IL-6 und einer effektiven Anti-Tumor Reaktion führt. CpG-B Oligonukleotide besitzen mehrere „CG“-Motive und palindrome Abschnitte. CpG-C vereinigen die Effekte von CpG-A und CpG-B und aktivieren sowohl PDC als auch NK- und B-Zellen (Krieg, 2001; Vollmer et al., 2004; Schmidt et al., 2005; Lepelley et al., 2011). Eine neue Klasse der CpG-ODN, CpG-P (Herbeval and Shearer, 2007; Donhauser et al., 2010; Samulowitz et al., 2010) zeichnet sich durch eine Doppelpalindromstruktur und die Fähigkeit aus, Sekretion von Interferon-alpha und antiviralen sowie antibakteriellen Chemokinen auch in immunsupprimierten Patienten zu vermitteln (Donhauser et al., 2010). Synthetische CpG-ODN bestehen zumindest teilweise aus einem Phosphorothioat-Rückgrat, um sie resistent gegen Nukleasen zu machen. Ein Nebeneffekt dieser Modifikation ist eine um Faktor 10 -100fach erhöhte Bindung an TLR9, was zu einer IFN-alpha Ausschüttung auch ohne „klassisches“ CpG-Motiv führen kann (Sester et al., 2000; Yasuda et al., 2006).

Gemäß der Endosymbiontentheorie (Sagan, 1967) ist das mitochondriale Genom in eukaryontischen Zellen bakteriellen Ursprungs und damit eine mögliche Quelle unmethylierter, bakterieller DNA. Das humane mitochondriale Genom besteht aus 16569 Basenpaaren und kodiert für zwei rRNA, 22tRNA und 13 Proteine, allesamt Teil

der Atmungskette (Taanman, 1999). Die tRNA sind nicht identisch mit den genomischen tRNA. Folglich weicht auch die Kodierung der Aminosäuren von den „klassischen“ Triplets ab (Osawa et al., 1992). Das mitochondriale Genom ist zu über 95% nicht methyliert, wobei die Anzahl der mitochondrialen DNA von hundert bis zu tausend Kopien in einer Zelle variiert (Schmookler Reis and Goldstein, 1983) .

Interferone wurden 1957 von Isaacs und Lindenmann (Isaacs and Lindenmann, 1957) im Rahmen ihrer Influenzavirus-Forschung als Substanz entdeckt, die Zellen vor viraler Infektion schützen kann und mit viraler Replikation interferiert. Bislang sind drei Klassen an Interferonen beschrieben, die sich über die verwendeten Rezeptoren unterscheiden. Typ I-Interferone, darunter Interferon-alpha mit 14 bekannten Genen und über 22 Genprodukten (Foster and Finter, 1998), und Interferon-beta, die auf den Interferon-alpha Rezeptor wirken; ein einzelnes Typ II-Interferon, nämlich Interferon-gamma, sowie die Typ III- oder Lambda-Interferone, auch bekannt als Interleukin-28a/b und Interleukin-29 (Pestka et al., 2004). Die starke antivirale Wirkung der Typ I-Interferone beruht auf drei Mechanismen: Die Aktivierung der Proteinkinase R führt zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese, während die Hochregulierung der 2'-5'-Oligoadenylatsynthase die Endonuklease L aktiviert und Degradation viraler RNA verursacht (Fitzgerald-Bocarsly et al., 2008). Die Mx-Protein Familie vermittelt den Abbau zytosolischer viraler Proteine (Haller et al., 1981). Interferon vermittelt neben den direkt antiviralen Effekten auf Zellen allerdings auch eine Th₁ oder Th₂ polarisierte adaptive Immunreaktion - abhängig von kostimulatorischen Signalen vermittelt es somit eine starke antikörpervermittelte Immunantwort (Th₂) oder aktiviert zytotoxische T-Zellen (Th₁) (Fitzgerald-Bocarsly and Feng, 2007) und maturiert dendritische Zellen. Interferone dienen dementsprechend als allgemeines Warnsignal des angeborenen Immunsystems.

4 Ziel der Arbeit

Die chronische Aktivierung des Immunsystems wird als treibende Kraft hinter der HIV-Pathogenese und der Entwicklung zu AIDS angesehen. Von PDC sezernierte Typ-I Interferone tragen maßgeblich zu dieser dauerhaften Stimulation bei. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht nur HIV-Partikel selbst (Beignon, 2005; O'Brien et al., 2011; Pritchet et al., 2012), sondern besonders HIV-infizierte Zellen (Schmidt et al., 2005; Lepelley et al., 2011) PDC zu einer starken Interferon-alpha Antwort veranlassen können. Eine ständige chronische Stimulation des Immunsystems wird auch ohne Vorhandensein eines Pathogenes bei einer Reihe Autoimmunkrankheiten als Ursache diskutiert (Rönnblom et al., 2006; Finke et al., 2009).

Als Quelle endogener TLR9 Liganden, also unmethylierter CpG-Motive, kommt neben der überwiegend methylierten genomischen DNA im Zellkern die ursprünglich bakterielle mitochondriale DNA in Frage. Ziel der Arbeit war daher, die immunstimulatorische Kapazität genomischer und mitochondrialer DNA zu vergleichen und Sequenzen im mitochondrialen Genom sowie Mechanismen zu identifizieren, die einen besonders starken Anteil an der chronischen Immunstimulation in HIV und möglicherweise bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten spielen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Verwendete Antikörper

FACS

Tabelle 1 : Verwendete Durchflusszytometrieantikörper

Antigen	Konjugation	Klon	aus Spezies	Klasse	Bezugsquelle
CD3	FITC	SK7	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD3	PE	SK7	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD3	PE-Cy5	UCHT1	Maus	IgG1	AbD Serotec (Düsseldorf)
CD3	Alexa Fluor700	UCHT1	Maus	IgG1	Biozol (Eching)
CD3	Pacific Blue	UCHT1	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD4	PE-Cy7	SK3	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD4	PE	RPA-T4	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD8	APC	Mem-31	Maus	IgG1	ImmunoTools (Friesoythe)
CD8	APC-H7	SK1	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD11c	PE-Cy5	B-ly6	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD14	PE-Cy5	61D3	Maus	IgG1	AbD Serotec (Düsseldorf)
CD19	PE	LT19	Maus	IgG1	ImmunoTools (Friesoythe)
CD20	APC	LT20	Maus	IgG1	ImmunoTools (Friesoythe)
CD56	PE	HVD56	Maus	IgG1	Biolegend (Fell)
CD69	FITC	FN50	Maus	IgG1	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD69	Alexa Fluor700	FN50	Maus	IgG1	Biozol (Eching)
CD80	FITC	MEM-233	Maus	IgG1	ImmunoTools (Friesoythe)
CD83	FITC	HB15e	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD83	Alexa Fluor700	HB15e	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD123	PE	AC145	Maus	IgG2a	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD197	FITC	150503	Maus	IgG2a	R&D Systems (Wiesbaden)
CD197	PE	150503	Maus	IgG2a	eBioscience (Frankfurt)
CD303	FITC	AC144	Maus	IgG1	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
CD304	APC	AD5-17F6	Maus	IgG1	Miltenyi (Bergisch Gladbach)

Antigen	Konjugation	Klon	aus Spezies	Klasse	Bezugsquelle
CD304	PE	AD5-17F6	Maus	IgG1	Miltenyi (Bergisch Gladbach)

Tabelle 2: Verwendete Isotypen

Konjugation	Klon	aus Spezies	Klasse	Bezugsquelle
Alexa Fluor700	MOPC-21	Maus	IgG1	Biozol (Eching)
PacificBlue	MOPC-21	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
FITC	MOPC-21	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
PE	MOPC-21	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
APC	PPV-06	Maus	IgG1	ImmunoTools (Friesoythe)
FITC	PPV-04	Maus	IgG2a	ImmunoTools (Friesoythe)
PE-Cy5	MCA928C	Maus	IgG1	AbD Serotec (Düsseldorf)
APC-H7	MOPC-21	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)
PE-Cy7	MOPC-21	Maus	IgG1	BD Pharmingen (Heidelberg)

Immunfluoreszenz

Tabelle 3: Primärantikörper

Antigen	Konjugation	Klon	aus Spezies	Bezugsquelle	Eingesetzte Verdünnung
TLR-9	Alexa488	26c593.2	Maus	Biomol (Hamburg)	1:20
EEA-1	Unkonjugiert	Polyklonal	Kaninchen	NEB (Frankfurt)	1:100

Tabelle 4: Konjugierte Zweitantikörper

Gegen Spezies	Spezies	Form	Konjugation	Bezugsquelle	Eingesetzte Verdünnung
Kaninchen	Ziege	F(ab) ₂	Alexa 488	Invitrogen (Darmstadt)	1:500
Kaninchen	Ziege	F(ab) ₂	Alexa 555	Invitrogen (Darmstadt)	1:500
Kaninchen	Ziege	F(ab) ₂	Alexa 633	Invitrogen (Darmstadt)	1:500
Maus	Ziege	F(ab) ₂	Alexa 488	Invitrogen (Darmstadt)	1:500
Maus	Ziege	F(ab) ₂	Alexa 555	Invitrogen (Darmstadt)	1:500
Maus	Ziege	F(ab) ₂	Alexa 633	Invitrogen (Darmstadt)	1:500
Human	Ziege	F(ab) ₂	FITC	Dianova (Hamburg)	1:1000
Human	Ziege	F(ab) ₂	Dylight649	Dianova (Hamburg)	1:1000
Biotin			TRITC	AbD Serotec (Düsseldorf)	1:1000

5.1.2 Verwendete Oligonukleotide

Primer für die Amplifikation der CpG-Inseln:

Tabelle 5: Verwendete Primer für Amplifikation der CpG-Inseln

Name des Primers	Sequenz des Primers	Name des Amplifikates	Annealing [°C]
mtDNA_2107_s	5'-CCTGCCCGTGAAGAGGC-3'	mt2107_250	57
mtDNA_2357_as	5'-CCTAGGGTAACTTGTTCGGTTGG-3'		
mtDNA_2158_s	5'-AACCTCCGAGCAGTACATGC-3'	mt2158_489	57
mtDNA_2647_as	5'-CTCTGCCATCTTAACAAACCC-3'		
mtDNA_7171_s	5'-TAGAAACCGTCTGAACTATC-3'	mt7171_421	51
mtDNA_7611_as	5'-CCACAGATTTCAAGAGCATT-3'		
mtDNA_15761_s	5'-CACATTACAGTCAAATCCCT-3'	mt15761_727	48
mtDNA_16487_as	5'-TTGTATTGATGAGATTAGTA-3'		
mtDNA_2998_s	5'-CGCCCCGACCTTAGCTC-3'	mt2998_356	55
mtDNA_3354_as	5'-TCTGCTAGTGTGGAGATAAATCATATTA-3'		
mtDNA_5927_s	5'-CGCCGACCGTTGACTATTC-3'	mt5927_533	55
mtDNA_6460_as	5'-GGTATTGGGTTATGGCAGGG-3'		
mtDNA_2191_s	5'-AAACCCACAGGTCCTAAACTACCA-3'	mt2191_166	55
mtDNA_2357_as	5'-CCTAGGGTAACTTGTTCGGTTGG-3'		
mtDNA_2107_s	5'-CCTGCCCGTGAAGAGGC-3'	mt2107_106	55
mtDNA_2213_as	5'-GTAGTTTAGGACCTGTGGGTTTGTAG-3'		

Verwendete mtODN:

Tabelle 6: Verwendete mitochondriale Oligonukleotide

Name	Sequenz
mt6160_21_s	5'-CCCCGATATGGCGTTTCCCC-3'
mt6160_21_as	5'-GGGGAAACGCCATATCGGGGG-3'
mt2234_31_s	5'-GGTTGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACC-3'
mt2234_31_as	5'-GGTTGGGTTCTGCTCCGAGGTCGCCCAACC-3'
mt16338_23_s	5'-GCCACAGCACTTAAACACATCTCT-3'
mt16338_23_as	5'-AGAGATGTGTTTAAGTGTGTTGGC-3'
mt3670_23_s	5'-GCATCAAACCTCAAACCTACGCCCT-3'
mt3670_23_as	5'-AGGGCGTAGTTTGAGTTTGATGC-3'
CpG-A 2216	5'-GGGGGACGATCGTCGGGGGG-3'
CpG-A_2216_as	5'-CCCCCGACGATCGTCCCCC-3'
mt16073_28_s	5'-CGATAGCATTGCGAGACGCTGGAGCCGG-3'
mt16073_28_as	5'-CCGGCTCCAGCGTCTCGCAATGCTATCG-3'
mt6030_17_s	5'-TATTTCGAGCCGAGCTGG-3'
mt6030_17_as	5'-CCAGCTCGGCTCGAATA-3'
mt2111_18_s	5'-GCCCGTGAAGAGGCGGGC-3'
mt2111_18_as	5'-GCCCGCCTCTTCACGGGC-3'
mt880_22_s	5'-GAACAGGGCCCTGAAGCGCGTA-3'
mt1004_16_s	5'-GGAAAGTGCACCTTGA-3'
mt6745_26_s	5'-GAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAG-3'
mt7472_24_s	5'-CATCACAAGACGTCTTGCACTCAT-3'
mt9329_18_s	5'-GGCTTCGAAGCCGCCGCC-3'
mt11096_24_s	5'-CCCCCTGAAGCTTCACCGGCGCAG-3'

Tabelle 7: Fluorophorgekoppelte Oligodeoxynukleotide

Name	Fluorophor
mt2234_31_s_atto488	3'-Atto488
mt2234_31_as_atto488	3'-Atto488
mt2234_31_s_TR	3'-TexasRed
CpG-A 2216_s_atto488	3'-Atto488
CpG-A 2216_s_atto488	3'-Atto488

Sämtliche Primer und mtODN wurden als Phosphodiester von Biomers.net (Ulm) bezogen.

Kommerzielle CpG-ODN:

Tabelle 8: Verwendete CpG-ODN

Name	Sequenz
CpG-A 6016	5'-T*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G*G*G*G-3'
CpG-A 6016 PE	5'-T-C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G-G-G-3'
CpG-B 10103	5'-T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T-3'
CpG-C 10109	5'-T*C*G*T*C-G*T*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C-C-G*T*G*C*C*G-3'
CpG-P 21798	5'-T*C-G*T*C-G*A*C-G*A*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G-3'

* steht für Phosphorothioat- und – für Phosphodiesterverknüpfung. Phosphorothioat-ODN wurden von BioSpring (Frankfurt am Main) bezogen. Sämtliche CpG-ODN wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical GmbH – A Pfizer Company, Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

5.1.3 Häufig verwendete Geräte

Zentrifugen:

- Rotina 48R (Hettich, Tuttlingen)
- Biofuge 13 und Labofuge M (Heraeus, Hanau)

Inkubator:

- Steri-Cult 200 (Labotect, Göttingen)

PCR-Gerät:

- TPersonal Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)

Photometer:

- Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)

Heizblock:

- Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

Mikroskope:

- Leica SP5 konfokales Laser Scanning Mikroskop mit Leica Application Suite 2.6.0 (Leica Microsystems, Wetzlar)
- Fluoreszenzmikroskop Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Wetzlar)
- Inverses Lichtmikroskop Nikon Eclipse TCS100

Durchflusszytometer:

- LSR II mit FACS Diva Software (Becton Dickinson, Heidelberg) und FCS Express zur Auswertung

5.1.4 Glas- und Plastikwaren

96-Well Platte für ELISA (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden)
 Eppendorf-Reaktionsgefäße 2 ml und 1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht)
 FACS-Reaktionsgefäße (Becton Dickinson, Heidelberg)
 Reaktionsgefäße 0,65ml (Carl Roth, Karlsruhe)
 Objektträger für Immunfluoreszenz (Medco, Dülmen)
 Schraubdeckelgefäße 1,5ml, 15ml und 50ml (Sarstedt, Nümbrecht)
 Separations-Säulen LS/MS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
 Sterilfilter 0,44 und 0,22µm (Millipore, Schwalbach)
 Zellkultur-Platten mit 8/24/96 Vertiefungen (Greiner, Frickenhausen)
 Zellkultur-Flaschen 50ml, 250ml und 650ml (Greiner, Frickenhausen)
 35mm Zellkulturschale mit Glasboden (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA)
 5ml Polypropylengefäß (FACS-Tube) (Sarstedt, Nümbrecht)
 10/20/200/1000µl SafeGuard Pipettenspitzen (PEQlab, Erlangen)

5.1.5 Verwendete Fertigkits

Tabelle 9: Kommerzielle Reagenzsysteme

Reagenzsystem	Hersteller
Interferon-alpha ELISA -Modulset	eBioscience (Frankfurt)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
LooxSter Kit zur Aufreinigung unmethylierter DNA	SirSlab (Jena)
Mitochondrial DNA Isolation Kit	BioCat (Heidelberg)
BDCA4 Microbead Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

5.1.6 Verwendete Reagenzien und Medien

Agarose, für Gelelektrophorese (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Assay-Puffer für Interferon-alpha ELISA:

1% bovines Serumalbumin, 0,05% Tween 20 in PBS o.

BSA: Bovines Serum Albumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

DAPI: (4',6-Diamidin-2-phenylindol), zur DNA-Färbung bei konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Invitrogen, Darmstadt)

DOTAP: (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfate) (Roche, Mannheim), liposomales Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim)

DNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure 0,5M (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Ethanol 100% unvergällt (Merck, Darmstadt),

Ficoll-Lösung:

Biocoll separating solution, Dichte 1,077 g/ml (Biochrome AG, Berlin)

FKS:

Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert für 60 Minuten bei 56°C und sterilfiltriert (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

FACS-Puffer:

PBS o. mit 1mM EDTA, 1% FKS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

HBS-Puffer:

20mM HEPES (2-(4-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure); 150mM NaCl, pH 7,4, steril (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

IL-3:

Interleukin-3 eingesetzt mit 20ng/ml in Kultur (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt)

Isopropanol (Merck, Darmstadt)

Kaffee:

Extrakt aus 30g Kaffeepulver in 1l Wasser, 5% Saccharose, 5% Vollmilch, hitzeinaktiviert (Dallmayer, München)

MACS-Puffer:

PBS_o. mit 2mM EDTA, 1% FKS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Natriumacetat:

3M, pH 5,3 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Normal-Ziegenserum:

Ziegenserum (Dianova, Hamburg)

Paraformaldehyd, 4% zur Zellfixierung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

PBS_o. (engl. *phosphate buffered saline* ohne MgCl₂ und CaCl₂):

138mM NaCl; 2,7mM KCl; 6,5mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,3, sterilfiltriert

PBS für ELISA:

147mM NaCl; 2,6mM KCl; 2mM Na₂HPO₄; 8mM KH₂PO₄

PCR-Puffer:

10x konzentriert (Fermentas, St. Leon-Rot)

"Puffer 2" für Methylierungsreaktion und Restriktionsverdau:

100mM Tris-HCl; 500mM NaCl; 100mM MgCl₂; 10mM Dithiothreitol, pH 7,9, 10x konzentriert (New England BioLabs, Frankfurt am Main)

RPMI 1640-Medium:

Fertigmedium (Gibco BRL, Eggenstein)

Stopplösung für Interferon-alpha ELISA:

4N Schwefelsäure (Merck, Darmstadt)

Substratlösung für Interferon-alpha ELISA:

Tetramethylbenzidin (TMB) und H₂O₂ (eBioscience, Frankfurt)

TE-Puffer 1:100:

10mM Tris HCl ; 1mM EDTA

Trypanblau:

Zur Identifikation toter Zellen und Bestimmung der Zellzahl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Turks-Lösung:

3%-ige Essigsäure mit Gentianaviolett zum Erythrozyten-Ausschluss bei Zellzählung

Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe)

VectaShield, Eindeckmedium für die Immunfluoreszenz (Biozol, Eching)

Wasch-Puffer für Interferon-alpha ELISA:

0,05% Tween 20 in PBS_o.

Weizenkeim-Agglutinin (WGA, *engl. wheat germ agglutinin*), zur Färbung der Zellmembran für die konfokale Immunfluoreszenz, Atto555-konjugiert (Invitrogen, Darmstadt)

Zusätze für RPMI-1640-Medium:

10% FKS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen); 50mg/ml Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein);
200U/ml Penicillin und 90U/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Peptide:

Tabelle 10: Verwendete Peptide und Enzyme

Name	Bezugsquelle
HMGB1	R&D Systems (Wiesbaden)
LL-37	Innovagen (Lund, Schweden)
HpaII	New England Biolabs (Frankfurt)
MspI	New England Biolabs (Frankfurt)
M.SssI	New England Biolabs (Frankfurt)
Taq-Polymersase	Invitrogen (Darmstadt)

5.2 Methoden

5.2.1 Isolation von PBMC

Die Isolation von PBMC aus EDTA-Blut gesunder Spender erfolgte über Biocoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (1,077g/ml). Dazu wurde das EDTA-Blut zunächst bei 200xg abzentrifugiert und das Plasma entfernt, die zellulären Bestandteile wurden in ein 50ml Gefäß überführt, mit RPMI 1640 auf 35ml Volumen aufgefüllt und über 15ml Biocoll (Biochrom, Berlin) geschichtet. Die Trennung erfolgte mittels Zentrifugation für 25 Minuten bei 440xg. Der sichtbare Lymphozytenring wurde abgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI-1640 Medium gewaschen und anschließend in 15ml RPMI-1640 mit Zusätzen aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

5.2.2 Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen

Die spezifische Isolation plasmazytoider dendritischer Zellen aus den peripheren Lymphozyten erfolgte mittels Verwendung an BDCA4-Antikörper gekoppelter magnetischer Kügelchen. Hierfür wurde die PBMC-Suspension zunächst einmal 10min bei 400xg zentrifugiert und einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Der Isolationsansatz berechnete sich aus der Menge der verwendeten PBMC. Pro 1×10^6 PBMC wurden 1,5 μ l MACS-Puffer sowie je 0,5 μ l FcR-Blockierungsreagenz und BDCA4-Microbeads zu den PBMC gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei 4°C und einmaligem Waschen wurde die Zellsuspension in 1ml MACS-Puffer aufgenommen und auf eine LS-Säule in einem Magnetfeld aufgetragen. Nach dem Durchlaufen der Zellsuspension wurde die Säule dreimal mit 1ml Puffer gewaschen. Zellen, die BDCA4 exprimierten, blieben über das Magnetfeld in der Säule hängen, nicht markierte Zellen fanden sich im Durchfluss. Die gebundenen Zellen wurden mit 10ml Puffer außerhalb des Magnetfeldes eluiert, und ein zweiter Reinigungsschritt über eine kleinere (MS)-Säule schloss sich an. Die so isolierten Zellen wurden wiederum mit einer Neubauer-Zellzählkammer ausgezählt. Die Reinheit der isolierten PDC wurde mit 91,1-95,7 % bestimmt (Schuster et al., 2010).

5.2.3 Isolation CD14 positiver Zellen

Die spezifische Isolation CD14 positiver Zellen aus den peripheren Lymphozyten erfolgte mittels Verwendung an CD14-Antikörper gekoppelter magnetischer Kügelchen. Hierfür wurde die PBMC-Suspension zunächst einmal 10min bei 400xg zentrifugiert und einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Der Isolationsansatz berechnete sich aus der Menge der verwendeten PBMC. Pro 1×10^6 PBMC wurden 1,5 μ l MACS-Puffer sowie 0,5 μ l CD14-Microbeads zu den PBMC gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C und einmal waschen wurde die Zellsuspension in 1ml MACS-Puffer aufgenommen und auf eine MS-Säule in einem Magnetfeld aufgetragen. Nach dem Durchlaufen der Zellen wurde die Säule dreimal mit 1ml Puffer gewaschen. Zellen, die CD14 exprimierten, blieben über das Magnetfeld in der Säule hängen, nicht markierte Zellen fanden sich im Durchfluss. Die gebundenen Zellen wurden mit 4ml Puffer außerhalb des Magnetfeldes eluiert. Die so isolierten Zellen wurden wiederum mit einer Neubauer-Zellzählkammer ausgezählt.

5.2.4 Zellzählung

Für die Ermittlung der Zellzahl wurden 15µl Zellsuspension mit 15µl Turks-Lösung zum Lysieren noch vorhandener Erythrozyten sowie 30µl Trypanblau vermischt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden drei 16er Felder ausgezählt, der Mittelwert pro Feld gebildet und die Zellzahl pro Milliliter berechnet. Multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension ergab sich die Gesamtzellzahl. Für die Zählung bereits aufgereinigter Zellen (PDC und Zelllinien) wurde auf die Verwendung der Turks-Lösung verzichtet.

5.2.5 Polymerase Ketten Reaktion

Die PCR zur Amplifikation der CpG-Inseln aus Gesamtzell-DNA wurde wie folgt durchgeführt:

Der Ansatz bestand pro Ansatz aus Taq-Polymerase (Invitrogen, Darmstadt)(0,2Units/Ansatz), 50ng Primer, 1,25mM Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat sowie 1x PCR-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot) und 2ng Template DNA. Das Volumen des Mastermixes wurde auf 45µl Ansätze verteilt, mit 5µl Template vereinigt und in einem PCR-Gerät amplifiziert.

Das PCR Programm setzte sich wie folgt zusammen:

Denaturierung	94°C	40 Sek.
Anlagerung	48° - 57°C	30 Sek.
Verlängerung	72°C	60 Sek.
40 Zyklen		
Abschließende	72°C	300 Sek.
Verlängerung		

Um nicht verwendete Nukleotide, überschüssige Primer und die Polymerase zu entfernen, schloss sich ein Aufreinigungsschritt an. Dafür wurde der QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Hierzu wurden sämtliche Ansätze eines Amplifikates

zusammenpipettiert, mit dem 5-fachen Volumen Puffer PB versetzt, auf eine QIAquick Säule gegeben und bei 17000xg zentrifugiert, um die DNA an die Säule zu binden. Bei Volumina, die größer als die Ladekapazität der Säule waren, wurde dieser Schritt mehrmals wiederholt, bis der gesamte PCR-Ansatz auf die Säule geladen war. Die Säule wurde einmal mit 750µl Puffer PE gewaschen (1min, 17000xg Zentrifugation) und das Amplifikat mit 50µl Puffer EB (nach 2 Minuten Inkubation bei RT, Zentrifugation 1min bei 17000xg) eluiert. Qualität und Quantität des Amplifikates wurde photometrisch und mittels Gelelektrophorese überprüft.

5.2.6 Herstellung doppelsträngiger ODN

Hierfür wurde eine entsprechende Menge Einzelstrang-DNA (sense und antisense) gemischt, für 10 Minuten im Heizblock auf 95°C erhitzt und zum Hybridisieren auf Eis abgekühlt.

5.2.7 Isolation der DNA-Spezies

Isolation Gesamtzell-DNA

Für die Isolation der Gesamtzell-DNA aus PBMC wurde der kommerzielle Kit QIAmp Blood Mini Kit verwendet. Dazu wurden bis zu 20×10^6 PBMC in 200µl PBS_o aufgenommen, mit 200µl Lysispuffer (AL) sowie 20µl Qiagen Protease gemischt, 10 Minuten bei 56°C in einem Heizblock inkubiert, mit 400µl Ethanol 100% vermischt und auf eine Säule gegeben. Für die Bindung an die Silica-Matrix der Säule wurde das Zelllysate 1min bei 6000xg zentrifugiert, oder bis das gesamte Volumen die Säule passiert hatte. Es folgten je ein Waschschriff mit Waschpuffer I (AW1) und Waschpuffer II (AW2) mit anschließender Zentrifugation für 1min bei 6000xg sowie 3min bei 12000xg. Bei allen Zentrifugationsschritten wurde das nicht gebundene Material verworfen. Ein abschließender Zentrifugationsschritt 1min bei 6000xg diente dazu, in der Säule befindlichen Puffer zu entfernen. Die gebundene DNA wurde mit 100µl Eluationspuffer (AE) von der Säule eluiert. Dazu wurde 100µl Puffer AE auf die Säule gegeben, 2-3

Minuten bei RT inkubiert und 1min bei 6000xg zentrifugiert. Menge und Reinheit der DNA wurden photometrisch überprüft.

Isolation mitochondrialer DNA

Zur Isolation mitochondrialer DNA wurden drei verschiedene Isolationsmethoden verwendet:

Isolation nach BioCat-Protokoll:

Die Isolation mitochondrialer DNA mit dem BioCat-Protokoll beruht auf der Freisetzung/Isolation von Mitochondrien, aus denen anschließend die DNA isoliert wird. Dazu wurden 50×10^6 PBMC zunächst in eiskaltem PBS_o gewaschen und in 1ml „Cytosol Extraction Buffer“ auf Eis resuspendiert und für 10min inkubiert. Die Zellen wurden in einem Gewebe-Homogenisator homogenisiert, bis etwa 90% der Zellen zerstört waren, was nach etwa 80 Kolbenhüben der Fall war. Das Zelllysat wurde für 10min bei 700xg bei 4°C zentrifugiert, um zerstörte Zellen, Zellmembranen und Zellkerne zu entfernen. Das abzentrifugierte Pellet wurde für die Gewinnung nukleärer DNA asserviert.

Der Überstand wurde in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 30min bei 4°C und 10000xg zentrifugiert, um die Mitochondrien zu pelletieren. Es folgte ein Waschschriff der isolierten Mitochondrien mit Cytosol Extraction Puffer. Die pelletierten Mitochondrien wurden mit 40µl Mitochondrial Lysis Buffer 10min auf Eis inkubiert, und mit 5µl „Enzym B“ im Wasserbad bei 50°C für 60min verdaut. Die mtDNA wurde anschließend über eine Natriumacetat/Ethanol-fällung ankonzentriert.

Isolation mit Looxster-Kit:

Der LooxSter Kit (SirSLab) beruht auf einer erhöhten Bindung nicht-methylierter gegenüber methylierten CpG-Motiven an eine Säule. Das Prinzip ist das einer Affinitätschromatographie. Dabei wurde pelletierte Gesamtzell-DNA in 300µl Bindungspuffer („Puffer D“) gelöst, auf die Säule gegeben und 30min bei geöffnetem Gefäß unter Sterilbedingungen inkubiert. Unmethylierte DNA wurde gebunden, methylierte DNA

fand sich nach Zentrifugation (1min, 300xg) im Durchfluss. Die gebundene DNA wurde eluiert (300µl „Puffer E“) und mittels Natriumacetat-Präzipitation gefällt. Die nicht gebundene DNA im Säulendurchfluss ließ sich ebenfalls mittels Natriumacetatpräzipitation ausfällen.

Isolation aus Thrombozytenkonzentrat:

Die verwendeten Thrombozytenkonzentrate wurde uns freundlicherweise von der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums der Friedrich-Alexander Universität Erlangen zur Verfügung gestellt. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern, daher wird ausschließlich mtDNA isoliert. Dafür wurde das QIAmp Blood Kit Protokoll leicht abgewandelt verwendet. Die Thrombozyten wurden in 50ml Reaktionsgefäße abgefüllt und 30min bei 1800xg pelletiert, anschließend in 1ml PBS_o. resuspendiert, mit 1ml Lysispuffer AL und 60µl Qiagen Protease gemischt, und 20min bei 56°C verdaut. Dazu wurden 2ml 100% Ethanol gegeben, und die Suspension auf QIAmp Blood Kit-Säulen geladen. Da das Volumen der Ansätze deutlich größer war als das Ladevolumen der Säulen, wurden die Säulen mehrmals beladen. Die Säulen wurden einmal mit 500µl Puffer AW1, 500µl Puffer AW2, wie beschrieben, gewaschen. Die DNA wurde in 50µl Puffer AE eluiert.

Präzipitation der DNA

Eine andere Möglichkeit, DNA von Verunreinigungen wie Salzen und Proteinen in Lösung zu befreien, ist die Präzipitation mittels Natriumacetat. Hierfür wurde 1 Volumen DNA-haltige Lösung mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat, pH5,3 und dem 2,5fachen Volumen 100% Ethanol vermischt, 30 Minuten bei RT inkubiert und 30 Minuten bei 14000xg pelletiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Puffer aufgenommen. Quantität und Qualität der DNA wurden photometrisch bestimmt.

5.2.8 Identifikation immunstimulatorischer Sequenzen

Gemäß einer Definition von CpG-Inseln (über 7 CGs in 200 Basenpaaren und C+G Gehalt über 50%) (Gardiner-Garden and Frommer, 1987) wurden CpG-Inseln mittels der OnlineTools „CpG-Island Searcher“ (www.cpg-islands.com) und „EMBOSS CpG-Plot“ (www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot) identifiziert. Beide Programme funktionieren nach dem gleichen Prinzip, der Leserahmen (normalerweise 200 Basenpaare) wird auf Zahl der CpG, Prozentsatz C+G, sowie die eingestellte Minimallänge untersucht. Anschließend wird der Leserahmen um eine Base verschoben und die Prozedur wiederholt, bis die gesamte Sequenz abgedeckt ist. Weitere Parameter sind bei „EMBOSS CpG-Plot“ die Länge des Lesefensters, wie weit das Fenster verlagert wird, der Minimalabstand zwischen zwei CpG-Inseln und ob der Gegenstrang bzw. die revers komplementäre Sequenz inkludiert wird.

5.2.9 Transfektion der Zellen mit DOTAP

DOTAP ist ein liposomales Reagenz zur Transfektion eukaryontischer Zellen. Es eignet sich besonders, um den DNA/Lipidkomplex in das Endosom der Zielzellen zu bringen. Hierzu wurde die DNA zunächst mit HBS-Puffer (*engl. Hepes Buffered Saline*) auf 50µl Volumen eingestellt. 30µl DOTAP wurden mit 70µl HBS in einem zweiten 1,5ml Reaktionsgefäß vermischt, die DNA dazugegeben, vorsichtig gemischt und 15min inkubiert. Die fertige Lösung wurde auf die zu stimulierenden Zellen gegeben. Es wurden jeweils 1×10^6 PBMC in einer 24-Loch Platte für 20h stimuliert.

5.2.10 Stimulation der Zellen mit LL-37

Hierzu wurde 1µg der zu testenden DNA mit 4µg LL-37 Peptid in 10µl RPMI 1640 mit Zusätzen gemischt und bei Raumtemperatur 30min inkubiert. Der DNA/Peptid Komplex wurde anschließend auf die Zellen gegeben und diese für 20h im Inkubator bei 37°C kultiviert.

5.2.11 Stimulation der Zellen mit HMGB1

Hierzu wurde 1µg der zu testenden DNA mit 2µg HMGB1 Protein in 20µl RPMI 1640 mit Zusätzen gemischt und bei Raumtemperatur 30min inkubiert. Der DNA/Peptid Komplex wurde anschließend auf die Zellen gegeben und diese für 20h im Inkubator bei 37°C kultiviert.

5.2.12 Interferon-alpha ELISA

Für die Quantifizierung der Interferon-alpha_{2a/2b} Menge im Zellkulturüberstand wurde ein kommerzielles Modulset (eBioscience, Frankfurt) verwendet. Für die Vorbereitung der Platte wurde zunächst der Fang-Antikörper auf eine 96-Napf MaxiSorb-Platte mit einer Konzentration von 100µg/ml und einem Volumen von 100µl gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde am nächsten Morgen mit 300µl Waschpuffer (PBS_o mit 0,05% Tween 20) entfernt und die restlichen Bindestellen der Platte mit dem im Assay-Puffer enthaltenen BSA (*engl. Bovine Serum Albumin*) über Nacht bei 4°C oder 2h bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen wurden in jeden Napf die Proben in einem Endvolumen von 200µl einpipettiert und zusammen mit 50µl des HRP-Konjugates (Meerrettich Peroxidase, *engl. Horseradish-Peroxidase*), gekoppelt an einen zweiten Interferon-spezifischen Antikörper, zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde außerdem eine Standardreihe für die absolute Quantifizierung der Proben mitgeführt. Nach dreimaligem Waschen wurde 100µl des TMB-Substrates (eBioscience) (1:1 Mischung aus Tetramethylbenzidin und H₂O₂-Lösung) zugegeben. Der Farbumschlag korrelierte durch die Umsetzung des Substrates mit der Interferon-Konzentration in der Probe. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 2N H₂SO₄ wurde die Extinktion photometrisch bei 450nm und 630nm als Referenzwellenlänge bestimmt. Für die Auswertung des Interferon-Spiegels der einzelnen Proben wurde die Differenz beider Wellenlängen (OD_{450nm} - OD_{630nm}) verwendet, die Berechnung der Interferon-Konzentration erfolgte anhand der Standardkurve in Microsoft Excel.

5.2.13 Methylierung der mitochondrialen DNA und CpG-Inseln

Für den Test der Immunstimulation methylierter DNA Spezies wurde die CpG-Methyltransferase M.SssI von New England Biolabs verwendet. Das Enzym überträgt eine Methylgruppe auf die 5'-Position des Cytidin, als Substrat dient hierzu s-Adenosylmethionine. Der Ansatz bestand dabei aus der gewünschten Menge DNA, dem Substrat (Endkonzentration 3,2mM), NEB-Puffer 2 und 20Units Methyltransferase. Das Endvolumen des Ansatzes betrug jeweils das zehnfache Volumen der gelösten DNA. Die Inkubation erfolgte jeweils für 90min bei 37°C, gefolgt von einem Inaktivierungsschritt 20min bei 65°C und einer Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit. Der Erfolg der Methylierung wurde mittels Verdau von je 1µg DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen und Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

5.2.14 Restriktionsverdau der methylierten DNA

Hierfür wurde jeweils 1µg methylierte und nicht methylierte DNA mit den beiden Restriktionsenzymen MspI und HpaII (beide NEB) unter entsprechenden Pufferbedingungen (1x NEB-Puffer 2) 1h bei 37°C verdaut und direkt auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen. Beide Restriktionsenzyme sind Isoschizomere mit der Erkennungssequenz CCGG. HpaII erkennt methylierte CpG-Sequenzen nicht und kann somit methylierte DNA nicht verdauen, MspI verdaut methylierte und unmethylierte DNA gleichermaßen.

5.2.15 Immunfluoreszenzmethoden

Konfokale Mikroskopie

Für die konfokale Mikroskopie wurden die Zellen mit 50.000 Zellen/Ansatz eingesetzt. Isolierte PDC wurden in RPMI 1640 mit FKS/SPG/IL-3 für 20h mit 2 μ M fluoreszenzmarkiertem ODN mt2234_31 als Einzelstrang oder als Doppelstrang inkubiert.

Für die Färbung wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gestellt und geerntet. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS_o gewaschen und in 50 μ l PBS_o vorsichtig auf das Feld des Objektträgers (Medco, Dülmen) geträufelt. Es wurde gewartet, bis die Zellsuspension nahezu angetrocknet und das PBS_o verdunstet war, worauf die Zellen mit 50 μ l 4% PFA auf dem Objektträger für 60min in einer feuchten Kammer fixiert wurden. Die Objektträger wurden zweimal für 5 Minuten in PBS_o in Histologieküvetten gewaschen. Die Präparate wurden 30 Minuten mit 5% Ziegen Serum oder BSA geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Für die Färbung intrazellulärer Strukturen wurde der Primärantikörper in entsprechender Konzentration in PBS_o mit 0,1% Saponin und 5% Ziegen Serum (Dianova) auf die fixierten Zellen appliziert und bei 4°C über Nacht gefärbt. Nicht gebundener Primärantikörper wurde dreimal für je 10 Minuten in PBS_o in Küvetten gewaschen, und anschließend der Sekundärantikörper für 45min auf die Zellen gegeben. Die Färbung der Zellmembran mittels 5 μ g/ml Weizenagglutinin (WGA, Invitrogen) erfolgte 10min bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen wurde eine Kernfärbung mit DAPI (Invitrogen) in einer Konzentration von 300nM für 10 Minuten durchgeführt. Nach einmaligem Waschen (10min PBS_o) wurden die Objektträger mit VectaShield (Biozol, Eching) eingedeckelt und gegen Austrocknung mit Nagellack (Essence, DM-Drogerie) umrandet. Für die Betrachtung der Präparate und Aufnahme der Bilder wurde ein Leica SP5 Konfokales Lasermikroskop verwendet. Die verwendeten Detektor- und Verstärkereinstellungen variierten mit dem entsprechenden experimentellen Aufbau und der jeweiligen Fragestellung.

LiveCell Imaging

Für die mikroskopische Untersuchung lebender Zellen wurden PDC isoliert und über Nacht im Inkubator in 1640 Medium mit Zusätzen und Interleukin-3 kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und 750.000 PDC in 150µl Medium (RPMI 1640 mit Zusätzen und IL-3) in einer 35mm Petrischale mit Glasboden (MatTek Corporation, MA, USA) ausplattiert. Die Untersuchungen fanden in einer beheizten Zellkulturkammer und unter CO₂ Begasung statt (Leica CTI-3700 digital mit Tempcontrol 37-2 digital) an einem Leica DMI6000B statt. Dabei wurde das mtODN in einer Konzentration von 25nM eingesetzt.

5.2.16 Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Untersuchungen wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und einmal mit 10ml FACS-Puffer (PBSo. mit FKS und 1mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in jeweils 100µl FACS-Puffer pro Ansatz aufgenommen und mit 8µl FcR-Blocking Reagent (Miltenyi) für 10 Minuten bei 4°C inkubiert, um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Zellen zu verhindern. Jeweils 100µl Zellsuspension wurden danach auf die vorpipettierten Antikörper in FACS-Tubes gegeben und 20min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3ml FACS-Puffer gewaschen, 10min bei 400xg zentrifugiert, in 150µl 4% PFA aufgenommen und kurz auf einem Vortexer gemischt. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem BD LSRII mit FACS DIVA, die Auswertung der Daten mit FCS Express V3 (Version 3.00.0819, De Novo Software). Für das Färben intrazellulärer Antigene wurde das Protokoll leicht abgewandelt und die Färbung nicht in FACS-Puffer, sondern in PBSo. mit 1%BSA und 0,1% Saponin für 60min durchgeführt.

5.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde folgende Internetseite verwendet: <http://faculty.vassar.edu/lowry/vassatStats.html>. Für ungepaarte Proben (Vergleiche zweier unabhängiger Experimente) wurde der *Student's t-test* für ungepaarte Proben

verwendet, für gepaarte Proben (Vergleich stimulierte gegen unstimulierte Zellen) der *Student's t-test* für gepaarte Proben. Die Medianen Fluoreszenzwerte der Durchflusszytometrie-Experimente wurden vor der statistischen Auswertung dekadisch logarithmiert, um eine Normalverteilung herzustellen. Ein zweiseitiger p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant, ein p-Wert $<0,01$ und $<0,001$ als hoch bzw. höchst signifikant betrachtet.

6 Ergebnisse

6.1 Immunstimulatorische Kapazität zellulärer DNA Spezies

Um die Interferon-alpha Induktion durch verschiedene DNA-Spezies miteinander zu vergleichen, wurden nukleäre und mitochondriale DNA über verschiedene Methoden aus peripheren mononukleären Zellen aufgereinigt und mittels DOTAP-Transfektion auf ihre immunstimulatorische Kapazität getestet. Zusätzlich wurde DNA aus Thrombozytenkonzentraten isoliert. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und daher ist die gewonnene DNA ausschließlich mitochondrialer Herkunft. Um den Erfolg der Fraktionierung mit den verschiedenen Aufreinigungsmethoden zu überprüfen, wurde die Menge der genomischen DNA in den einzelnen Fraktionen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion des Albumingenes bestimmt. Das Resultat ist in Abbildung 3 dargestellt.

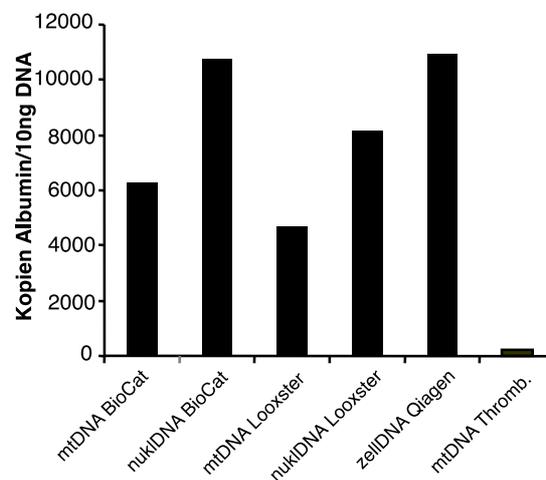


Abbildung 3 Überprüfung der fraktionellen Aufreinigung:

Die Anreicherung der mitochondrialen DNA in der Probe wurde indirekt über Abreicherung des Albumingenes pro 10ng isolierte DNA bestimmt. Gezeigt sind die Fraktionierungen beider Aufreinigungskits der Firma BioCat (mitochondriale DNA (mtDNA BioCat) und nukleäre DNA (nuklDNA BioCat)) und Looxster (mtDNA Looxster und nuklDNA Looxster), sowie nicht fraktionierte GesamtzellDNA (zellDNA Qiagen) und DNA isoliert aus Thrombozytenkonzentrat (mtDNA Thromb.). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus 2 - 3 Präparationen.

Anhand der Abreicherung der nukleären DNA, quantifiziert als Kopien des Albumin-Genes in der Probe, wurde die erfolgreiche Fraktionierung der zellulären DNA-Spezies überprüft. So ergab die nichtfraktionierte DNA-Isolation „zellDNA Qiagen“ 11000 Kopien auf 10ng DNA, die nukleären Fraktionen mit 8200 Kopien für „nuklDNA Looxster“ und 11000 Kopien bei „nuklDNA BioCat“ nur eine sehr schwache bzw. gar keine Abreicherung der nukleären DNA. Die mitochondrialen Fraktionen zeigten jedoch eine stärkere Abreicherung mit 6300 Kopien bei „mtDNA BioCat“ und 4700 Kopien bei „mtDNA Looxster“ von etwa 42% bzw. 58% verglichen zu der Qiagen-Aufreinigung. Die Isolationen aus Thrombozytenkonzentrat wurden mit 200 Kopien Albumin quantifiziert und liegen somit am unteren Ende der Nachweisgrenze des Testverfahrens. Aufgrund der Unterschiede in der Masse der einzelnen DNA-Spezies, nämlich 16 Kilobasenpaaren für das mitochondriale Genom gegenüber 6 Gigabasenpaaren für das nukleäre Genom, ließ dies auf eine erfolgreiche Anreicherung der mtDNA in den entsprechenden Fraktionen schließen.

Nachdem hier mittels quantitativer PCR bestätigt wurde, dass die verwendeten Aufreinigungsmethoden die jeweils nicht gewünschte DNA-Spezies abreicherten, wurden die einzelnen Spezies auf ihre Fähigkeit Interferon-alpha zu induzieren untersucht. Dafür wurden frisch isolierte mononukleäre Zellen im peripheren Blut (PBMC, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) gegenüber je 1µg der DNA exponiert. Die aufgereinigte DNA wurde entweder direkt zu den Zellen gegeben oder in Kombination mit dem Transfektionsreagenz DOTAP verwendet, das die DNA in das endosomale Kompartiment transferiert (vgl. Ries, 2008).

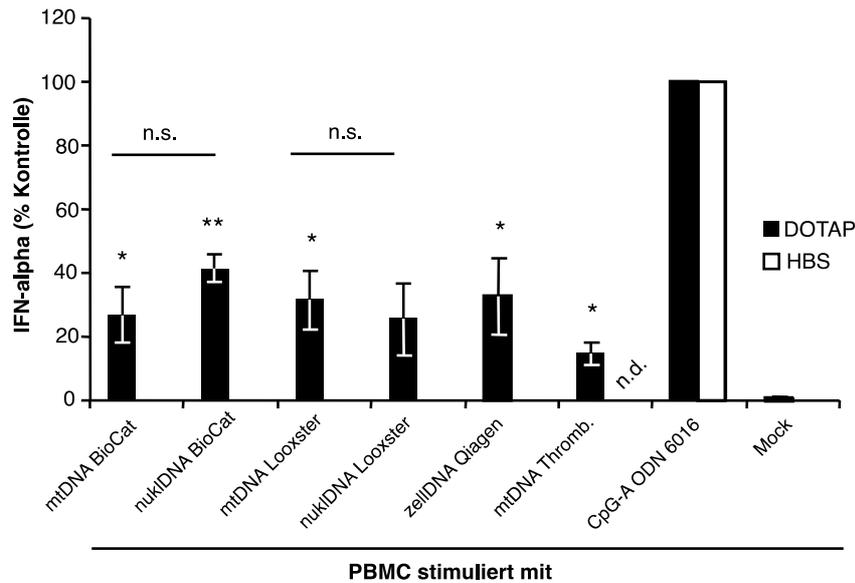


Abbildung 4 Immunstimulatorische Kapazität der DNA Spezies:

Es wurden je 1×10^6 periphere mononukleäre Zellen mit $1 \mu\text{g}$ DNA der verschiedenen Aufreinigungsmethoden transfiziert (DOTAP) oder nur zusammen mit dem Transfektionspuffer HBS in die Kultur zugegeben (HBS); das in den Zellkulturüberstand sezernierte Interferon-alpha (IFN-alpha) wurde nach 20h gemessen. Das Ergebnis ist standardisiert auf die Interferon-Induktion durch $2 \mu\text{M}$ CpG-A ODN 6016, dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum von 6 - 10 (DOTAP) bzw. 2 - 5 (HBS) unabhängigen Experimenten, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ gegenüber unstimulierten Zellen (Mock), n.s. nicht signifikant, n.d. nicht durchgeführt.

Während sich die Interferon-Induktion der einzelnen Fraktionen bis auf die nukleäre Fraktion Looxster signifikant von der unstimulierten Zellen unterschied und Interferon-Spiegel von 15 - 40% der CpG-A Positivkontrolle hervorrief, zeigte sich zwischen den jeweils mit der gleichen Methode isolierten mitochondrialen und nukleären Fraktionen kein signifikanter Unterschied. Die reinste Fraktion, mitochondriale DNA aus Thrombozytenkonzentrat induzierte die schwächste Interferon-Antwort. Die einfache Zugabe der DNA in die Zellkultur ohne Transfektionsreagenz (DOTAP) rief in keinem Ansatz eine messbare Interferon-Antwort hervor. Es ließ sich also zwischen den mitochondrialen und den nukleären Fraktionen bzw. deren Mischung kein Unterschied in der Interferon-alpha Induktion zeigen. Die Stimulation von 1×10^6 PBMC mit CpG-A lieferte eine absolute Interferonkonzentration von 2850 ± 350 pg/ml. Der absolute Interferon-Spiegel aus transfizierten PBMC nach Stimulation mit endogenen DNA-Spezies lag bei 1200 ± 280 pg/ml und zeigt damit eine potente immunmodulatorische Fähigkeit endogener DNA, sobald diese Zugang zu endosomalen Kompartimenten erhält (vgl. Ries, 2008).

6.1.1 Einfluss der *in vitro* Methylierung auf die Interferon-Stimulation

Im Folgenden wurde die immunmodulatorische Kapazität mitochondrialer DNA weiter charakterisiert. Um die Hypothese zu testen, mitochondriale DNA könne als Ligand für TLR9 dienen und im Menschen eine Interferon-alpha bedingte Immunantwort auslösen, wurde der Methylierungsstatus überprüft und der Effekt einer künstlichen Methylierung auf die Interferon-Antwort getestet. Die chemische Modifikation des Cytosines zu 5'-Methylcytosin (gewöhnlich im CpG-Kontext) ist ein häufiges epigenetisches Merkmal. Sie verhindert die Aktivierung des TLR9-Signalweges und die Interferon-Produktion über CpG-Motive (Krieg et al., 1995). Methylierung der CpG-Inseln in Promoter Regionen dient der Genregulation (Dörfler, 1981) und der Unterscheidung körperfremder von körpereigener DNA über das Methylierungsmuster. *In vivo* wird das Methylierungsmuster direkt nach DNA-Synthese von den DNA-Methyltransferasen (DNMT1-3a/b) vom alten auf den neuen DNA-Strang kopiert. In dieser Arbeit wurde die prokaryontische Methyltransferase M.SssI verwendet.

Eine gängige Möglichkeit zur Überprüfung des Methylierungsstatus von DNA ist ein Verdau mit anschließender Gelelektrophorese unter Verwendung methylierungssensitiver Endonukleasen. Dazu wurden zwei Endonukleasen verwendet: so ist MspI in der Lage, methylierte CCpGG-Motive zu schneiden, HpaII wird dagegen von Methylierungen an dieser Stelle geblockt. Erhält man ein identisches Schnittbild für beide Enzyme, sind die Schnittstellen unmethyliert, ein abweichendes Bandenmuster deutet auf eine Blockierung einer Nuklease und die Methylierung der Schnittstelle hin. Im Folgenden wurde isolierte mitochondriale DNA aus Thrombozytenkonzentraten auf ihren *in vivo*-Methylierungsstatus überprüft. Gleichzeitig diente der Versuch als Kontrolle der *in vitro*-Methylierung. Dazu wurde jeweils 1µg DNA *in vitro* mit der CpG-Methyltransferase behandelt und anschließend verdaut. Es zeigte sich, dass die verwendete mitochondriale DNA fast ausschließlich unmethyliert ist, sich jedoch *in vitro* mit der entsprechenden CpG-Methyltransferase modifizieren lässt, wie Abbildung 5 zeigt.

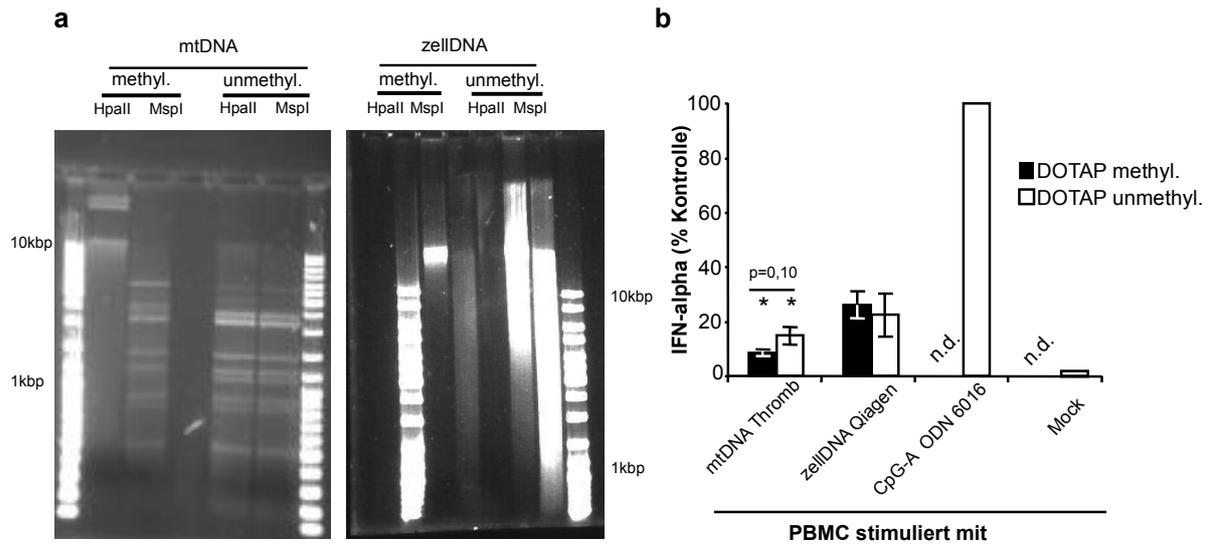


Abbildung 5 Inhibition der Interferon-alpha Antwort durch *in vitro* Methylierung:

a) Elektrophoresebild des Restriktionsverdaues zur Überprüfung der *in vitro* Methylierung. Hierfür wurde jeweils 1µg DNA pro Spur der *in vitro* methylierten DNA für 60min verdaut und aufgetragen. Die methylierten Ansätze wurden von der methylierungssensitiven Nuklease HpaII nicht geschnitten (methyl. HpaII), von der nicht-sensitiven Endonuklease MspI jedoch schon, daher ist in beiden Fällen von einer erfolgreichen Methylierung auszugehen. 1,5% Agarosegel, 75min, 120 Volt. **b)** Der Versuch wurde mit DNA aus Thrombozytenkonzentrat und PBMC-GesamtzellDNA (zellDNA Qiagen), die entweder mit Methyltransferase behandelt wurden oder nicht, durchgeführt. Dabei wurden 1×10^6 PBMC gesunder Donoren mit 1µg DNA mittels DOTAP-Transfektion stimuliert und nach 20h Interferon-alpha im Überstand gemessen, * $p < 0,05$, gegenüber Mock, dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum aus 6 (mtDNA Thromb) bzw. 3 (zellDNA Qiagen) unabhängigen Experimenten, standardisiert auf 2µM CpG-A 6016.

Bei der mitochondrialen DNA aus Thrombozytenkonzentrat konnte zumindest ein Trend in der Reduktion ($p=0,10$) der Interferon-Induktion nach DOTAP Transfektion in PBMC gezeigt werden, auch wenn der Effekt nicht signifikant war. Für GesamtzellDNA aus PBMC ergab sich dagegen kein Unterschied in der Interferon-Induktion (Abbildung 5b).

6.1.2 Geschlechtsspezifischer Unterschied in der Interferon-alpha Antwort

Geschlechtsspezifische Unterschiede im TLR-Signalweg der Interferon-Antwort und damit der Koordinierung der Immunantwort sind bereits von mehreren Autoren beschrieben worden (Berghöfer et al., 2006; Meier et al., 2009; Khan et al., 2010; Seillet et al., 2012). Daher wurden die Interferon-Werte der einzelnen Spender nach Geschlecht getrennt aufgeschlüsselt, um Unterschiede der Interferon-Antwort auf die verwendeten Stimuli zu untersuchen.

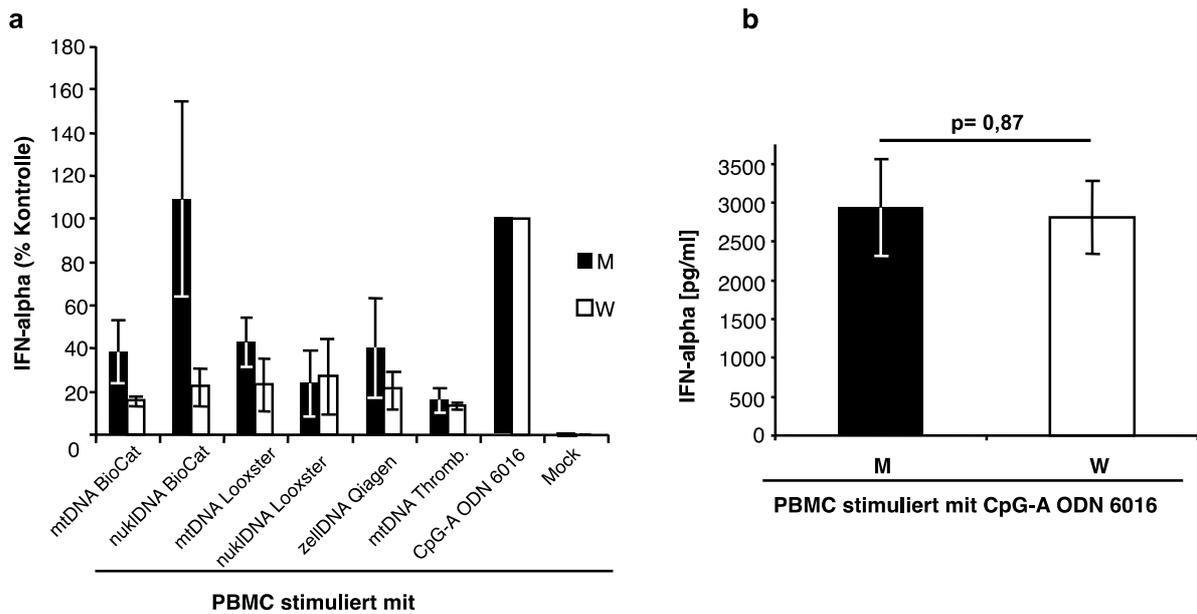


Abbildung 6 Geschlechtsspezifische Interferonantwort:

a) 1×10^6 PBMC männlicher (m) und weiblicher (w) Spender wurden mit $1 \mu\text{g}$ verschiedener DNA-Spezies mittels DOTAP transfiziert und Interferon (IFN)-alpha im Zellkulturüberstand nach 20h Inkubation quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert und Standardirrtum aus jeweils 3 - 4 unabhängigen Experimenten mit PBMC weiblicher und männlicher Spender bezogen auf die Interferon-Induktion der Positivkontrolle CpG-A ODN 6016. **(b)** Die Absolutwerte der CpG-A ODN 6016 Kontrolle aus 8 - 10 unabhängigen Experimenten pro Geschlecht zeigten ebenfalls keinen Unterschied in der Interferon-Produktion zwischen weiblichen und männlichen Spendern.

Die gemessenen Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand nach DOTAP-Transfektion der DNA Spezies lagen für beide Geschlechter zwischen 15 und 60% der CpG-A Kontrolle. Dabei konnte trotz leicht höherer Interferon-Spiegel bei männlichen Probanden kein signifikanter Unterschied zu weiblichen Donoren gezeigt werden. Auch bei den in Abbildung 6b gezeigten Absolutwerten der CpG-A ODN 6016 Positivkontrolle, auf die alle anderen Werte standardisiert sind, ergab sich kein Unterschied in der Interferon-Sekretion von $2988 \pm 621 \text{ pg/ml}$ bei PBMC männlicher Probanden gegenüber $2805 \pm 470 \text{ pg/ml}$ bei PBMC weiblicher Probanden ($p = 0,87$, nicht signifikant).

6.2 Interferon- Induktion durch mitochondriale CpG-Inseln

In Promotorregionen eukaryontischer Gene finden sich in sogenannten CpG-Inseln angereichert CpG-Motive. Dort ist die Frequenz an möglichen TLR9 Liganden pro Basenabschnitt folglich stark erhöht. Anhäufungen potentiell immunstimulatorischer CpG-Motive in einem kurzen Sequenzabschnitt wurden auch im mitochondrialen Genom

beschrieben (Collins, 2004). Solche Bruchstücke mit stark erhöhter CpG-Dichte könnten durch Fragmentierung der DNA bei Nekrose, Apoptose oder Nekroptose der Zellen entstehen (Garg et al., 2010; Krysko et al., 2011). Dabei wird teilweise abgebaute mitochondriale und/oder nukleäre DNA zusammen mit anderen Komponenten der Zelle bei deren Lyse in die Umgebung freigesetzt. Daher wurde der Fokus im nächsten Schritt auf die Identifikation und Charakterisierung möglicher CpG-Inseln im mitochondrialen Genom gelegt.

6.2.1 Identifikation der CpG-Inseln

Zur Identifikation mitochondrialer CpG-Inseln wurden zwei Online-Tools, **CpG-Island.com** und **EMBOSS CpG-Plot** mit den Parametern C+G Gehalt >50% und Relation Beobachtet/Erwartet=0,6 (Gardiner-Garden and Frommer, 1987) verwendet. Der Parameter Beobachtet/Erwartet gibt das Verhältnis der vorhandenen Häufigkeit des „CpG“-Motives in der Sequenz zu der Häufigkeit an, die sich bei einer rein statistischen Basenverteilung ergibt. Der Abstand zwischen zwei Inseln sollte dabei mehr als 100 Basen betragen, ansonsten wurden beide Abschnitte zu einer Insel zusammengefasst. Die Suche in der Pubmed-Referenzsequenz mit GenBank-Zugangsnummer X93334 lieferte insgesamt vier Sequenzabschnitte, die diese Kriterien erfüllten (siehe Abbildung 7). Daraufhin wurden Primer für diese Abschnitte entwickelt und das korrespondierende PCR-Amplifikat entsprechend des Startpunktes und seiner Länge als mt2107_250, mt7171_421, mt2998_356 und mt5927_533 benannt. Mt7171_421 ist identisch mit einer bereits beschriebenen mitochondrialen CpG-Insel (Collins, 2004). In dieser Publikation von Collins et al. ist ebenfalls die Sequenz mt15761_727 beschrieben. Diese Sequenz erfüllte nicht die oben beschriebenen Kriterien und diente daher als Negativkontrolle für die Interferon-Induktion. Die Benennung der Inseln ergab sich aus dem Startpunkt und der Länge des Amplifikates in der Referenzsequenz X93334. Folglich ist mt2107_250 ein 250 Basen großes Amplifikat und deckt die Sequenz zwischen den Positionen 2107 und 2357 ab (vgl. Ries, 2008).

6.2.2 Interferon-Induktion durch mitochondriale CpG-Inseln

Die vier CpG-Inseln wurden mittels konventioneller PCR amplifiziert, mit dem Qiagen PCR-Purification Kit aufgereinigt und jeweils 1µg DNA in 1×10^6 frisch isolierte periphere Blutzellen gesunder Spender mittels DOTAP (DOTAP) transfiziert, oder in Gegenwart des Transfektionspuffers (HBS) zur Zellkultur gegeben (vgl. Ries, 2008).

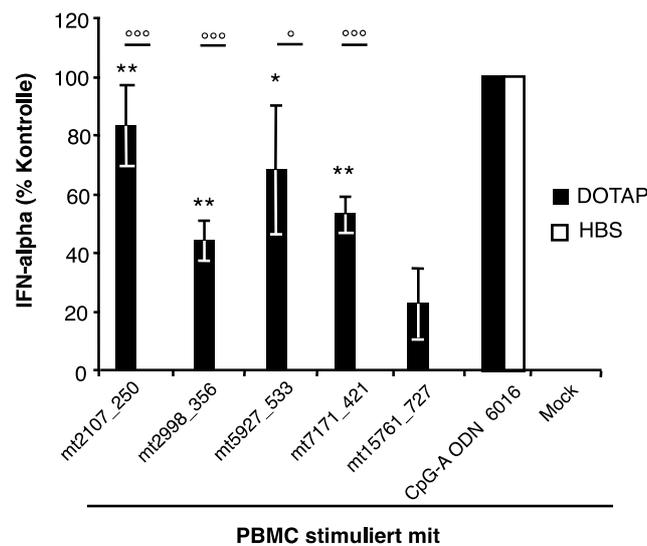


Abbildung 7 Interferon-Induktion der CpG-Inseln:

Es wurde jeweils 1µg aufgereinigtes PCR Amplifikat der CpG-Inseln in 1×10^6 PBMC mittels DOTAP transfiziert (DOTAP), identische Ansätze ohne DOTAP wurden ebenfalls mitgeführt (HBS). Der Interferon-alpha Gehalt im Zellkulturüberstand nach 20h wurde mittels ELISA bestimmt und ist standardisiert auf 2µM CpG-A ODN 6016 aufgetragen. Es zeigte sich nur bei den DOTAP-transfizierten Ansätzen eine Interferon-Induktion, dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum aus 3 - 9 unabhängigen Experimenten. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; gegenüber Mock, ° $p \leq 0,05$, °°° $p \leq 0,001$ wie eingezeichnet.

Die gefundenen CpG-Inseln induzierten ohne Transfektionsreagenz kein Interferon-alpha. Erst nachdem sie mit dem liposomalen Transfektionsreagenz DOTAP in die Zellen verbracht wurden, erhielt man deutlich messbare Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand. Die Interferon-Werte lagen hier zwischen $83,47 \pm 13,79\%$ der CpG-A Positivkontrolle bei mt2107_250 und $44,27 \pm 6,92\%$ CpG-A bei der Insel mt2998_356. Dabei zeigten sich alle vier Inseln signifikant unterschiedlich zu den unstimulierten Zellen und auch zu den Ansätzen, bei denen die DNA direkt zu den Zellen gegeben wurde (HBS) ($p \leq 0,05$). Die Kontrollsequenz mt15761_727 („Nicht-CpG-Insel“) zeigte sich nicht signifikant unterschiedlich zu den unstimulierten Zellen ($p > 0,05$).

6.2.3 Einfluss der *in vitro* Methylierung auf die Stimulation durch CpG-Inseln

Wie für die DNA-Spezies wurden auch für die PCR-Amplifikate der CpG-Inseln Untersuchungen über die Auswirkung der *in vitro* Methylierung auf die immunstimulatorische Kapazität der DNA gemacht. Zur Überprüfung der Methylierungsreaktion wurde ein Verdau auf ein Gel aufgetragen. Dafür wurden PCR-Amplifikate zweier CpG-Inseln mit der Schnittstelle der Endonukleasen „CCpGG“, verwendet.

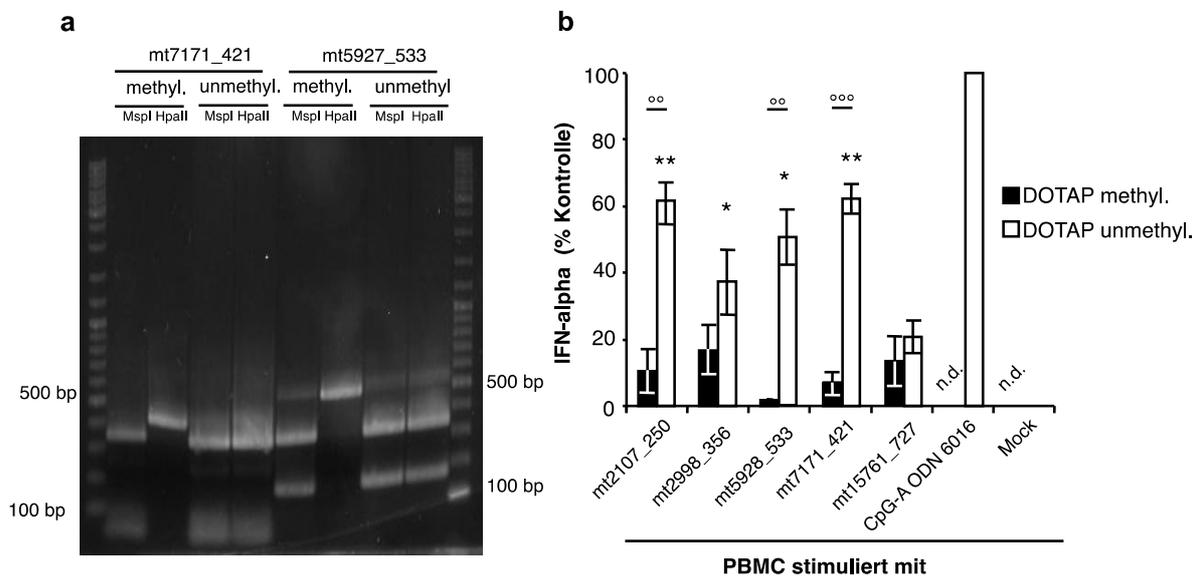


Abbildung 8 Effekt der Methylierung auf die Interferon-alpha Induktion durch CpG-Inseln:

a) Exemplarisches Gelbild des Restriktionsverdaues zur Überprüfung der *in vitro* Methylierung: Kontrollverdau der *in vitro* methylierten CpG-Inseln, es wurde jeweils 1µg DNA pro Spur für 60min verdaut und aufgetragen. Die methylierten Ansätze wurden von der methylierungssensitiven Nuklease HpaII nicht geschnitten (methyl. HpaII), jedoch von der nicht-sensitiven Endonuklease MspI, daher ist in beiden Fällen von einer erfolgreichen Methylierung auszugehen. **b)** Je 1µg der vier PCR-amplifizierten CpG-Inseln, und mt15761_727 als Kontrolle, wurden *in vitro* methyliert und unmethyliert mittels DOTAP in 1×10^6 PBMC transfiziert, und Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand nach 20 Stunden mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich nach *in vitro* Methylierung eine signifikant geringere Kapazität der CpG-Inseln, Interferon-alpha zu induzieren. Dargestellt sind Mittelwert und Standardirrtum, bezogen auf Prozent Interferonproduktion der CpG-A 6016 Kontrolle aus 3 - 8 unabhängigen Experimenten. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, gegenüber Mock; ° $p \leq 0,05$, °° $p \leq 0,01$, °°° $p \leq 0,001$ wie eingezeichnet; n.d. nicht durchgeführt, 2% Agarosegel, 75min, 120 Volt.

Das Ergebnis eines Verdaues ist exemplarisch in Abbildung 8a dargestellt und zeigt in den unmethylierten Ansätzen mit beiden Amplifikaten eine Spaltung der DNA. Die

methylierte DNA hingegen ergab bei Ansätzen mit HpaII nur eine Bande. Daraus lässt sich schließen, dass die CpG-Inseln *in vitro* komplett methyliert wurden. Nach Überprüfung der erfolgreichen Methylierungen wurden die CpG-Inseln in frisch isolierte mononukleäre Zellen gesunder Spender transfiziert und nach 20 Stunden Inkubation die Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand mit ELISA quantifiziert.

Nach DOTAP-Transfektion der methylierten bzw. nicht-methylierten DNA zeigte sich für die nicht methylierten Ansätze reproduzierbar eine signifikante, starke Interferon-alpha Freisetzung im Vergleich zu unstimulierten Ansätzen (Abbildung 8b). Sie lag zwischen $37,09 \pm 9,73\%$ und $61,46 \pm 6,27\%$ der CpG-A Kontrolle ($p \leq 0,05$). Die immunstimulatorische Kapazität der CpG-Inseln mt2107_250, mt5928_533 und mt7171_421 wurde durch *in vitro* Methylierung im Vergleich zu den unmethylierten Ansätzen signifikant reduziert ($p \leq 0,05$). Die Kontrollsequenz mt15761_727 erwies sich methyliert und unmethyliert als nicht unterschiedlich zu den unstimulierten Proben, die Differenz zwischen der methylierten und unmethylierten Fraktion war bei dieser Sequenz ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,05$).

6.2.4 Protein vermittelte DNA Aufnahmen

Bislang ließ sich nur eine Stimulation der plasmazytoiden dendritischen Zellen zeigen, wenn die körpereigene DNA mit Hilfe der künstlichen Reagenzes DOTAP in die Zellen verbracht wurde. Auf der Suche nach körpereigenen Transportern, die die Aufnahme frei zirkulierender DNA in Zellen verstärken könnten, fanden sich in der Literatur zwei Proteine mit den gesuchten Eigenschaften, das humane Cathelicidin LL-37 und HMGB1 (*engl. high-mobility group box 1 protein*) (Golec, 2007; Klune et al., 2008). Das einzige humane Cathelicidin, LL-37 oder hCAP-18 (*engl. human cathelicidin antimicrobial peptide*) ist ein 37 Aminosäure-Peptid mit breiter antimikrobieller und antiviraler Wirkung (Bucki et al., 2010). LL-37 bindet sowohl DNA- als auch RNA-Moleküle und transportiert diese als Komplex in das Endosom dendritischer Zellen, was zu einer Th₁-gewichteten Immunantwort führt (Bowdish, 2004). HMGB1 wird auch aktiv von Monozyten, Makrophagen und anderen dendritischen Zellen sezerniert (Lotze and Tracey, 2005; Bianchi and Manfredi, 2007; Klune et al., 2008). Über den Rezeptor für

fortgeschrittene glykosylierte Endprodukte (RAGE, *engl. Receptor for advanced glycosylated endproducts*) wird HMGB1 und komplexierte DNA in Zellen aufgenommen und in endosomale Kompartimente verbracht. (Tian et al., 2007). Im Weiteren wurde die Fähigkeit beider DNA-bindenden Proteine, die beschriebenen DNA-Sequenzen in PDC zu verbringen und eine Interferon-Antwort zu induzieren, untersucht.

Für die Charakterisierung der DNA Proteinkomplexe wurden als erstes 4×10^4 frisch isolierte plasmazytoide dendritische Zellen oder 1×10^6 periphere Blutzellen mit $1 \mu\text{g}$ DNA-Amplifikat aus drei CpG-Inseln und der Nicht-Insell-Kontrollsequenz, komplexiert mit $4 \mu\text{g}$ LL-37 oder $4 \mu\text{g}$ LL-37 und $2 \mu\text{g}$ HMGB1 für 20 Stunden inkubiert, das Ergebnis ist in Abbildung 9 abgebildet.

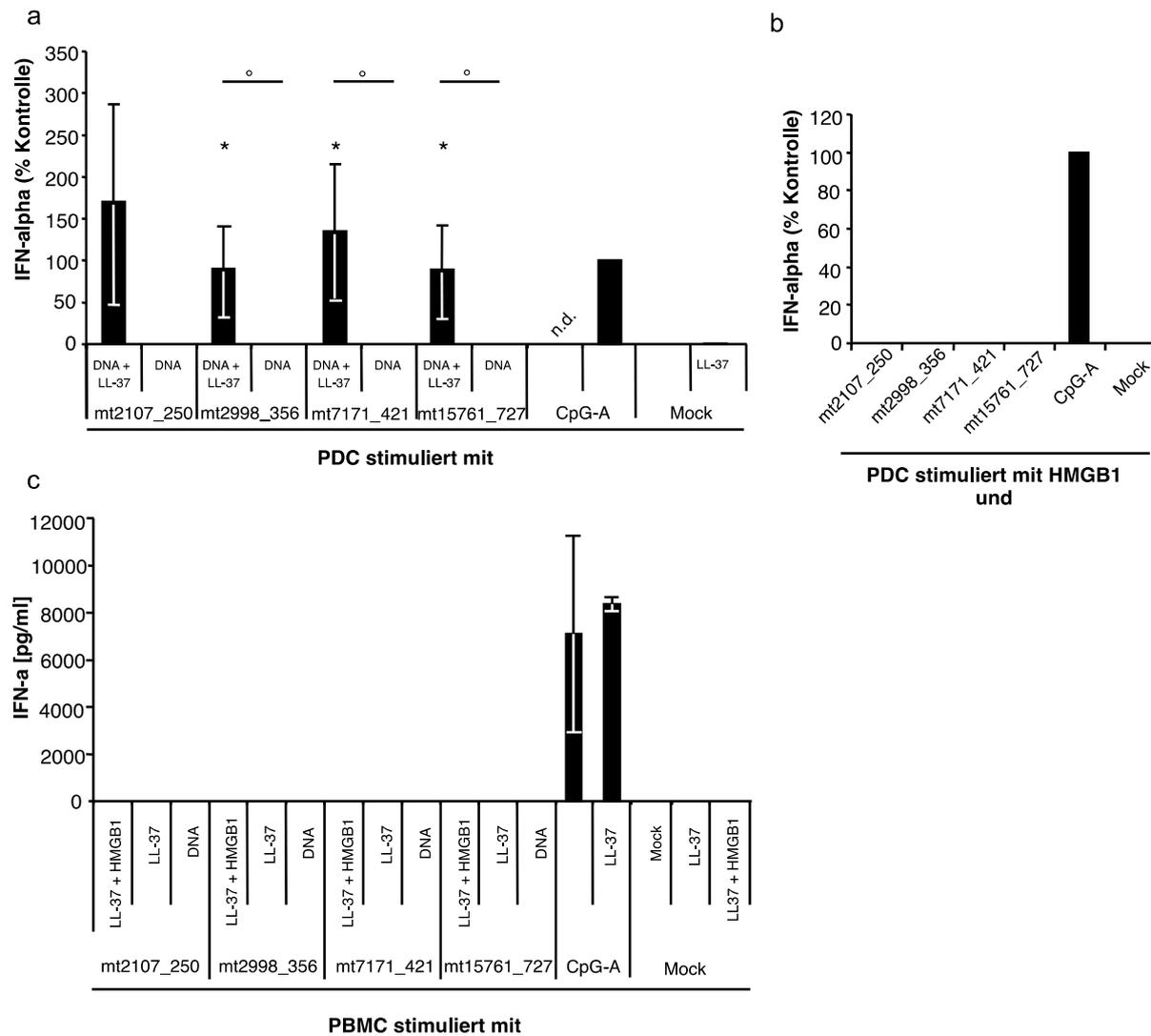


Abbildung 9 Protein-vermittelte Aufnahme der CpG-Inseln:

4×10^4 PDC wurden mit $1 \mu\text{g}$ PCR-Amplifikat **(a)** gebunden an $4 \mu\text{g}$ LL-37 (DNA+LL-37) oder nicht (DNA) für 20h stimuliert, dabei wurde die DNA mit Peptid 30min vorinkubiert. Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand wurden mittels Interferon-alpha ELISA bestimmt. Für den Effekt von HMGB1 alleine **(b)** oder in Kombination mit LL-37 **(c)** wurde $1 \mu\text{g}$ PCR-Amplifikat entweder mit $4 \mu\text{g}$ LL-37 (LL-37) und $4 \mu\text{g}$ LL-37 und $2 \mu\text{g}$ HGMB1 (LL-37+HMGB1) 30min vorinkubiert und anschließend auf 4×10^4 PDC **(b)** oder 1×10^6 PBMC **(c)** für 20h gegeben, Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA quantifiziert, ° $p \leq 0,05$ wie eingezeichnet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardirrtum aus **(a)** 3 - 4, **(b)** 1 oder 3 **(c)** unabhängigen Experimenten, Signifikanzen wurden mit Student's t-Test für gepaarte Proben (gegenüber Mock) und ungepaarten Proben (mit LL-37 gegenüber ohne LL-37) bestimmt; * $p \leq 0,05$ gegenüber Mock, ° $p \leq 0,05$ wie eingezeichnet, n.d. nicht durchgeführt.

In den Ansätzen mit LL-37 oder LL-37 und HMGB1 ließ sich mit den getesteten CpG-Inseln bei Stimulation von PBMC keine Interferon-Antwort nachweisen. Ein inhibierender Effekt des LL-37 auf die Interferon-Produktion konnte ausgeschlossen werden, da die CpG-A Kontrolle auch in Kombination mit HMGB1 (Abbildung 9b) oder LL-37 (Abbildung 9c) eine Interferon Reaktion auslöste. In der Folge wurden die

Versuche statt mit PBMC mit isolierten PDC wiederholt, wie dargestellt in Abbildung 9a und Abbildung 9b. Der DNA/Peptidkomplex der CpG-Inseln auf isolierten PDC induzierte unter Verwendung von rekombinanten LL-37 eine stark donorabhängige Interferon-Antwort. Der Zytokin-Spiegel war bei den stimulierten Ansätzen im Vergleich zu den nicht bzw. nur mit DNA aber ohne Peptid stimulierten Ansätzen signifikant höher. Dabei zeigte sich auch die nicht-CpG-Inseln mt15761_727 signifikant gegenüber unstimulierten Zellen ($p \leq 0,05$).

6.2.5 Geschlechtsspezifischer Unterschied in der Interferon-alpha Antwort

Wie für die fraktionierten zelleigenen DNA-Spezies wurden geschlechtsspezifische Unterschiede im TLR-Signalweg und in der Interferonantwort (Berghöfer et al., 2006; Meier et al., 2009; Khan et al., 2010; Seillet et al., 2012) bei den identifizierten CpG-Inseln untersucht, daher wurden auch hier die einzelnen Spender nach Geschlecht aufgeschlüsselt.

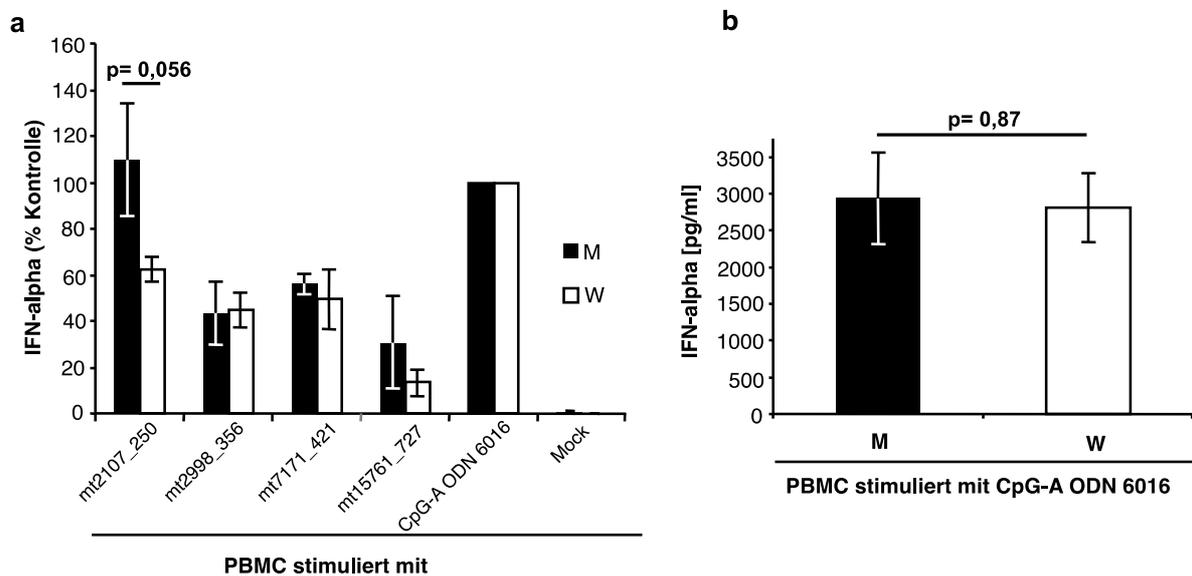


Abbildung 10 Geschlechtsspezifische Reaktion auf Stimulation mit CpG-Inseln:

Interferon-Produktion nach DOTAP-Transfektion mit $1 \mu\text{g}$ CpG-Inseln-DNA (**a**), aufgeschlüsselt nach Geschlecht. Dargestellt ist Mittelwert und Standardabweichung der Interferon-alpha Produktion von 1×10^6 PBMC nach 20h Stimulation bezogen auf die Kontrolle $2 \mu\text{M}$ CpG-A ODN 6016. Pro CpG-Inseln wurden 3 - 4 unabhängige Experimente je Geschlecht durchgeführt. Dabei zeigten sich trotz tendenziell höheren Interferon-alpha Werten bei männlichen Donoren keine signifikanten Unterschiede zu weiblichen Donoren. Die CpG-A Kontrolle (**b**) aus je 8-10 unabhängigen Experimenten zeigte ebenfalls keine Unterschiede in der Interferon-Antwort, die Daten sind identisch mit denen in Abbildung 6b.

Die Interferon-Antwort der mit CpG-Inseln und DOTAP stimulierten PBMC zeigte auch hier trotz tendenziell höherer Interferon-alpha Werten bei den männlichen Spendern keinen signifikanten Unterschied zu denen weiblicher Spender (Abbildung 10a). Die quantifizierten Zytokin-Spiegel im Zellkulturüberstand lagen bei männlichen Spendern zwischen $60\pm 10\%$ der CpG-A 6016 Positivkontrolle und zwischen $44\pm 5\%$ der CpG-A Kontrolle bei weiblichen Donoren. Auch bei den gemessenen Interferon-Werte des CpG-A ODN 6016, das zur Standardisierung der Werte verwendet wurde, dargestellt in Abbildung 10b, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kollektiven.

6.3 Identifikation und Charakterisierung mitochondrialer ODN

Bei kommerziellen, immunmodulatorischen CpG-ODN handelt es sich um etwa 20 Basenpaar lange, einzelsträngige Oligodeoxynukleotide mit einem Phosphodiester-Rückgrat. Sie werden auch ohne Transfektionsreagenz oder Peptide in Immunzellen aufgenommen und bewirken dort sequenzabhängig eine Aktivierung oder Reifung der Zelle (Krieg, 2001). Ausgehend von diesen etablierten Sequenzen wurde im mitochondrialen Genom nach möglichen natürlichen immunstimulatorischen Abschnitten gesucht. Hier wurde nach der mehrmals hintereinander folgenden Basenfolge „CG“ (in Tabelle 11 grün dargestellt), dem klassischen CpG-A Motiv (rot dargestellt) und palindromen Sequenzen (in Tabelle 11 unterstrichen), oder einer Kombination dieser Merkmale gesucht (vgl. Ries, 2008).

Tabelle 11 Sequenzen der mitochondrialen Oligodeoxynukleotide:

Sequenz-Ähnlichkeiten	ODN-Bezeichnung	Sequenz
CpG-C	mt6030_17	5'-TATT <u>CG</u> AGC <u>CG</u> AGCTGG-3'
CpG-A	2216	5'-GGGGG <u>GACGATCGT</u> CGGGGG-3'
CpG-A	mt6160_21	5'-CCCC <u>CG</u> ATAT <u>GGCGTT</u> TCCCC-3'
CpG-A	6016	5'-TC <u>GACGTC</u> GTGGGG-3'
CpG-P	mt2234_31	5'-GGTTGGG <u>GCG</u> ACCT <u>CG</u> GAGCAGAA <u>CCCAACC</u> -3'
CpG-A	mt16073_28	5'- <u>CG</u> ATAGCATTG <u>CGA</u> <u>GACGCT</u> GGAGCCGG-3'
CpG-C	mt7472_24	5'-CATCACAAGA <u>CGTCTT</u> GCACTCAT-3'
CpG-B/C	mt6745_26	5'-GAGAAGCCTT <u>CGCTT</u> CGAAGCGAAAAG-3'
CpG-C	mt9329_18	5'-GGCTT <u>CGAAGCCG</u> CCGCC-3'
CpG-B	mt3670_23	5'-GCATCAA <u>ACTCAA</u> ACTA <u>CG</u> CCCT-3'
CpG-B	mt11096_24	5'-CCCCCTGA <u>AAGCTT</u> CAC <u>CGGCG</u> CAG-3'
CG im Palindrom	mt2111_18	5'- <u>GCCCGT</u> GAAAGAGG <u>CGGGC</u> -3'
nicht vorhanden	mt880_22	5'-GAACAGGGCCCTGAAG <u>CGCGTA</u> -3'
nicht vorhanden	mt16338_23	5'-GCCACAGCACTTAAACACATCTCT-3'
nicht vorhanden	mt1004_16	5'-GGAAAGTGCACCTGGA-3'

Liste der mitochondrialen Oligodeoxynukleotide (mtODN), grün dargestellt sind „CG“, unterstrichen mögliche Palindrome, rot klassische CpG-A Motive bestehend aus zwei 5'-Purinen und zwei 3'-Pyrimidinen, das CpG flankierend. „Sequenz-Ähnlichkeiten“ beschreibt die Ähnlichkeit mit kommerziellen CpG-ODN Klassen.

In der untersuchten Referenzsequenz haben sich elf Sequenzabschnitte mit den geforderten Charakteristika gefunden. Zusätzlich wurden zwei Kontrollsequenzen mit „GC“-Motiv, mt16338_23 und mt1004_16, ausgesucht. Bei der Suche war keine auffällige Häufung der Sequenzen in einem Abschnitt des mitochondrialen Genoms erkennbar, alle mitochondrialen ODN mit Ausnahme von mt3670_23 und mt1004_14 liegen in den beschriebenen CpG-Inseln, was sich durch die CpG-Frequenz in den Inseln erklären lässt. Ebenfalls in Abbildung 11 enthalten sind die Sequenzen der beiden kommerziellen optimierten CpG-A ODN 2216 und CpG-A 6016. Die untersuchten mtODN und CpG-A 2216 wurden mit Phosphodiester-Rückgrat synthetisiert eingesetzt. Die Nomenklatur der mtODN ist identisch zu denen der CpG-Inseln, mtxxxx_yy wobei xxxx den Startpunkt und yy die Länge des ODN angibt. Sieben der entdeckten mitochondrialen Oligodeoxynukleotide und CpG-A ODN 2216 wurden in 1×10^6 frisch isolierte PBMC entweder direkt zur Zellkultur gegeben (HBS) oder wiederum mit dem Transfektionsreagenz DOTAP (DOTAP) gemischt und auf die Zellen pipettiert. Der Interferon-alpha Spiegel im Zellkulturüberstand wurden nach 20 Stunden Inkubation mittels ELISA quantifiziert (Abbildung 11).

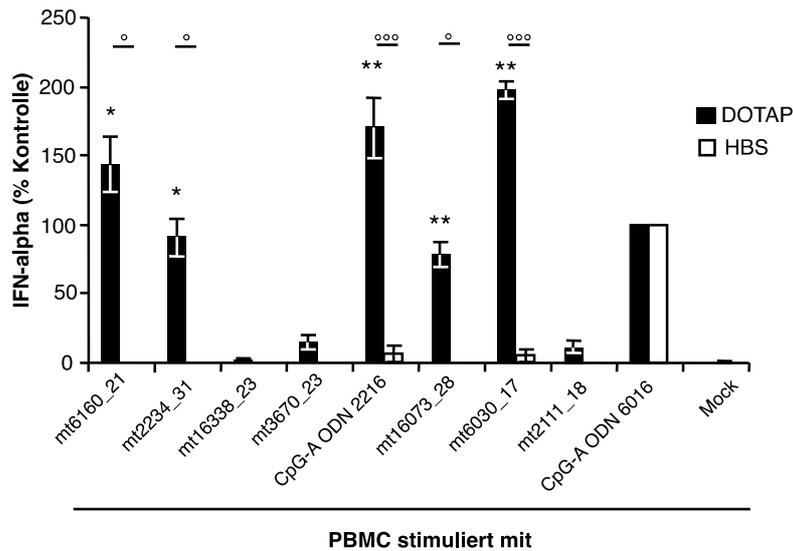


Abbildung 11 Interferon-alpha Induktion durch einzelsträngige mitochondriale Oligodeoxynukleotide:

Hierfür wurden 1×10^6 PBMC für 20h mit je $2 \mu\text{M}$ ODN stimuliert, pro DNA mit DOTAP-Transfektion (DOTAP) und ohne DOTAP (HBS). Die Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand wurden mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt sind Resultate aus 3 - 5 unabhängigen Experimenten, dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum, bezogen auf die Interferon-Induktion von $2 \mu\text{M}$ CpG-A 6016. Es zeigte sich, dass die mtODN als Einzelstrang DNA (sense) in der Lage sind, eine Interferon-alpha Antwort zu induzieren, wenn sie mit DOTAP in PBMC transfiziert werden, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; gegenüber nicht stimulierten Zellen (Mock), ° $p \leq 0,05$, °° $p \leq 0,01$, °°° $p \leq 0,001$ wie eingezeichnet.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass sich die getesteten Oligodeoxynukleotide in zwei Gruppen aufteilen lassen: ODN mit ausgeprägter Fähigkeit, Interferon zu induzieren, nachdem sie mit DOTAP transfiziert worden sind, und Sequenzen, die sich als inert herausstellten. Mt6160_21, mt2234_31, das optimierte A-Klasse CpG-ODN 2216, mt17603_28 und mt6030_17 verursachten eine Interferon-Freisetzung in den Zellkulturüberstand von $78,64 \pm 8,81\%$ bis $198 \pm 6,55\%$ der Positivkontrolle CpG-A 6016. Diese ODN zeigten sich signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$) zu den unstimulierten Zellen (Mock) und zu den parallelen Ansätzen ($p \leq 0,05$), bei denen die ODN lediglich in entsprechender Konzentration in die Zellkultur zugegeben wurden. Die Ansätze, in denen die DNA nur direkt zu den Zellen pipettiert wurde, zeigten keine Interferon-Antwort, die signifikant von den unstimulierten Zellen abwich. Das gilt ebenso für CpG-A ODN 2216, das beschrieben ist, mit einem Phosphorothioat-Rückgrat hohe Mengen Interferon-alpha in PDC zu induzieren (Vollmer et al., 2004). Mit Phosphodiester-Rückgrat regte es die Zellen nur zu einer schwachen Interferon-Produktion von $6,65 \pm 5,90\%$ CpG-A an. Die anderen Oligodeoxynukleotide, mt16338_23, mt3670_23 und

mt2111_18 waren weder wenn sie direkt in die Kultur gegeben (HBS) noch mithilfe DOTAP transfiziert wurden in der Lage, relevante Mengen Interferon-alpha zu induzieren. Bei diesen ODN lag der höchste gemessene Interferon-Wert bei $11,9 \pm 4,6\%$ CpG-A. Insgesamt konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass kurze mitochondriale Sequenzen in der Lage sind, eine ausgeprägte Interferon-Antwort hervorzurufen (vgl. Ries, 2008).

6.3.1 Interferon-Induktion der mtODN als Doppelstrang-DNA

Es ist davon auszugehen, dass fragmentierte freigesetzte DNA im Organismus als Doppelstrang und nicht als Einzelstrang vorliegt. Um diesem physiologischen Zustand näher zu kommen, wurden die mitochondrialen Oligodeoxynukleotide mit ihrer revers komplementären antisense-Sequenz zu Doppelstrang-DNA hybridisiert und auf ihre Interferon-induzierende Fähigkeit überprüft (vgl. Ries, 2008).

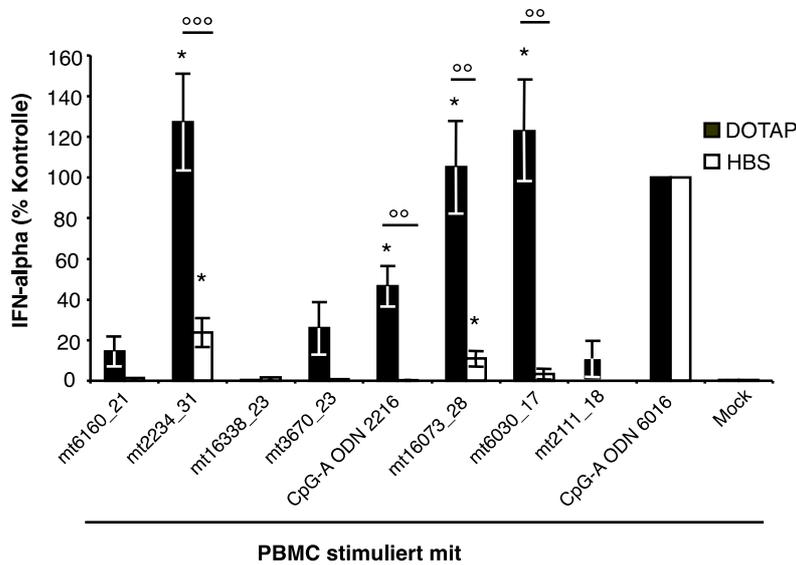


Abbildung 12 Immunstimulatorische Kapazität der zu Doppelstrang hybridisierten mtODN:

Es wurden 1×10^6 PBMC mit $2 \mu\text{M}$ Oligodeoxynukleotide in Ansätzen mit DOTAP-Transfektionsreagenz (DOTAP) und ohne DOTAP stimuliert (HBS). Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand wurden nach 20h Inkubation mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum 4 - 5 unabhängiger Experimente, standardisiert auf $2 \mu\text{M}$ CpG-A ODN 6016. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ gegenüber den entsprechenden unstimulierten Zellen (Mock), ° $p \leq 0,05$; °° $p \leq 0,01$; °°° $p \leq 0,001$ wie eingezeichnet.

Mit mt2234_31, CpG-A2216, mt16073_26 und mt6030_16 stimulierte PBMC gesunder Donoren lieferten nach DOTAP-Transfektion der ODN signifikant mehr Interferon-alpha im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen ($p \leq 0,05$). Diese vier Ansätze zeigten sich auch signifikant unterschiedlich zu ihren Vergleichsansätzen ohne DOTAP, bei denen die DNA lediglich zu den Zellen zugegeben wurde (HBS) ($p \leq 0,01$). Während alle anderen getesteten DNA-Präparationen ohne Vermischung mit DOTAP oder als Immunkomplex an ein Peptid gebunden keine messbare Interferon-Antwort hervorriefen, zeigten sich mt2234_31 und mt16703_28 als Doppelstrang-ODN in der Lage, reproduzierbar eine signifikante Interferon-Antwort zu induzieren. Dabei rief mt2234_31 eine Interferon-Antwort von $23,9 \pm 7,1\%$ der CpG-A Kontrolle und mt16073_28 eine Interferon-Antwort von $10,9 \pm 3,8\%$ CpG-A 6016 hervor.

6.3.2 Vergleich der mtODN als Einzel- und Doppelstrang

Zusätzlich zur Charakterisierung der Einzelstrang ODN in Abbildung 11 und der Doppelstrang-ODN, dargestellt in Abbildung 12, wurden die Zytokinspiegel der mit Einzel- und Doppelstrang-ODN transfizierten Zellen verglichen (vgl. Ries, 2008).

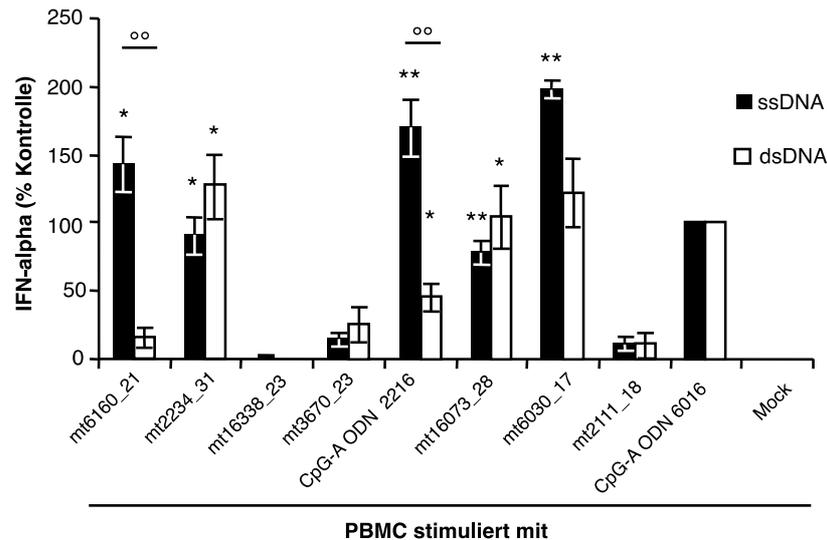


Abbildung 13 Vergleich der immunstimulatorischen Kapazität der Einzel-/Doppelstrang-mitochondrialen Oligodeoxynukleotide nach DOTAP-Transfektion:

Es wurden 2 μ M DOTAP-komplexierte Oligodeoxynukleotide als Einzelstrang (ssDNA) oder hybridisiert mit dem entsprechenden revers komplementären ODN als Doppelstrang-DNA (dsDNA) in 1 \times 10⁶ PBMC gesunder Spender transfiziert, der Interferon-alpha Spiegel im Zellkulturüberstand wurde nach 20h Inkubation mittels ELISA quantifiziert. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum aus 4 - 5 unabhängigen Experimenten, standardisiert auf 2 μ M CpG-A ODN 6016. * p \leq 0,05; ** p \leq 0,01 gegenüber unstimulierten Zellen (Mock), ° p \leq 0,05, °° p \leq 0,01 wie eingezeichnet.

Hier zeigten mt6160_21, mt16030_17, aber auch CpG-A 2216 als Doppelstrang-ODN eine deutlich verringerte Interferon-Induktion im Vergleich zu Einzelstrang-Ansätzen, die für mt6160_21 und CpG-A ODN 2216 signifikant reduziert (p \leq 0,01) war. Im Gegensatz dazu erzeugten mt2234_31 und mt16073_28 als Doppelstrang höhere Interferon-Spiegel als die Einzelstrang ODN, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Mt16338_23, mt3670_23 und mt2111_18 ergaben weder als Einzel- noch als Doppelstrang eine robuste Interferon-Antwort nach DOTAP Transfektion.

6.3.3 Proteinvermittelte Aufnahme der mtODN in PDC

Wie die deutlich größeren CpG-Inseln (vergleiche Kapitel 6.2.2) wurden auch mtODN auf ihre immunstimulatorische Kapazität nach Vorinkubation mit den beschriebenen Proteinen LL-37 und HMGB1 überprüft.

Die Exposition plasmazytoider dendritischer Zellen mit mtODN/Peptid-Immunkomplexen führte zu keiner signifikanten Interferon-Antwort verglichen mit der mock-Stimulation. Dabei machte es keinen Unterschied, ob PBMC oder isolierte plasmazytoide dendritische Zellen verwendet wurden, und ob die mitochondrialen ODN mit LL-37 oder HMGB1 vorinkubiert wurden (Abb. 14a, b). Um zu zeigen, dass die verwendeten Zellen in der Lage waren, mittels Interferon-alpha Sekretion auf den Stimulus zu reagieren, wurden die Zellen in parallelen Ansätzen mittels DOTAP-Transfektion der mtODN stimuliert (Abbildung 14b) (vgl. Ries, 2008). Dies erzeugte eine Interferon-Antwort zwischen 2000 - 6000pg/ml. In Abbildung 14c wurde HMGB1 und CpG-6016 auf die Zellen gegeben, was zu einer starken Interferon-Antwort führte. Somit konnte ein toxischer Effekt auf die Zellen durch das DNA/HMGB1 Gemisch ausgeschlossen werden.

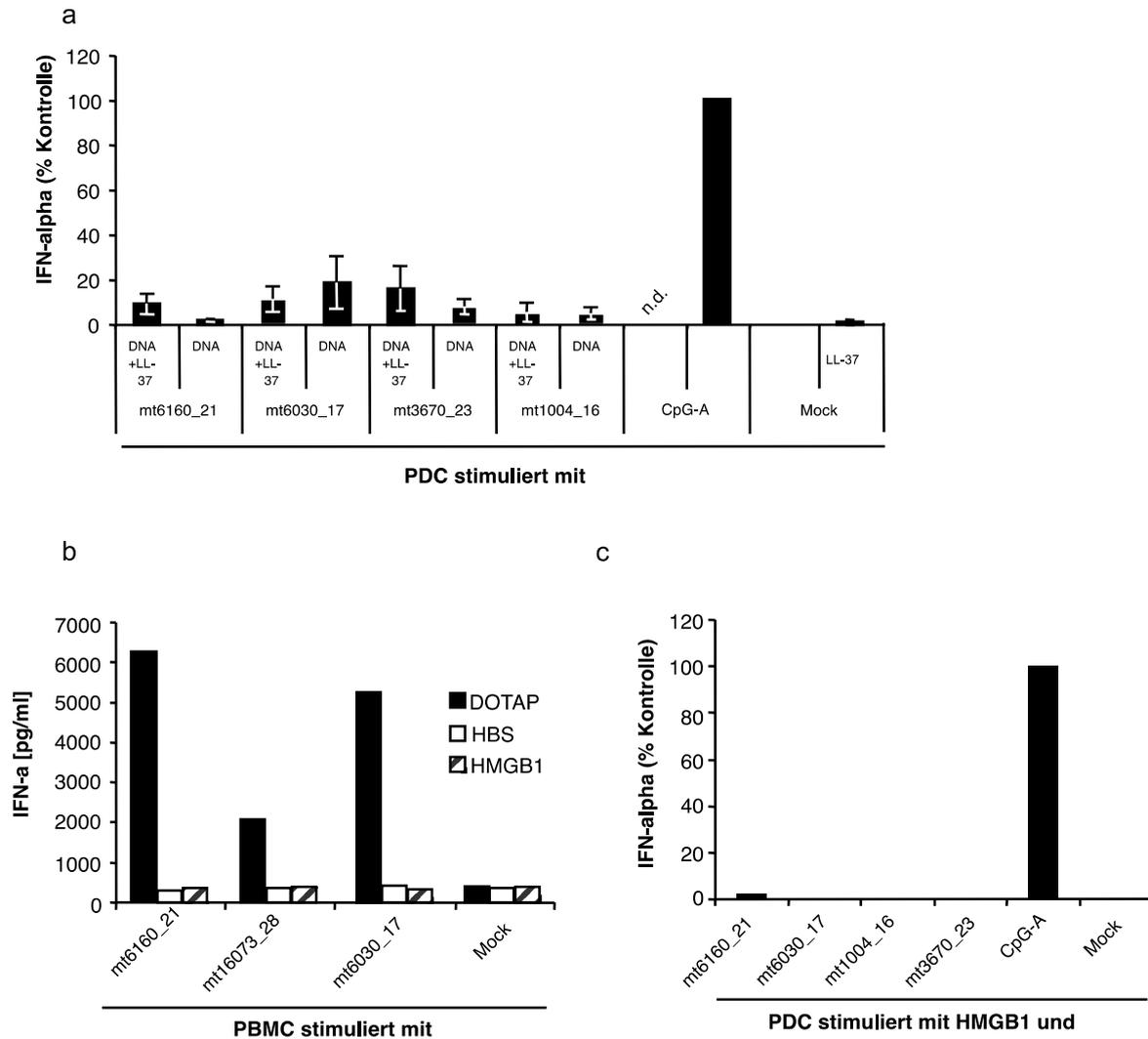


Abbildung 14 LL-37 vermittelte Aufnahme von mtODN in PDC:

a) 4×10^4 PDC wurden mit $1 \mu\text{g}$ mtODN gebunden an $4 \mu\text{g}$ LL-37 (DNA+LL-37) und DNA ohne LL-37 (DNA) für 20h inkubiert. **b)** 1×10^6 PBMC wurden mit $1 \mu\text{g}$ mtODN, entweder transfiziert mit DOTAP (DOTAP), direkt zugegeben (HBS) oder komplexiert an $2 \mu\text{g}$ HMGB1 (HMGB1), stimuliert. **c)** Ebenfalls $1 \mu\text{g}$ mtODN oder CpG-A 6016 wurde mit $2 \mu\text{g}$ HMGB1 komplexiert und für 20h zu 4×10^4 PDC gegeben. Die Interferon-Spiegel im Zellkulturüberstand wurden mittels Interferon-alpha ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle wurden bei **b)** zusätzliche Ansätze mit DOTAP-Transfektion mitgeführt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardirrtum aus 3 - 4 (**a**) bzw. 1 (**b**, **c**) unabhängigen Experimenten, standardisiert auf die Interferon-Produktion durch $2 \mu\text{M}$ CpG-A ODN 6016. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den jeweiligen unstimulierten (Mock) Ansätzen, n.d. nicht durchgeführt.

6.3.4 Regulation der Oberflächenmarker auf PDC nach mtODN-Stimulation

Plasmazytoide dendritische Zellen wandern nach ihrer Aktivierung in Lymphknoten ein und fungieren dort als antigenpräsentierende Zellen, um mit Effektorzellen des adaptiven Immunsystems zu kommunizieren. Um den Effekt der mitochondrialen ODN

auf diese Funktion der PDC zu untersuchen, wurde die Expression von Oberflächenmarkern nach Stimulation durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde der Maturationsmarker CD83 und der Migrationsmarker CCR7 auf der Oberfläche unstimulierter und gegenüber mtODN und kommerziellen CpG-ODN exponierter PDC innerhalb frisch isolierter PBMC quantifiziert. Für die Untersuchungen wurden jeweils 1×10^6 PBMC mit drei mitochondrialen ODN mit Sequenzähnlichkeiten zu kommerziellen CpG-ODN, nämlich mt6160_21 ähnlich zu CpG-A, mt6030_17 mit Ähnlichkeit zu CpG-B, und mt3670_23 mit Merkmalen publizierter Klasse-C CpG-ODN für 20 Stunden mit und ohne DOTAP stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die entsprechenden Oligodeoxynukleotide CpG-A ODN 6016, CpG-B ODN 10103 und CpG-C ODN 10109 wurden als Kontrollen mitgeführt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden PDC als CD304⁺, CD14⁻ und CD11c⁻ Zellen innerhalb der PBMC identifiziert.

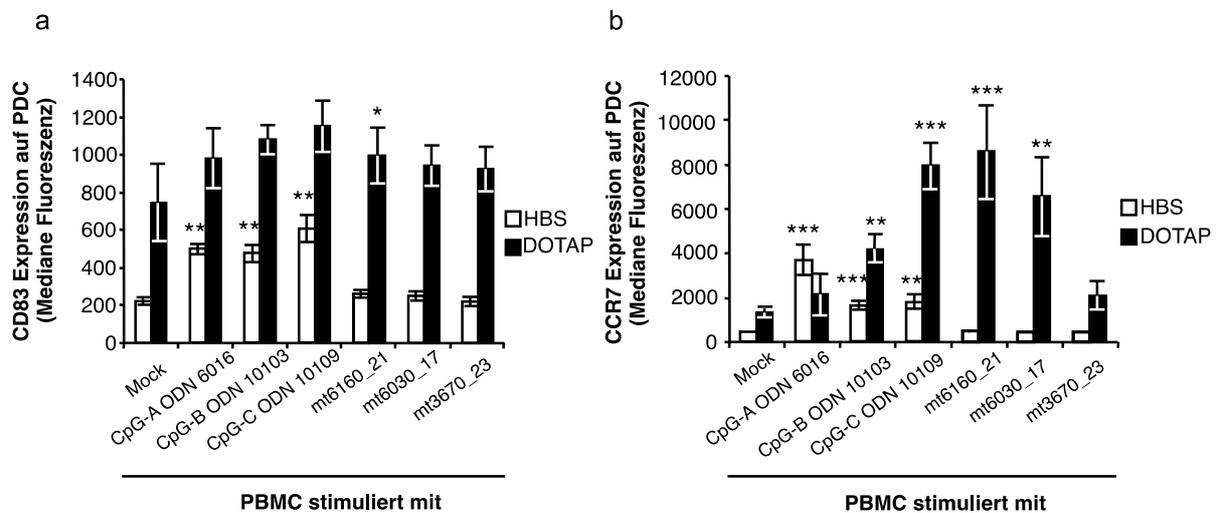


Abbildung 15 Regulation der Oberflächenmarker CD83 und CCR7 auf PDC nach Stimulation mit ODN:

1×10^6 PBMC wurden für 20 Stunden mit $2 \mu\text{M}$ verschiedener Oligodeoxynukleotide mittels DOTAP transfiziert (DOTAP) oder die ODN wurden direkt in die Zellkultur gegeben (HBS). Als Kontrolle dienten je ein kommerzielles Oligodeoxynukleotid der Klassen A, B, C. Regulation der Oberflächenmarker CD83 **(a)** und CCR7 **(b)** auf PDC innerhalb der PBMC wurde durchflusszytometrisch bestimmt, dargestellt als Mittelwerte und Standardirrtum der medianen Fluoreszenz 5 unabhängiger Experimente, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ gegenüber Mock.

Die Untersuchungen ergaben einen maturierenden Effekt der synthetischen CpG-ODN auf PDC (Abbildung 15a). Gezeigt werden konnte eine signifikant erhöhte CD83 Expression bei den CpG-ODN ($p \leq 0,01$). Nach DOTAP-Transfektion regulierten die kommerziellen CpG-ODN dagegen CD83 nicht signifikant, was insbesondere an der stärkeren Autofluoreszenz der mock-stimulierten Zellen lag. Die mitochondrialen ODN hatten ohne Transfektionsreagenz keinen Einfluss auf die CD83-Expression. Lediglich das mitochondriale ODN mt6160_21 zeigte sich signifikant unterschiedlich zu den unstimulierten Ansätzen. Das spricht für einen maturierenden Effekt dieser immunstimulatorischen Sequenz auf PDC.

Die synthetischen CpG-Oligonukleotide waren in der Lage, ohne Transfektionsreagenz den Migrationsmarker CCR7 signifikant hochzuregulieren ($p \leq 0,01$) (Abb. 15b). CpG-B ODN 10103 und CpG-C ODN 1019 induzierten auch nach DOTAP-Transfektion eine CCR7 Expression, die signifikant unterschiedlich zu der Expression des Markers auf unstimulierten Zellen war ($p \leq 0,01$). Die Ansätze der mitochondrialen ODN hingegen waren ohne DOTAP-Transfektion (HBS) nicht unterschiedlich zu Mock, nach Transfektion mit DOTAP zeigten sich neben mt6160_21 auch mt6030_17 unterschiedlich zu Mock ($p \leq 0,01$). Dies weist die prinzipielle Fähigkeit der mitochondrialen ODN hin, nicht nur die Interferonfreisetzung zu induzieren, sondern auch plasmazytoide dendritische Zellen zu maturieren und ihre Abwanderung in Lymphknoten zu veranlassen. Auch zeigt es, dass die mitochondrialen ODN im Vergleich zu den optimierten CpG-ODN, mit denen sie Sequenzähnlichkeiten haben, die gemessenen Oberflächenmarker unterschiedlich regulieren.

6.4 Das mitochondriale Oligodeoxynukleotid mt2234_31

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass mt2234_31 und mt16073_28 als Doppelstrang in der Lage sind, ohne DOTAP-Transfektion eine Interferon-Antwort in PBMC hervorzurufen. Im Weiteren wurden die Experimente auf mt2234_31 fokussiert, da es eine stärkere Kapazität, Interferon-alpha zu induzieren, zeigte.

6.4.1 Aktivierung von PDC, NK- und B-Zellen nach mt2234_31 Stimulierung

Neben der Interferon-Induktion sollte im Folgenden auch der Effekt von mt2234_31 auf die Expression der PDC-Oberflächenmarker CD83 und CCR7, sowie der Effekt auf andere durch CpG stimulierbare Zellpopulationen, nämlich NK- und B-Zellen (Ballas et al., 1996; Vollmer et al., 2004) anhand des Aktivierungsmarkers CD69 mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 und Abbildung 17 zusammengefasst. Als Vergleich für die Effektivität der Stimulierung wurden drei kommerzielle CpG-ODN, CpG-A ODN 6016, CpG-B ODN 10103, und das neuentwickelte Klasse P CpG-ODN 21798 in identischer Konzentration eingesetzt.

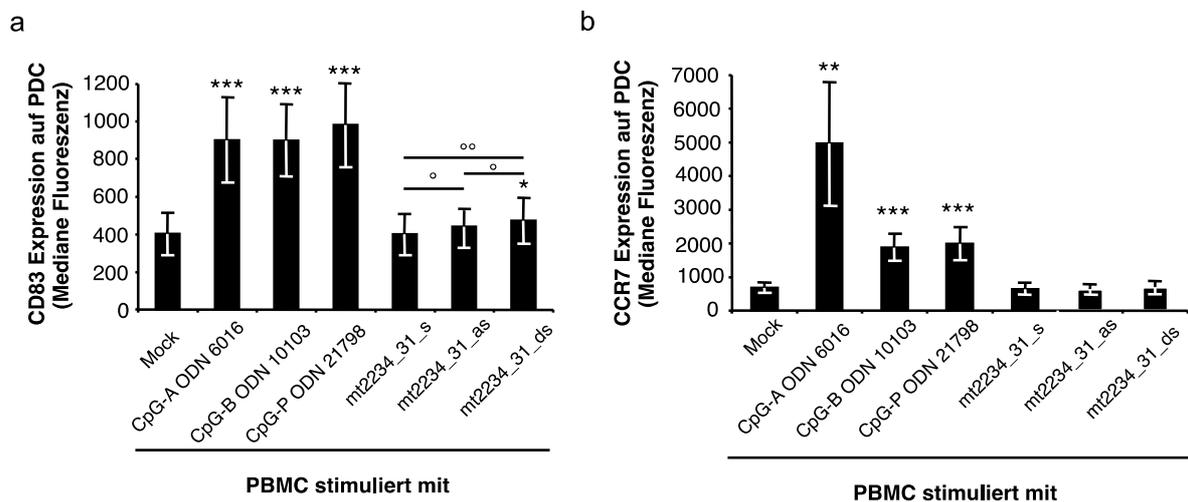


Abbildung 16 Effekt von mt2234_31 auf die Regulation der Oberflächenmarker auf PDC:

1x10⁶ PBMC wurden mit 2µM der drei CpG-Klassen sowie mit mt2234_31 als Einzelstrang (_s, sense-Orientierung und -as, antisense-Orientierung) sowie als Doppelstrang (_ds) für 20h stimuliert. Die Regulation des Reifungsmarkers CD83 **(a)** und Migrationsmarkers CCR7 **(b)** wurde untersucht. Dargestellt sind Mittelwert und Standardirrtum der mittleren Fluoreszenz 5 unabhängiger Experimente, * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0,001 gegenüber Mock; ° p<0,05, °° p<0,01 wie eingezeichnet.

Für diese Untersuchungen wurden frisch isolierte PBMC gesunder Spender für 20 Stunden mit 2µM Atto488-konjugiertem mt2234_31 als sense-, antisense- und Doppelstrang-ODN inkubiert. Die Stimuli wurden direkt in entsprechender Konzentration zur Zellkultur gegeben. Dargestellt in Abbildung 16 ist das Ergebnis 5 unabhängiger Experimente als Mittelwert und Standardirrtum der Medianen Fluoreszenz-Intensität (MFI). Es zeigte sich eine hoch signifikante Regulierung sowohl

von CD83 als auch CCR7 durch die synthetischen, kommerziellen CpG-Oligodeoxynukleotide ($p \leq 0,01$). Mt2234_31 war als Doppelstrang-DNA in der Lage, CD83 signifikant zu regulieren, wohingegen sich bei den beiden Einzelstrang ODN kein Unterschied zu den unstimulierten Zellen ergab. Auf den Migrationsmarker CCR7 auf PDC zeigte mt2234_31 weder als Einzelstrang noch als Doppelstrang einen signifikanten Effekt.

Neben den PDC wurden auch andere durch CpG-ODN aktivierbare Zellen in einem identischen Versuchsaufbau untersucht, die NK-Zellen wurden als CD56⁺, CD3⁻-Zellen; B-Zellen als CD19⁺ Zellpopulation innerhalb der Lymphozyten identifiziert. CD56⁺ Natürliche Killerzellen lassen sich weiter in zytotoxische CD56^{dim} und Zytokin-sezernierende CD56^{bright} Zellen einteilen.

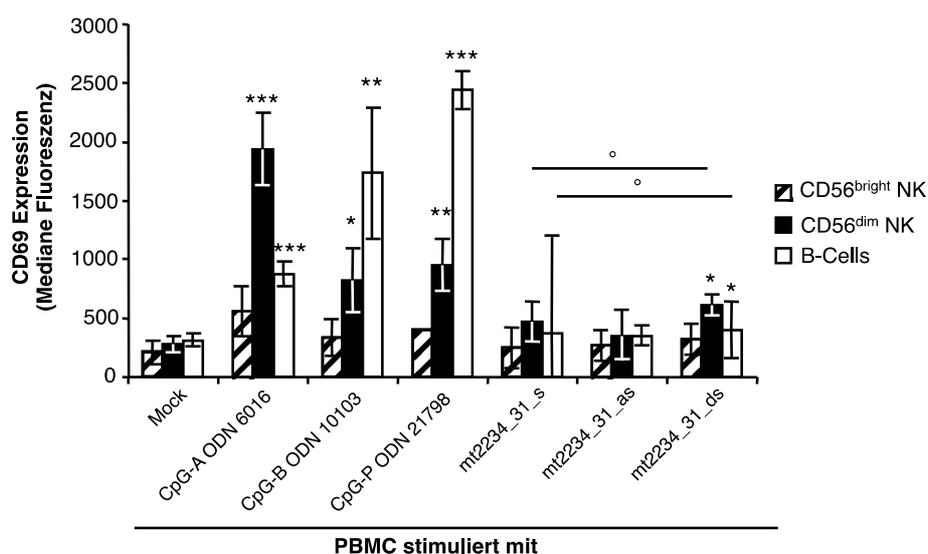


Abbildung 17 Aktivierung von B- und NK-Zellen durch mt2234_31:

PBMC wurden für 20h mit drei CpG-Oligodeoxynukleotiden (Klasse -A, -B, -P) und mt2234_31 als sense (_s), antisense (_as) und Doppelstrang (_ds) inkubiert. Die Regulation des Reifungsmarkers CD69 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt, dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum 4 - 5 unabhängiger Experimente. $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ gegenüber Mock, ° $p \leq 0,05$ wie eingezeichnet.

Die Experimente zeigten eine Aktivierung der CD56^{dim} NK-Zellen und B-Zellen durch die verwendeten Klasse A-, B-, und P-ODN, wobei die CD69-Expression auf B-Zellen nach Stimulation mit CpG-B und CpG-P deutlich ausgeprägter als mit CpG-A war. Die CD69-Expression der B-Zellen zeigte bei CpG-B eine 5,4-fach erhöhte Fluoreszenz im Vergleich

zu unstimulierten Zellen, bei CpG-P eine 7,7-fach stärkere Fluoreszenz. Dagegen aktivierte CpG-A ODN 6016 die CD56^{dim} NK-Zellen am effektivsten ($p \leq 0,01$, bei einer um Faktor 6,8-fach erhöhten Fluoreszenz). Von den drei mt2234_31 Präparationen zeigte sich nur der hybridisierte Doppelstrang fähig, Zellen zu stimulieren. Dabei waren die Ergebnisse der zytotoxischen NK56^{dim} Zellen sowie der B-Zellen signifikant unterschiedlich zu den unstimulierten Ansätzen ($p \leq 0,01$).

6.4.2 Anheftung von mt2234_31_atto488 an PBMC

Parallel zur Quantifizierung der Oberflächenmarker wurde bestimmt, inwieweit sich die Atto488-Fluoreszenz des Farbstoff-gekoppelten ODN mt2234_31 an CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, B- und T-Zellen sowie Monozyten nach 20stündiger Inkubation mit dem Stimulus anheftete. Die Fluoreszenz ist ein Marker für den Grad der Anheftung bzw. Aufnahme des mitochondrialen Doppelstrang-ODN an die Zellen, was Voraussetzung für eine Aktivierung und Stimulierung der Zellen ist.

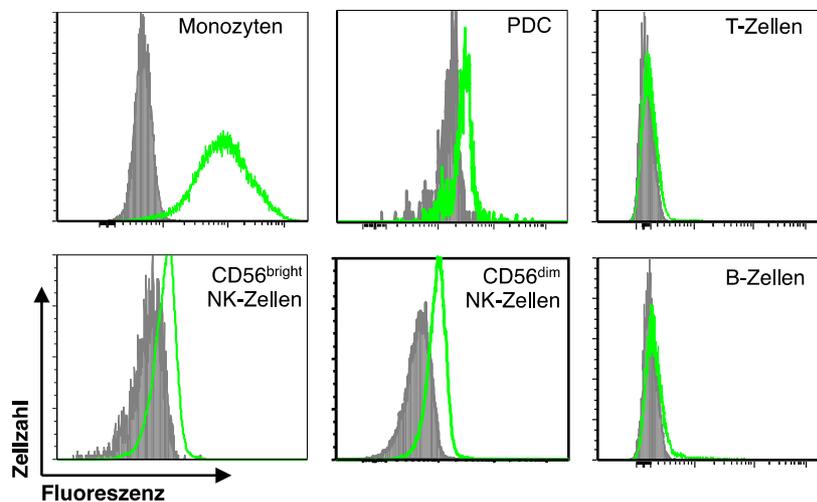


Abbildung 18 Anheftung des fluoreszenzmarkierten mtODN mt2234_31 an unterschiedliche Zellpopulationen:

Mononukleäre Zellen im peripheren Blut wurden mit 3'-Atto488-markiertem mtODN2234_31_ds für 20 Stunden inkubiert, die Anheftung der DNA an die einzelnen Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Grau: nicht exponierte Zellen, grün: exponierte Zellen. Die Histogramme sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

Die effektivste Anheftung zeigte sich bei den Monozyten, mit 10,8-fach verstärkter Fluoreszenz im Vergleich zu nichtgefärbten Zellen ($p=0,001$). Bei den anderen untersuchten Zellpopulationen war die Anheftung deutlich schwächer ausgeprägt, jedoch immer noch statistisch signifikant ($p\leq 0,01$). Für PDC und T-Zellen ergab sich ein 1,72-faches Signal im entsprechenden Fluoreszenzkanal. Die Fluoreszenz bei den CD56^{bright} NK-Zellen war gegenüber Mock 1,5-fach erhöht, bei CD56^{dim} NK-Zellen war die Signalstärke 2,04-fach höher. Für die B-Zell Population ergab sich ein 1,60-faches Signal im Vergleich zu nicht-exponierten Zellen. Die Ergebnisse für die Ansätze, bei denen nur mt2234_31_s oder mt2234_31_as einzeln zugegeben wurde, waren ähnlich, es ergab sich ein 1,38- bis 7,55-fach stärkeres Fluoreszenzsignal für mt2234_31 in Orientierung, und zwischen 1,32- und 5,98-fach für die Ansätze, bei denen der Stimulus als Strang zugegeben wurde. Die Fluoreszenz lag somit deutlich unter der Fluoreszenz des Doppelstrang-ODN.

Zusätzlich wurde eine Titrationskurve für 0 μ M bis 20 μ M fluoreszenzmarkiertes mt2234_31 als Doppelstrang auf frisch isolierten PBMC nach 20 Stunden Inkubation erstellt. Innerhalb der PBMC wurden die PDC als CD14⁻, CD11c⁻, BDCA4⁺ Zellpopulation, und die Monozyten als CD14⁺ Zellpopulation außerhalb des Lymphozytengates identifiziert. Die Abbildung 19 und Abbildung 20 stellen die Ergebnisse der Untersuchungen dar, ausgewertet als Prozentsatz der Zellen, die mt2234_31 angelagert oder aufgenommen hatten (Abbildung 19a und 20a) bzw. die Mediane Fluoreszenzintensität dieser Zellen (Abbildung 19b und 20b).

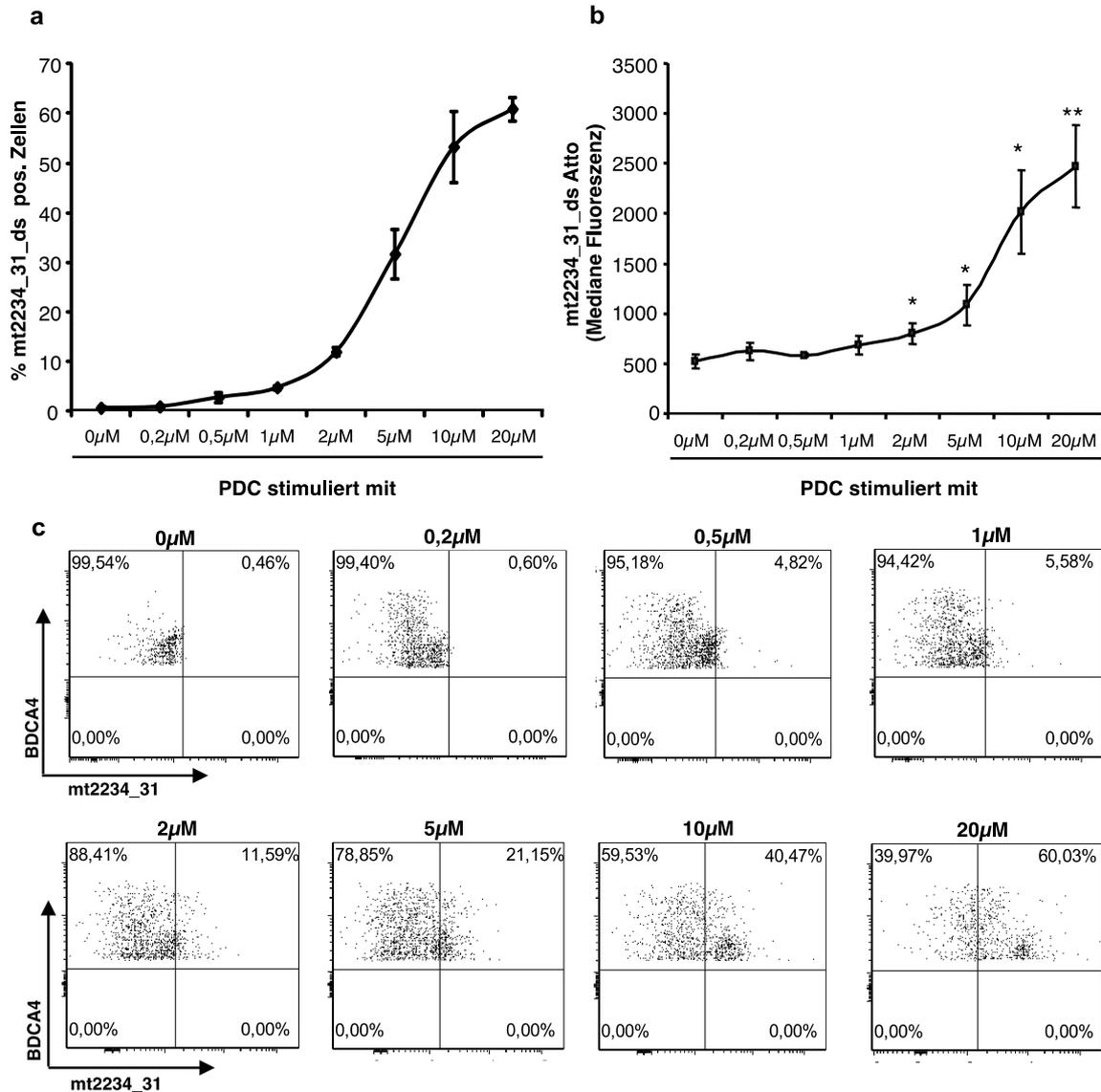


Abbildung 19 Titrationkurve von mt2234_31 auf PDC:

PBMC wurden mit aufsteigender Konzentration fluoreszenzmarkiertem mt2234_31_ds von 0 μM bis 20 μM für 20h inkubiert, anschließend wurde die Anheftung/Aufnahme an BDCA4⁺, CD11c/CD14⁻ Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum dreier unabhängiger Experimente. **a)** Titrationskurve des ODN auf PDC dargestellt als Prozentsatz der positiven Zellen, und als **(b)** mediane Fluoreszenzintensität. **c)** Repräsentative FACS-Plots eines von drei unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der PDC-spezifische Marker BDCA4 gegen die Atto488-Fluoreszenz durch das mtODN.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Atto488-Fluoreszenz, insgesamt wurden 61±2,3% der PDC nach 20h Inkubation mit 20 μM mtODN positiv für das mtODN (Abbildung 19a). Es zeigt sich, dass beinahe die gesamte Zellpopulation der PDC die DNA anlagert und nicht nur eine Subpopulation. Dabei ergab sich eine exponentielle Zunahme der Fluoreszenz zwischen 0 und 10 μM (R²=0,98).

Im gleichen Ansatz wurden auch die CD14⁺ Monozyten ausgewertet, identifiziert als CD14⁺ Zellen außerhalb des Lymphozytengates, das Ergebnis ist in Abbildung 20 dargestellt. Bei den Monozyten zeigte sich eine annähernd lineare Zunahme der Fluoreszenz mit steigender ODN-Konzentration zwischen 0,2µM und 5µM ($R^2=0,99$), bis die Kurve bei 10µM in die Sättigung ging. Insgesamt waren bei 20µM 98,5(±0,9)% der Monozyten positiv. Auch bei der Auswertung der medianen Fluoreszenz (MFI) zeigte sich eine ausgeprägte Dosis/Wirkungskurve bei beiden Zellpopulationen, mit einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz ab 2µM Oligodeoxynukleotid, der Unterschied zu nicht exponierten Zellen (0µM ODN) war bei PDC ab 2µM (Abbildung 19b), bei Monozyten ab 1µM DNA-Konzentration signifikant ($p\leq 0,05$) (Abbildung 20b). Wie auch zuvor gezeigt, ist die Fluoreszenz bei Monozyten stärker als bei isolierten plasmazytoiden dendritischen Zellen. Bei Verwendung von 20µM mtODN ergab sich bei den PDC eine Verstärkung der Fluoreszenz um Faktor 4,7 von 520±95 MFI auf 2480±410 MFI, bei den Monozyten ein Anstieg um Faktor 118, von 1100±70 MFI bei 0µM auf 135000±11000 MFI.

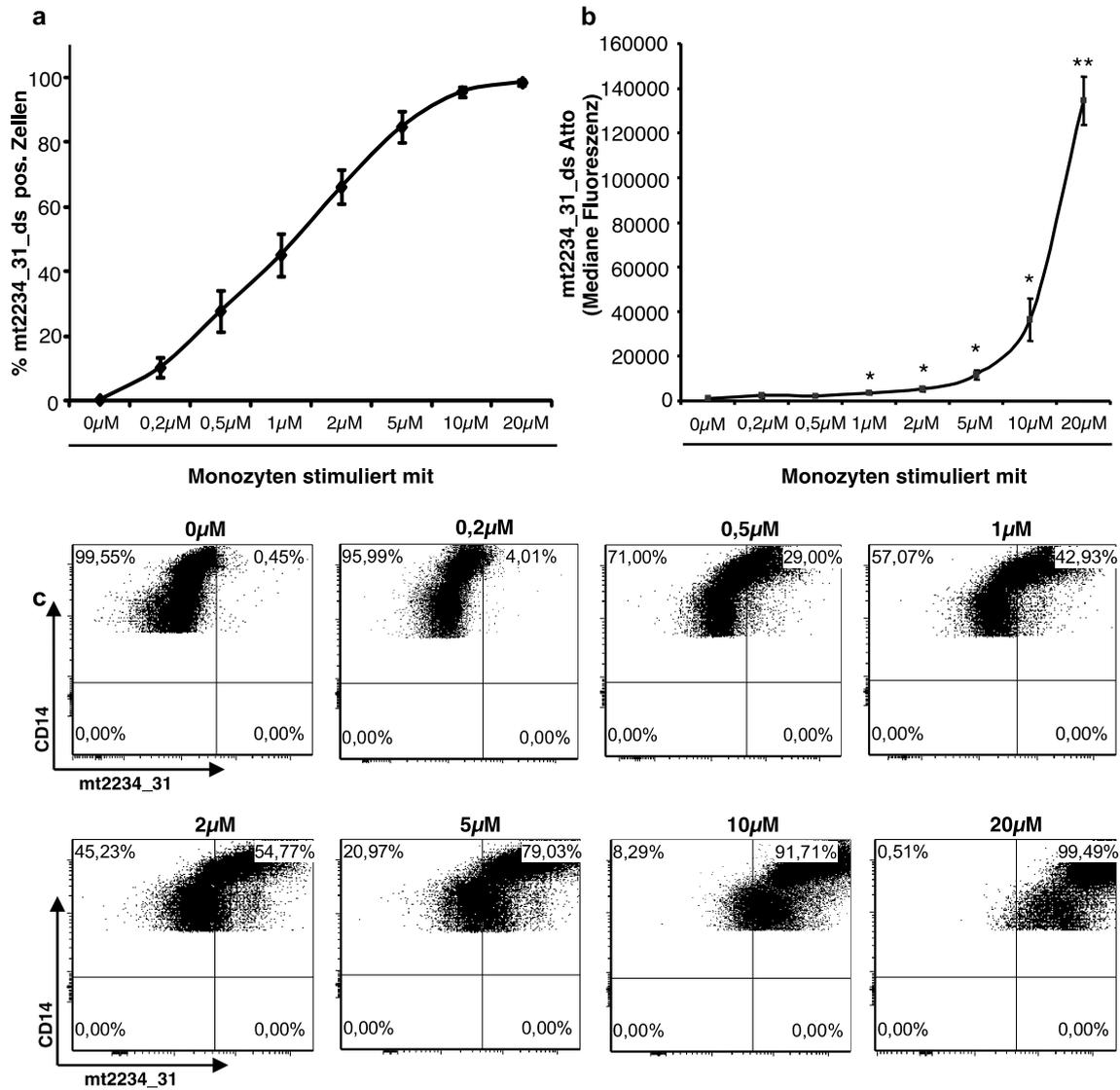


Abbildung 20 Titrationskurve mt2234_31 auf Monozyten:

PBMC wurden mit aufsteigender Konzentration fluoreszenzmarkiertem mt2234_31_ds von 0 μM bis 20 μM für 20h inkubiert, anschließend wurde die Anheftung/Aufnahme an CD14⁺ Monozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt als Mittelwert und Standardirrtum dreier unabhängiger Experimente. **a)** Titrationskurve des ODN auf Monozyten dargestellt als Prozentsatz der positiven Zellen, und als **(b)** mediane Fluoreszenzintensität. **c)** Repräsentative FACS-Plots eines der drei unabhängigen Versuche, aufgetragen ist der PDC-spezifische Marker BDCA4 gegen die Atto488-Fluoreszenz durch das mtODN.

6.4.3 Aufnahme von mtODN2234_31

Lebendzell Aufnahmen plasmazytoider dendritischer Zellen

Um die Aufnahme des fluoreszenzkonjugierten mt2234_31 in isolierte plasmazytoide dendritische Zellen direkt, in Farbe und am lebenden Objekt zu studieren, wurde eine Versuchsreihe im Zeitverlauf an einem Epifluoreszenz-Mikroskop, ausgestattet mit einer klimatisierten Zellkulturkammer, durchgeführt (Abbildung 21). Für diesen Versuch wurden isolierte PDC in 250µl RPMI-1640 in einer Petrischale mit Glasboden ausgesät und in eine am Mikroskop angebrachte Kulturkammer (37°C, 5% CO₂) verbracht. Zu Beginn der Aufnahmen wurde fluoreszenzmarkiertes mt2234_31 in einer Endkonzentration von 25nM zugegeben.

Zuerst wurden mt2234_31 und mt2234_31 anti gemischt und durch Erhitzen zu einem Doppelstrang hybridisiert, alternativ jeweils äquimolar die einzelnen Stränge zugegeben. Dabei waren beide Stränge mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der antisense-Strang war mit TexasRed, der sense-Strang mit dem grünen Farbstoff Alexa488 konjugiert, eine erfolgreiche Hybridisierung und Anheftung/Aufnahme beider Stränge wurde also durch eine Gelbfärbung der Zellen erkennbar. Anheftung oder Internalisierung nicht hybridisierter Einzelstrangmoleküle sollte die Zellen rot bzw. grün markieren.

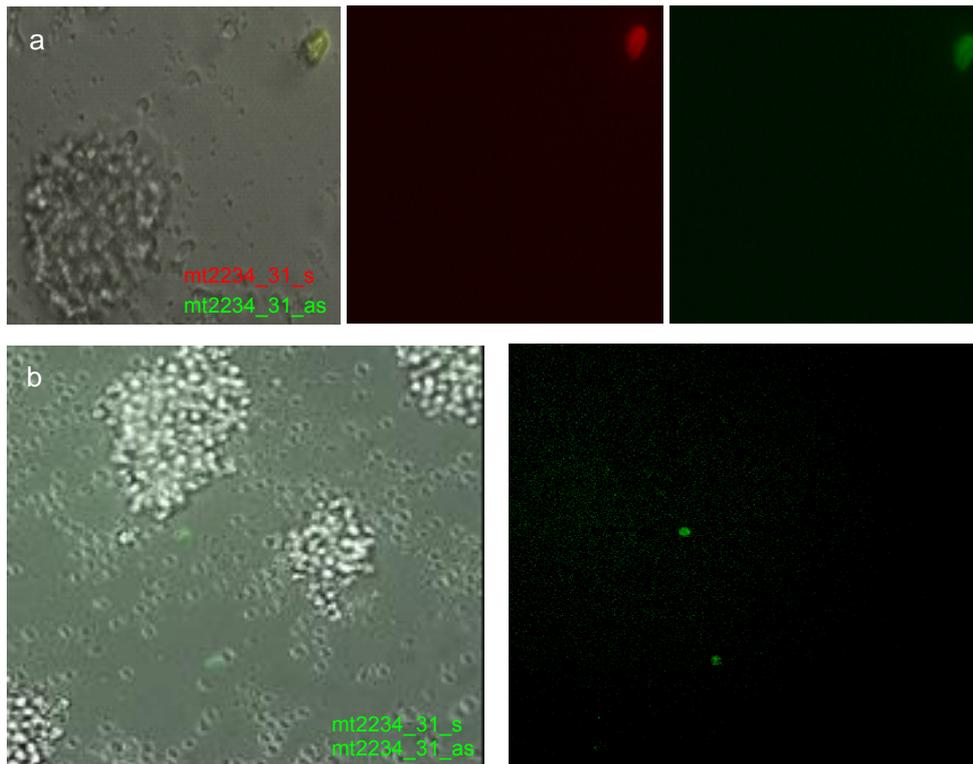


Abbildung 21 Lebendzell Aufnahme mt2234_31 in PDC:

a) Zeitverlauf der Aufnahme doppel fluoreszenzkonjugierter DNA. PDC gesunder Spender wurden in einer Kulturkammer unter CO₂ Versorgung bei 37°C mit 25nM doppelsträngigem mt22341_31, fluoreszenzmarkiert mit TexasRed (mt2234_31_s) und Atto488 (mt2234_31_as) für 1h inkubiert. **b)** 25nM Atto488-gekoppeltes Doppelstrang mtODN wurde zu isolierten PDC gesunder Donoren gegeben und in einer Kulturkammer mikroskopisch observiert, nach einer Stunde waren vereinzelt farbige Zellen erkennbar. Das Resultat wurde unabhängig reproduziert.

Nach einer Stunde Beobachtung unter dem Mikroskop zeigte sich eine Gelbfärbung vereinzelter Zellen, zu denen das hybridisierte Deoxynukleotid gegeben wurde; der Versuch wurde unabhängig reproduziert. In denjenigen Ansätzen, in denen das fluoreszenzmarkierte ODN als Einzelstrang pipettiert wurde, war auch nach 2 Stunden Beobachtung keinerlei Fluoreszenz erkennbar, was darauf schließen lässt, dass unter den verwendeten Bedingungen keine DNA aufgenommen wurde. Nachdem durch die vorherigen Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Analysen und den Interferon-Versuchen bestätigt wurde, dass mt2234_31 als Doppelstrang-DNA aufgenommen wird, wurde der Versuch mit Doppelstrang-DNA fortgeführt. Hierbei waren sowohl sense-, als auch antisense-Strang von mt2234_31 mit Atto488 markiert, um die Lichtstärke des ODN und damit den Kontrast zum umgebenden Medium zu erhöhen. Auch hier zeigte sich bei der Lebendzellmikroskopie, dass markierte DNA vereinzelt in lebende, sich in der Zellkultur bewegend PDC aufgenommen wird. Die Frequenz dieser Ereignisse lag in

der gleichen Größenordnung, die auch die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben. Abbildung 18a ist einer Filmaufnahme von 1h Aufnahmedauer entnommen, bei dem jede halbe Minute eine Aufnahme gemacht wurde.

Aufnahme von mtODN 2234 31 in PDC und Monozyten

Um zu überprüfen, ob nach 20 Stunden Inkubation nur der hybridisierte Doppelstrang oder auch die Einzelstrang-ODN in die Zellen aufgenommen werden, wurden isolierte plasmazytoide dendritische Zellen bzw. Monozyten gegenüber Atto488-konjugiertem mt2234_31 als Einzel- oder Doppelstrang für 20h exponiert, auf einen Objektträger fixiert und mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden von jedem Ansatz 8 - 13 Bilder gemacht und anschließend der Prozentsatz der Zellen, die die DNA aufgenommen hatten, ausgezählt. Um sicherzustellen, dass nur Zellen, die die DNA internalisiert hatten gezählt wurden, wurde die Zellmembran mit Alexa555-markiertem Weizenagglutinin gefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

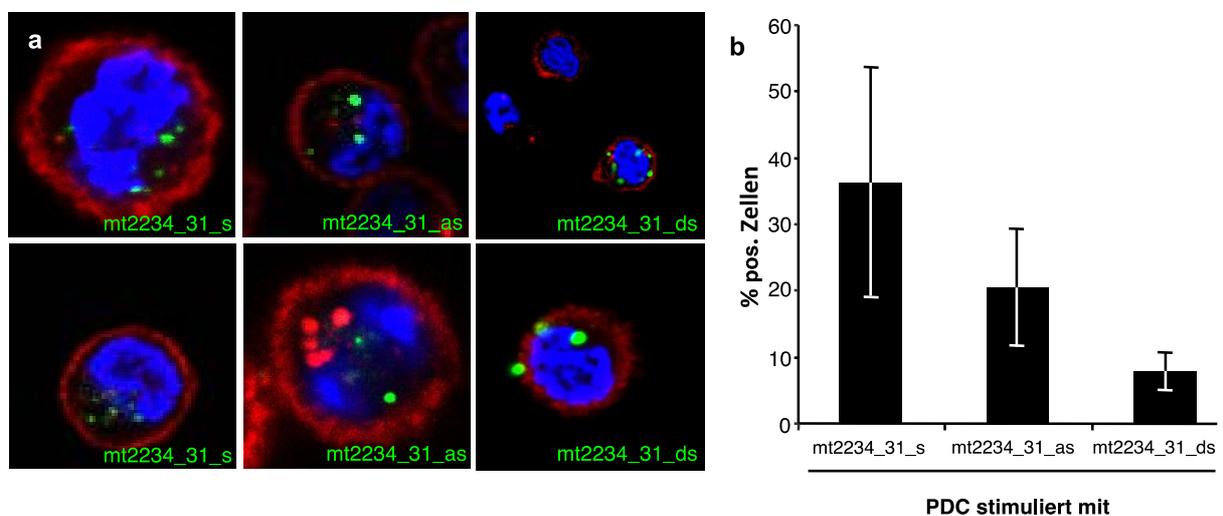


Abbildung 22 Aufnahme mt2234_31 in PDC:

a) PDC wurden für 20h mit fluoreszenzmarkiertem mt2234_31 in sense (_s) oder antisense (_as) Orientierung, bzw. als Doppelstrang (_ds) inkubiert und mikroskopiert, eine Gegenfärbung zeigt die Zellmembran (rot) und den Zellkern (blau). Von jedem Ansatz wurden 7-11 Bilder mit 200facher-Vergrößerung aufgenommen und aus diesen der Prozentsatz der Zellen, die mt2234_31 internalisiert hatten, ausgezählt (**b**). Das Experiment wurde dreimal unabhängig reproduziert. Dabei wurden insgesamt 5850 Zellen gezählt.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass das mtODN als Doppelstrang am schlechtesten in die plasmazytoiden dendritischen Zellen aufgenommen wird ($7,9 \pm 2,9\%$)

positive Zellen), während sense (36,3±17,4% positive Zellen) und antisense (20,4±9,0% positive Zellen) effektiver internalisiert wird. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Dabei war zu beobachten, dass die „grünen Punkte“ bei den Ansätzen mit Doppelstrang DNA tendenziell größer waren als bei den Ansätzen mit den Einzelsträngen. Vereinzelt wurde DNA, außen an der Plasmamembran angeheftet beobachtet, diese wurde bei der Auswertung jedoch nicht berücksichtigt.

Ebenso wurde die Aufnahme des mtODN in Monozyten in einem identischen Versuchsaufbau untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.

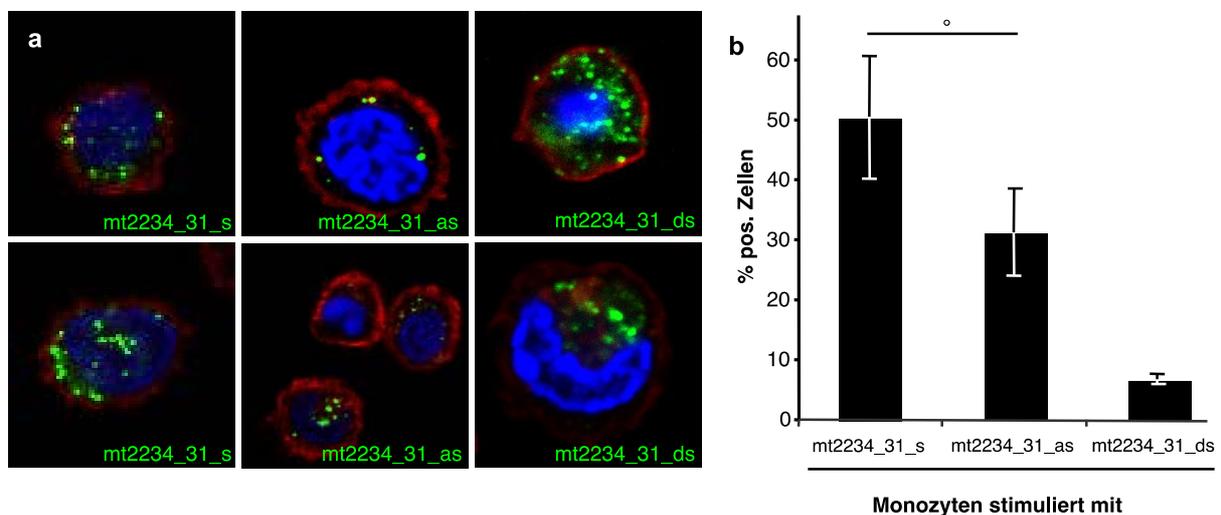


Abbildung 23 Aufnahme mt2234_31 in Monozyten:

a) Isolierte Monozyten wurden für 20h mit fluoreszenzmarkiertem mt2234_31 in sense (_s) oder antisense (_as) Orientierung, bzw. als Doppelstrang (_ds) inkubiert und anschließend konfokal mikroskopiert, eine Gegenfärbung zeigt die Zellmembran (rot) und den Zellkern (blau). Von jedem Ansatz wurden 9-12 Bilder mit 200-facher Vergrößerung aufgenommen und aus diesen der Prozentsatz der Zellen, die mt2234_31 internalisiert hatten, gezählt (**b**). Das Experiment wurde dreimal unabhängig reproduziert. Dabei wurden insgesamt 4474 Zellen gezählt, ° p<0,05 wie eingezeichnet.

Ähnlich wie bei den plasmazytoiden dendritischen Zellen wurde mt2234_31 in sense-Orientierung am effektivsten in die Monozyten aufgenommen (50,3±10,2 % positive Zellen), während antisense (31,3±7,3% positive Zellen) und der hybridisierte Doppelstrang (6,8±0,8% positive Zellen) weniger effektiv aufgenommen wurde. Diese Daten für die Monozyten stimmen mit denen der PDC überein.

Zelluläre Lokalisation des aufgenommenen mtODN2234_31 in PDC

Nachdem die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Sequenz in lebende PDC mittels Epifluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen wurde, war die intrazelluläre Lokalisation von Interesse. Der publizierte Signalweg zur Interferon-alpha Sekretion erfordert eine Aufnahme der DNA in endosomale Kompartimente und eine Rekrutierung des Detektors TLR9 dorthin. Folglich wurde die Aufnahme der mitochondrialen doppelsträngigen Sequenz mt2234_31 in endosomale Kompartimente und die Kolo-kalisation mit TLR9 mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie fixierter PDC untersucht.

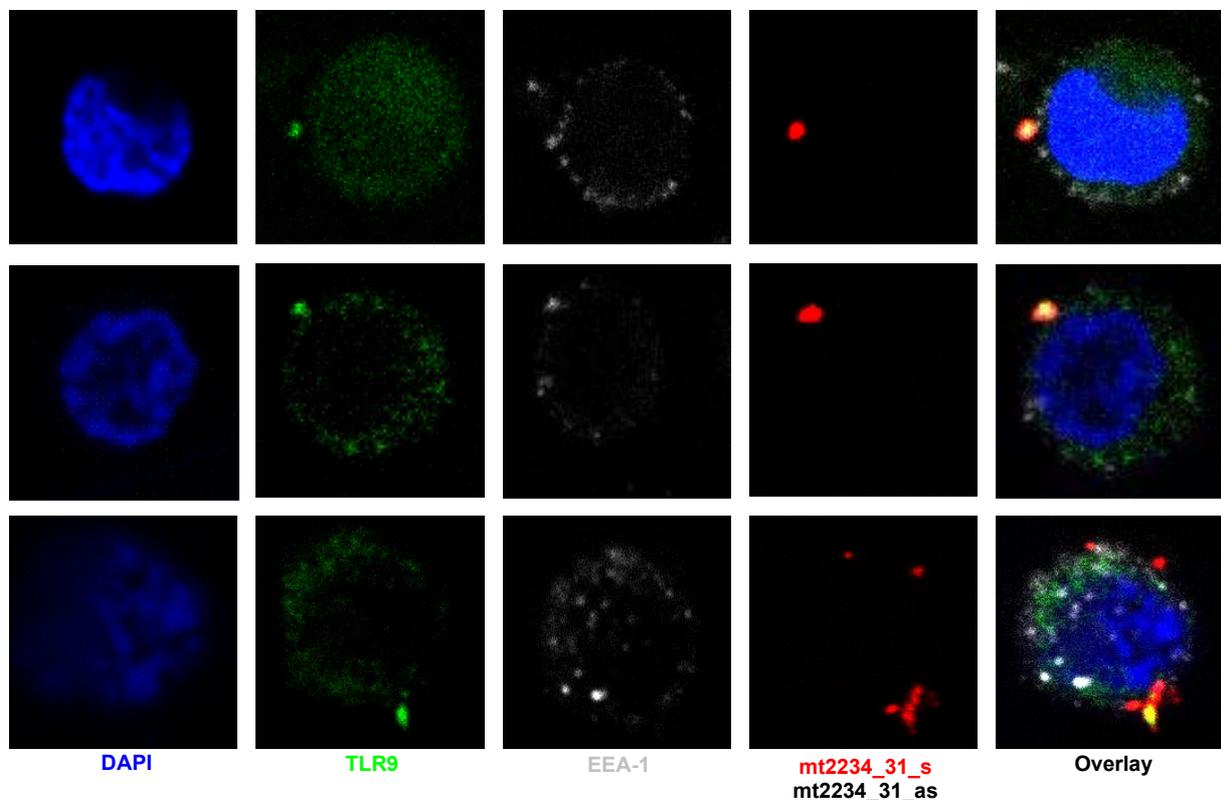


Abbildung 24 Konfokale Mikroskopie von PDC inkubiert mit fluoreszenzmarkiertem mt2234_31:

Isolierte PDC gesunder Spender wurden mit TexasRed-fluoreszenzmarkiertem mt2234_31 als Doppelstrang-DNA inkubiert und PFA-fixiert, zusätzlich wurde der frühe endosomale Marker EEA-1 und der Toll-ähnliche Rezeptor TLR9 gefärbt. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Nach etwa 30 Minuten Inkubation der isolierten PDC mit dem markierten mtODN fanden sich in einigen Zellen aufgenommene DNA-Partikel, die mit TLR9 und dem Marker für das frühe endosomale Kompartiment EEA-1 kolokalisierten. Die Färbung für TLR9 war ansonsten diffus im Zytoplasma der Zellen verteilt, fand sich aber auch punktuell angereichert zusammen mit EEA-1. Diese Daten bestätigen die Aufnahme der mitochondrialen immunstimulatorischen Sequenz mt2234_31 in PDC und deren endosomale Kompartimente, als auch die folgende Rekrutierung des Toll-ähnlichen Rezeptors TLR9 dorthin, wo die DNA mit TLR9 interagieren und den Interferon-Signalweg initiieren kann.

7 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, dass immunstimulatorische Motive verschiedener zellulärer DNA-Spezies in der Lage sind, hohe Interferon-alpha Spiegel in plasmazytoiden dendritischen Zellen zu induzieren. In einem ersten Schritt untersuchte diese Arbeit die generelle immunstimulatorische Kapazität verschiedener intakter zellulärer DNA Spezies. Durch DOTAP-Transfektion in mononukleäre Zellen des peripheren Bluts konnte eine Interferon-alpha Induktion durch mitochondriale und nukleäre DNA-Spezies nachgewiesen werden (Abbildung 4). Es wurde beschrieben, dass diese Aktivität durch unmethylierte CpG-Motive der DNA, einem beschriebenen pathogen assoziierten Muster (PAMP), vermittelt wird (Gray, 1999). Beide DNA-Spezies sind üblicherweise nicht immunstimulatorisch, weil ihre Aufnahme in endosomale Kompartimente und damit die Interaktion mit TLR9 verhindert wird (Barton et al., 2005). Eine Störung dieses Schutzmechanismus durch DNA-haltige Immunkomplexe oder sonstige Transporterproteine führt zu einer unspezifischen Immunaktivierung und zu Autoimmunkrankheiten.

7.1 Effekte verschiedener DNA Spezies

Die grundlegende Funktion mitochondrialer DNA als Gefahr- und Verletzungssignal ist ein relativ neues Konzept der Immunbiologie (Matzinger, 2002). Immunmodulatorische Kapazitäten mitochondrialer Sequenzen wurden zuerst im Jahr 2004 von Collins und Kollegen (Collins, 2004) gezeigt. Seither erschienen einige Studien, die Immunaktivierung und negative Effekte durch mitochondriale Bestandteile in Trauma-Patienten (Zhang et al., 2010) zeigten. Aber auch in viralen Infektionen wie dem Dengue Fieber konnte eine erhöhte Menge zirkulierender mitochondrialer DNA im Plasma gezeigt werden, die mit der Schwere der Erkrankung korrelierte (Ha et al., 2011). Für HIV-Patienten ist sowohl ein erhöhter Spiegel an mitochondrialer DNA im Plasma bei verringertem zellulären mitochondrialen DNA-Gehalt, als auch eine Korrelation der mtDNA-Kopien im Plasma mit der Viruslast gezeigt worden (Chiappini et al., 2004; Cossarizza et al., 2011).

Gemäß der Endosymbiontentheorie (Sagan, 1967) ist die extranukleäre DNA der Zellen, lokalisiert in den Mitochondrien, ein bakterielles unmethyliertes Genom (Schmookler Reis and Goldstein, 1983). Diese Annahmen konnten wir durch das Methylierungsmuster des Verdauens der DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen bestätigen (Abbildung 5). Das Vorhandensein unmethylierter CpG-Motive in der DNA trug jedoch nur zu einem geringen Teil zur Immunstimulation nach DOTAP-Transfektion von DNA-Spezies in PBMC bei (Abbildung 4). Auffällig war, dass sowohl die nukleären Fraktionen als auch die GesamtzellDNA sich nicht signifikant in ihrer Interferon-Induktion unterschieden, was möglicherweise auf das Vorhandensein unmethylierter CpG-Motive in den Promotorregionen (Deaton and Bird, 2011) und nicht vollständiger Auftrennung der Fraktionen zurückzuführen ist. Diese Daten stimmen mit mehreren vorangegangenen Studien überein, die eine Immunstimulation durch zelluläre DNA beschreiben, sofern diese in die Zellen aufgenommen und an TLR9 gebunden wird (Barrat, 2005; Barton et al., 2005; Yasuda et al., 2005; Lande et al., 2007). Auch die *in vitro* methylierten DNA-Spezies waren noch immunstimulatorisch, wenn auch in reduziertem Umfang, entweder aufgrund schwacher Wechselwirkungen methylierter DNA mit dem Rezeptor oder nicht vollständiger Methylierung.

7.2 CpG-reiche Abschnitte der mtDNA

Kurze Bruchstücke längerer DNA-Stränge mit stark erhöhter CpG-Dichte könnten durch Fragmentierung der DNA bei Nekrose, Apoptose oder Nekroptose der Zellen entstehen (Garg et al., 2010; Krysko et al., 2011). So könnte teilweise abgebaute mitochondriale oder nukleäre DNA zusammen mit anderen Komponenten der Zelle bei deren Lyse in die Umgebung freigesetzt und anschließend von anderen Immunzellen aufgenommen werden. Das Verkürzen der mitochondrialen DNA auf CpG-reiche Regionen, die CpG-Inseln, erhöhte die Menge des von PDC produzierten Interferon-alpha, von etwa 20% der CpG-A Kontrolle auf 40 - 60% (Abbildung 7). Interessant war, dass die „nicht CpG-Insel“ mt15761_727 immer noch eine deutlich messbare Interferon-Antwort hervorrief, die in der Größenordnung der zellulären DNA-Spezies lag. Dies könnte auf die vermehrten CpG-Motive in dieser Sequenz zurückzuführen sein, auch wenn die Definition einer CpG-Insel nicht erfüllt wurde. Die CpG-Inseln haben mit ihren etwa 200

Basenpaaren und dessen Vielfaches in etwa die Größe der DNA-Fragmente, die bei Apoptose durch den Abbau der DNA entstehen (Garg et al., 2010; Wyllie, 2010). Bemerkenswert war das Ausmaß der Reduktion der Interferon-Freisetzung durch methylierte CpG-Inseln im Vergleich zu den nicht methylierten Sequenzen (Abbildung 8), welche deutlich ausgeprägter war als die Reduktion bei den DNA-Spezies. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Rolle der unmethylierten CpG-Motive mit der Abnahme der Sequenzlänge immer wichtiger wird. Wie bei den getesteten DNA-Spezies, war hier ohne das Transfektionsreagenz DOTAP keine Interferon-Induktion aus peripheren Blutzellen feststellbar. Eine Vermischung der DNA-Lösung mit dem Cathelicidin LL-37 und der Inkubation von isolierten PDC führte jedoch zu einer robusten Interferon-alpha Antwort (Abbildung 9a). Dieser Effekt war auf PBMC nicht reproduzierbar, möglicherweise weil der Immunkomplex von anderen Zellpopulationen weggefangen wird.

7.3 Charakterisierung der mitochondrialen Oligodeoxynukleotide

Eine weitere Verkürzung der CpG-Inseln auf die Länge kommerzieller immunmodulatorischer CpG-ODN (Tabelle 11) lieferte eine Reihe immunstimulatorischer CpG-haltiger Oligodeoxynukleotide mitochondrialen Ursprunges (mtODN), von denen einige in der Lage waren, nach Transfektion mit DOTAP in periphere Blutzellen hohe Interferon-alpha Spiegel in Zellkultur zu induzieren (Abbildung 11 bis Abbildung 13). Die mtODN mt6030_17, mt6160_21 und mt2234_31 induzierten nach DOTAP-Transfektion mehr Interferon-alpha aus PBMC als das optimierte CpG-A ODN 6016. Die immunstimulatorische Kapazität der mtODN korreliert dabei mit dem Vorhandensein eines palindromen Abschnittes um das CpG-Motiv, eines Charakteristikums, das sich auch bei artifiziellen Klasse B- und C-CpG-ODN findet. Die Verwendung eines Phosphorothioat-Rückgrates bei CpG-A 6016 ist beschrieben, die Bindung an TLR9 und damit die Immunstimulation um den Faktor 10-100 zu erhöhen (Krieg et al., 1995; Haas et al., 2008). Experimentell zeigen ließ sich nur eine Reduktion um etwa 70%, jedoch war dieser Unterschied signifikant ($p=0,04$, Daten nicht gezeigt). Außerdem scheint die Modifikation essentiell für die Aufnahme der CpG-ODN in die Zellen zu sein, da auch das kommerzielle CpG-A 2216 als Phosphodiester keine

Interferon-alpha Induktion ohne DOTAP-Transfektionsreagenz zeigt (Abbildung 11). Der Grund ist möglicherweise in der erhöhten Resistenz des Phosphorothioat-Rückgrats gegenüber Nukleasen zu finden, das einen Abbau der DNA verhindert, bevor diese in die Zellen aufgenommen werden kann.

Die Hybridisierung der mtODN mit ihrem revers komplementären Doppelstrang (Abbildung 12 und Abbildung 13) zeigte bei drei ODN eine massive Reduktion der Interferon-Antwort (mt6160_21, CpG-A 2216 und mt6030). Möglicherweise inhibiert die Zugabe der revers komplementären Sequenz die Ausbildung höher geordneter Strukturen, die für eine effektive Aufnahme und Aktivierung des TLR9 Signalweges nötig sind (Kerkmann, 2004; Heeg et al., 2008). Im Gegensatz dazu ließ sich die Interferon-Produktion nach DOTAP-Transfektion bei zwei Doppelstrang mtODN (mt2234_31 und mt16073_28) verstärken. Diese beiden mtODN induzierten auch ohne Transfektionsreagenz oder Peptidkoppelung als Doppelstrang ODN eine messbare Interferon-Antwort.

Weitere Untersuchungen zur 2D-Struktur der mtODN wurden mithilfe des Algorithmus *mfold* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>) unter den voreingestellten Bedingungen durchgeführt und zeigten, dass sich bei einer Rückfaltung der Einzelstrang mtODN bei einigen Sequenzen, z.B. mt9329_18, mt6745_26 und mt7472_24 das CpG-Motiv an der Spitze einer Ringstruktur findet (vgl. Ries, 2008). Die Ausbildung dieses Ringes scheint mit der immunstimulatorischen Kapazität zu korrelieren. Die Hybridisierung der ODN zu einem DNA Doppelstrang könnte die Ausbildung dieser Strukturen und somit die Interferon-Induktion inhibieren. Allerdings sind die Ergebnisse der *mfold* Analyse sehr von den verwendeten Parametern für Ionenkonzentration und Temperatur abhängig, so dass fraglich erscheint, ob dies für *in vivo* Systeme tatsächlich Relevanz hat.

7.4 Migration und Maturation PDC durch mtODN

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung dreier mtODN, mt6160_21, mt6030_17 und mt3670_23 im Vergleich zu kommerziellen CpG-ODN (Abbildung 15), transfiziert in PBMC war besonders mt6160_21 in der Lage, den Maturationsmarker CD83 auf plasmazytoiden dendritischen Zellen signifikant hochzuregulieren. Das Oligonukleotid mt6160_21 war außerdem in der Lage, den Migrationsmarker CCR7 zu regulieren, was darauf schließen lässt, dass PDC aktiviert werden, zu antigen-präsentierenden Zellen zu reifen und in den Lymphknoten abzuwandern, um dort Zellen des adaptiven Immunsystems zu regulieren. CCR7 wurde nach DOTAP-Transfektion auch von mt6030_17 signifikant heraufreguliert. Dies spricht für eine immunmodulatorische Kapazität dieser mtODN.

Eines der beiden mtODN, das ohne DOTAP-Transfektion in der Lage war, PDC zur Interferon-alpha Produktion anzuregen, mt2234_31, zeigte sich als Doppelstrang ebenfalls in der Lage, den Maturationsmarker CD83 im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollzellen signifikant zu regulieren. Außerdem konnte es CD56^{dim} NK-Zellen und B-Zellen in der Zellkultur aktivieren (Abbildung 17). Es ist beschrieben (Hardy et al., 2007), dass PDC nach Aktivierung mit HIV-RNA und Aktivierung über endosomale TLR-Aktivierung TRAIL exprimieren und somit einen zytotoxischen Effekt vermitteln können, jedoch konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen nach 20h Stimulation mit ODN keine TRAIL-Expression gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

7.5 Anheftung von mtODN an Zellen im peripheren Blut

Ebenfalls direkt durchflusszytometrisch bestimmen ließ sich die Anheftung des fluoreszenzmarkierten ODN mt2234_31 an die untersuchten Zellpopulationen. Besonders ausgeprägt war die Anheftung und Aufnahme in CD14⁺ Monozyten, die mittels FACS und konfokaler Immunfluoreszenz bestätigt wurde. Dagegen waren deutlich weniger PDC positiv für mt2234_31. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass es sich bei den DNA-aufnehmenden Zellen um eine Subpopulation handelt. In der Literatur ist

eine über die Expression von CD2 definierte Subpopulation der PDC beschrieben (Matsui et al., 2009), wobei CD2^{high} PDC naive T-Zellen aktivieren können und eine verstärkte Zytotoxizität aufweisen verglichen mit CD2^{dim} PDC. Mittels Durchflusszytometrie ließ keine Änderung der Expression von CD2 auf PDC nach Stimulation nachweisen (Daten nicht gezeigt). Es sollte jedoch mittels konfokaler Mikroskopie überprüft werden, ob sich das mtODN bevorzugt in CD2^{high} PDC anreichert.

Bei den Untersuchungen zur Aktivierung von NK- und B-Zellen mit mt2234_31 und kommerziellen CpG-ODN (Abbildung 17), gemessen als Expression des Aktivierungsmarkers CD69, zeigte sich eine signifikante Aktivierung der zytotoxischen CD56^{dim} NK-Zellen, nicht jedoch der Zytokin-sezernierenden CD56^{bright} NK-Zellen. Das mitochondrielle mt2234_31 führte als Doppelstrang-DNA ebenfalls zu einer signifikanten Hochregulation des Oberflächenmarkers auf dieser Zellpopulation, nicht jedoch auf den CD56^{bright} NK-Zellen, obwohl beide Zellpopulationen die DNA in ähnlichem Umfang aufnehmen (Abbildung 18). Da die NK-Zellen für diese Versuche nicht als isolierte Population, sondern innerhalb der PBMC kultiviert wurden, ist auch ein sekundärer Effekt durch die vorhergehende Aktivierung und Zytokinausschüttung anderer Zellpopulationen in den PBMC denkbar. Allerdings ist auch beschrieben, dass NK-Zellen direkt auf unmethylierte CpG-ODN reagieren können und Tumor-Zellen abtöten können (Sivori et al., 2004), was weiter für die wichtige Rolle zellulärer, unmethylierter DNA als DAMP spricht. Ein ähnliches Bild wie für die CD56^{dim} NK-Zellen zeigte sich für B-Zellen, die ebenfalls durch CpG-ODN aktivierbar waren (Abbildung 17), mt2234_31 als Doppelstrang (Abbildung 18) – wenn jedoch nur in geringem Umfang – anhefteten und den Aktivierungsmarker CD69 signifikant hochregulierten. Für B-Zellen ist beschrieben, dass sie durch unmethylierte DNA-Motive aktiviert werden, proliferieren und Antikörper sekretieren (Krieg et al., 1995). Bislang ist unklar, warum ODN in Monozyten aufgenommen werden. Es ist in der Literatur bislang kein Mechanismus beschrieben, über den Monozyten DNA-Spezies detektieren könnten, um darauf eine Immunantwort zu vermitteln; auch ließ sich in isolierten Monozyten nach Zugabe von CpG-ODN kein Interferon im Zellkulturüberstand detektieren (Daten nicht gezeigt, N=3).

7.6 Aufnahme von mtODN2234_31 in Zellen

Die Epifluoreszenzaufnahmen (Abbildung 21) bestätigen, dass mt2234_31 bereits in geringer Konzentration von 25nM und nach kurzen Zeiträumen von unter 60 Minuten in PDC aufgenommen wird. Dies galt unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch ausschließlich für DNA als Doppelstrang, für die beiden Einzelstrang DNA und nicht-hybridisierte DNA-Moleküle in den Doppelstrang-Ansätzen konnte keine Aufnahme gezeigt werden. Auch wurde mittels konfokaler Mikroskopie (Abbildung 24) nicht nur eine Anheftung der DNA an die Zellen, sondern direkt eine Aufnahme in endosomale Kompartimente und Kolo-kalisation mit TLR9 gezeigt. Der Mechanismus der Aufnahme in plasmazytoide dendritische Zellen erfolgt vermutlich ähnlich wie bei der Detektion von HI-Viren über Endozytose (Pritschet et al., 2012). Eine ähnliche Aufnahme von Klasse A CpG-ODN in PDC ist von Latz et al. (Latz et al., 2004) beschrieben; die CpG-A ODN werden ebenfalls aus dem Medium in Endosomen aufgenommen, wo sie mit TLR9 interagieren, was zu einer Interferon-Freisetzung führt.

Untersuchungen mit konfokaler Mikroskopie von fluoreszenzmarkierten mt2234_31 bei isolierten PDC (Abbildung 22) und isolierten Monozyten (Abbildung 23) zeigte bei beiden Zellpopulationen eine Aufnahme der DNA in intrazelluläre, möglicherweise endosomale Kompartimente. Da lediglich der Doppelstrang des mtODN 2234_31 PDC zu einer Interferon-alpha Produktion veranlasst, wäre es denkbar, dass das ODN als Einzelstrang (in sense- oder antisense-Orientierung), in späte Endosomen aufgenommen wird, was eher zu einer Maturation der PDC führt, wohingegen das ODN als Doppelstrang in frühe Endosomen aufgenommen wird, und dort mit TLR9 interagiert, was zu einer Freisetzung von Interferon-alpha und einer späteren Maturation der Zellen führt (Haas et al., 2009). Aufgrund der Menge der mt2234_31-positiven PDC und Monozyten ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei den positiven Zellen um eine Kontamination der PDC mit Monozyten handelt, da mit einer Häufigkeit der Kontamination von 2-5% zu rechnen ist, und mindestens 8% der PDC die Doppelstrang-DNA aufgenommen haben. Da nur 6% der Monozyten die DNA aufgenommen haben, kann davon ausgegangen werden, dass die DNA wirklich von PDC internalisiert wird. Um diese Annahme zu bestätigen, sollten weitere konfokale

Untersuchungen mittels Färbung auf die entsprechenden Zellmarker CD14 und CD123 durchgeführt werden.

Weiter unklar ist die Art der DNA-Aufnahme, denkbar wäre eine rezeptorvermittelte Aufnahme, jedoch ist unklar welcher Rezeptor daran beteiligt sein könnte. Kürzlich wurde DEC-205 (CD205) als Rezeptor beschrieben, der die Aufnahme von Klasse B-CpG-ODN in B- und dendritische Zellen vermittelt (Lahoud et al., 2012). Eine andere ebenfalls kürzlich erschienene Publikation zeigt, dass DEC-205 an der Aufnahme von Klasse C-CpG-ODN in humane PDC beteiligt ist (Tel et al., 2011). Ob auch mt2234_31 über diesen Rezeptor aufgenommen werden kann, muß weiter untersucht werden.

7.7 Aufnahme der DNA als Protein/DNA Komplex

Auf der Suche nach zellulären Vermittlern der Aufnahme in endosomale Kompartimente wurde das nukleäre DNA bindende Protein HMGB1 untersucht. HMGB1 wurde beschrieben, CpG-ODN und DNA-haltige Immunkomplexe in Patienten mit systemischem *Lupus erythematoses* zu binden (Ivanov et al., 2007; Tian et al., 2007). Die nicht nachweisbare Induktion von Interferon-alpha durch LL-37 und HMGB1 (Abbildung 14) auf isolierten peripheren mononukleären Zellen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Immunkomplexe von anderen Zelltypen (z.B. Monozyten und Makrophagen) effektiver aufgenommen werden als von den relativ seltenen PDC. In Kultur mit isolierten PDC ist LL-37 in Lage, freie DNA-Sequenzen zu binden und in die Zellen zu transportieren, wo sie eine starke Interferon-Antwort auslösen können (Abbildung 9). Die einzelsträngigen, relativ kurzen mitochondrialen ODN scheinen dagegen nicht an die Peptide zu binden, da sich keine Interferon-Induktion zeigen ließ. Mögliche Erklärungen wären, dass die Sequenzen zu kurz sind, um eine ausreichend starke Bindung zu erzeugen, oder die Bindung ist durch die Tertiärstruktur sterisch inhibiert.

Im Gegensatz dazu waren die CpG-Inseln komplexiert mit dem Cathelicidin LL-37 in der Lage, hohe Spiegel an Interferon-alpha zu induzieren (Abbildung 9). LL-37 ist als Peptid mit mannigfaltigen antimikrobiellen, immunmodulatorischen und chemotaktischen

Eigenschaften beschrieben (Agerberth et al., 2000; Golec, 2007; Bucki et al., 2010). Es konnte eine wichtige Rolle für die Aufnahme körpereigener DNA in endosomale Kompartimente von PDC in Läsionen bei Psoriasis-Erkrankung gezeigt werden (Lande et al., 2007). Da LL-37 von vielen Zellen des Immunsystems exprimiert wird, liegt eine wichtige Rolle bei der *in vivo* Immunstimulation durch CpG-haltige mitochondriale DNA Fragmente nahe.

LL-37 und mitochondriale DNA im Komplex finden sich in sogenannten NETs (extrazelluläre Netze aus neutrophilen Granulozyten, engl. *Neutrophil extracellular nets*). Dabei katapultieren aktivierte neutrophile Granulozyten ihre zelluläre DNA zusammen mit antibakteriellen und DNA-bindenden Peptiden, wie HMGB1 und LL-37 auf Pathogene, um diese so zu immobilisieren und abzutöten (Amulic and Hayes, 2011; Keshari et al., 2011). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass NETs und die dadurch verursachte Interferon-Sekretion aus PDC eine Ursache für SLE darstellen (Garcia-Romo et al., 2011; Lande et al., 2011). In HIV-Patienten ist beschrieben, dass bakterielle Bestandteile aus dem Darm in das Blut gelangen können, was durch einen erhöhten LPS-Spiegel im Blut nachweisbar ist (Cossarizza et al., 2011). Dieses LPS wiederum könnte neutrophile Granulozyten veranlassen, ihre mitochondriale und nukleäre DNA mit LL-37 und anderen DAMP ins Blut freizusetzen, was zu einer Aktivierung der PDC und einer dauerhaften Interferon-alpha Freisetzung führen könnte.

Die dauerhafte Immunstimulation und ständige Interferonfreisetzung durch PDC, stimuliert durch Virus und infizierte Zellen, wird zur Zeit als eine der treibenden Kräfte einer HIV-Infektion hin zur Immunschwächekrankheit AIDS betrachtet (Schmidt et al., 2005; Boasso and Shearer, 2008; Girard et al., 2011; Lepelley et al., 2011). Die ständige Aktivierung der PDC führt einerseits zu einer funktionellen und numerischen Einschränkung normaler PDC-Funktionen, was das Auftreten opportunistischer Infektionen fördert (Feldman et al., 2001; Fitzgerald-Bocarsly and Jacobs, 2010). Andererseits führt der dauerhaft erhöhte Interferon-Spiegel zu einem verstärkten Untergang der CD4+ T-Zellen und damit der Immunseneszenz (Appay et al., 2007; Herbeuval and Shearer, 2007; Tripathi and Agrawal, 2007; Boasso and Shearer, 2008; Boasso et al., 2011; Deeks et al., 2012). Als ein weiterer Grund der andauernden Immunaktivierung in HIV-Infektionen ist die erhöhte Translokation mikrobieller PAMP

nach der Infektion von Th₁₇-T-Zellen und deren Absterben in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes in das Blut zu betrachten (Douek, 2007; 2007). Dort führt sie zu einer Aktivierung neutrophiler Granulozyten, deren Aktivierung eine Freisetzung von NETs, bestehend aus DNA und antimikrobieller Peptide wie LL-37 veranlasst. Diese Immunkomplexe im Blut führen wiederum zu einer Interferon-Freisetzung aus plasmazytoiden dendritischen Zellen.

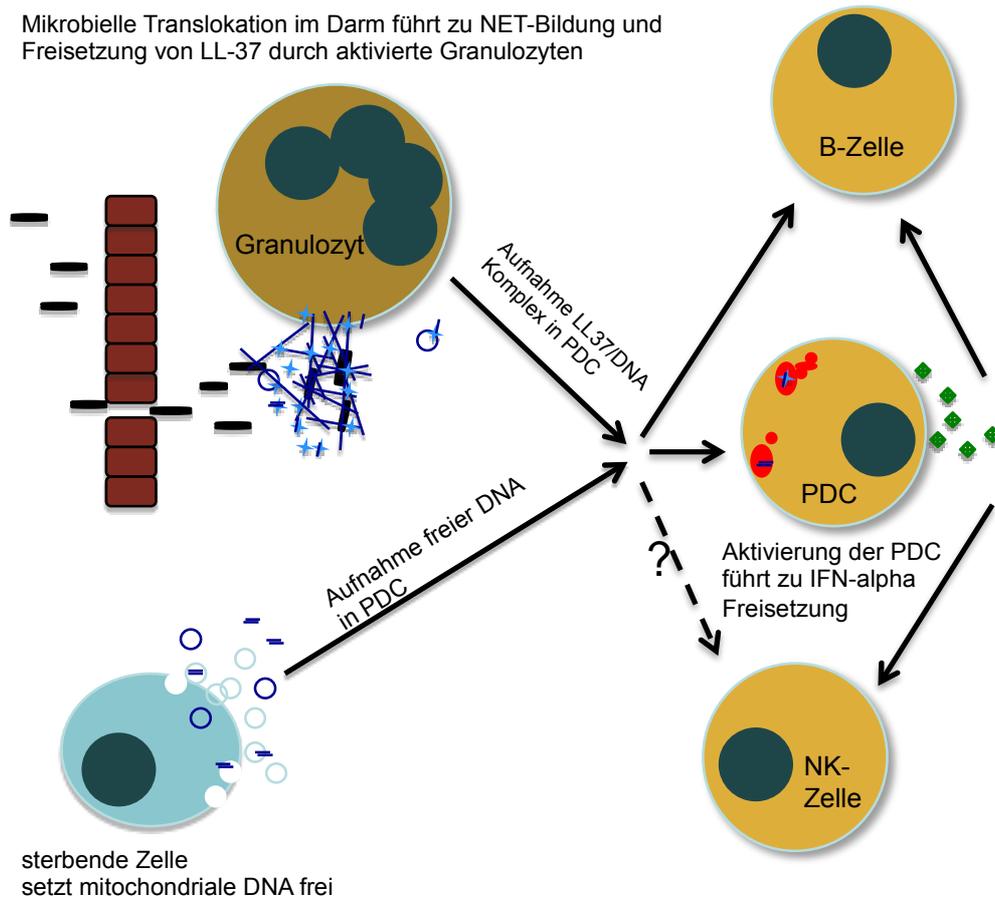


Abbildung 25 Model der Interferon-Induktion durch mitochondriale DNA:

Der direkte Zelltod infizierter Zellen setzt mitochondriale DNA in die Umgebung frei, die direkt von PDC aufgenommen und über TLR9 detektiert wird. In einer HIV-Infektion erfolgt ein Übertritt mikrobieller Produkte aus dem Darm ins Blut, was zu einer Aktivierung Neutrophiler Granulozyten und der Freisetzung von DNA/Proteinkomplexen führt. Beide Möglichkeiten führen zu einer Freisetzung von Interferon-alpha aus PDC, was wiederum indirekt eine Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems führen kann. B-Zellen lassen sich auch direkt über CpG_Motive stimulieren, NK-Zellen werden indirekt über sekretierte Zytokine aktiviert.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenzufassen, wurde ein Übersichtsmodell erstellt (Abbildung 25). Danach wird mitochondriale DNA entweder durch den HIV-bedingten Zelltod durch Apoptose, Nekrose oder Nekroptose freigesetzt, oder in HIV-

Infektionen durch neutrophile extrazelluläre Netze, gekoppelt mit antimikrobiellen Peptiden nach LPS Stimulation freigesetzt. Die mtDNA wird daraufhin von PDC aufgenommen und führt zu einer Interferon-alpha Freisetzung, was wiederum eine dauerhafte Immunstimulation vermittelt, die zu Autoimmunkrankheiten - oder bei HIV-Infektion - zu AIDS führen kann. Mitochondriale DNA-Sequenzen mit immunstimulatorischer Kapazität lassen sich sowohl bei HIV-Infektionen als auch bei anderen viralen Infektionen oder schweren Verletzungen finden (Zhang et al., 2010; Cossarizza et al., 2011; Ha et al., 2011). Bei HIV-Infektionen führt eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand für mikrobielle PAMP zu einer Aktivierung neutrophiler Granulozyten, die DNA/LL-37 Komplexe ausschütten, die PDC zur Produktion von IFN-alpha anregen. Eine andere mögliche Quelle für mitochondriale DAMP sind sterbende Zellen, deren fragmentierte DNA von PDC aufgenommen werden kann, was ebenfalls zu einer robusten Interferon-Antwort führt.

8 Literaturverzeichnis

Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H., and Gudmundsson, G.H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96, 3086–3093.

Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *J.Biol.Chem.* 278, 38105–38108.

Amulic, B., and Hayes, G. (2011). Neutrophil extracellular traps. *Curbio* 21, R297–R298.

Appay, V., ALMEIDA, J., Sauce, D., AUTRAN, B., and PAPAGNO, L. (2007). Accelerated immune senescence and HIV-1 infection. *Experimental Gerontology* 42, 432–437.

Asjö, B., Morfeldt-Månson, L., Albert, J., Biberfeld, G., Karlsson, A., Lidman, K., and Fenyö, E.M. (1986). Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* 2, 660–662.

Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L., and Krieg, A.M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157, 1840–1845.

Barchet, W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity. *Seminars in Immunology* 17, 253–261.

Barrat, F.J. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine* 202, 1131–1139.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.

Barton, G.M., Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2005). Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 7, 49–56.

Beignon, A.S. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. *Journal of Clinical Investigation* 115, 3265–3275.

Berghöfer, B., Frommer, T., Haley, G., Fink, L., Bein, G., and Hackstein, H. (2006). TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J Immunol* 177, 2088–2096.

Bianchi, M.E., and Manfredi, A.A. (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 220, 35–46.

- Boasso, A., and Shearer, G.M. (2008). Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clinical Immunology* 126, 235–242.
- Boasso, A., Royle, C.M., Doumazos, S., Aquino, V.N., Biasin, M., Piacentini, L., Tavano, B., Fuchs, D., Mazzotta, F., Caputo, Lo, S., et al. (2011). Overactivation of plasmacytoid dendritic cells inhibits antiviral T-cell responses: a model for HIV immunopathogenesis. *Blood* 118, 5152–5162.
- Bowdish, D.M.E. (2004). Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 451–459.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The Journal of Cell Biology* 177, 265–275.
- Bucki, R., Leszczyńska, K., Namiot, A., and Sokołowski, W. (2010). Cathelicidin LL-37: A Multitask Antimicrobial Peptide. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 58, 15–25.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919–923.
- Chiappini, F., Teicher, E., Saffroy, R., Pham, P., Falissard, B., Barrier, A., Chevalier, S., Debuire, B., Vittecoq, D., and Lemoine, A. (2004). Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients. *Lab Invest* 84, 908–914.
- Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Sallé, M., Montagnier, L., and Alizon, M. (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324, 691–695.
- Collins, L.V. (2004). Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 995–1000.
- Collman, R., Hassan, N.F., Walker, R., Godfrey, B., Cutilli, J., Hastings, J.C., Friedman, H., Douglas, S.D., and Nathanson, N. (1989). Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. *J.Exp.Med.* 170, 1149–1163.
- Cossarizza, A., Pinti, M., Nasi, M., Gibellini, L., Manzini, S., Roat, E., De Biasi, S., Bertoncelli, L., Montagna, J.P., Bisi, L., et al. (2011). Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: A new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. *Mitoch* 11, 750–755.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development* 25, 1010–1022.
- Deeks, S.G., Verdin, E., and McCune, J.M. (2012). Immunosenescence and HIV. *Current Opinion in Immunology* 1–6.

- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., DiMarzio, P., Marmon, S., Sutton, R., Hill, C., et al. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661–666.
- Dimitrov, D.S., Broder, C.C., Berger, E.A., and Blumenthal, R. (1993). Calcium ions are required for cell fusion mediated by the CD4-human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interaction. *Journal of Virology* 67, 1647–1652.
- Donhauser, N., Helm, M., Pritschet, K., Schuster, P., Ries, M., Korn, K., Vollmer, J., and Schmidt, B. (2010). Differential effects of P-class versus other CpG oligodeoxynucleotide classes on the impaired innate immunity of plasmacytoid dendritic cells in HIV type 1 infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 26, 161–171.
- Douek, D. (2007). HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med* 15, 114–117.
- Dörfler, W. (1981). DNA methylation--a regulatory signal in eukaryotic gene expression. *J Gen Virol* 57.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037–6046.
- Effros, R.B., Dagarag, M., and Valenzuela, H.F. (2003). In vitro senescence of immune cells. *Experimental Gerontology* 38, 1243–1249.
- Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., Denny, T., Garcia, Z., Kloster, P., Sun, Y., Megjugorac, N., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2001). Decreased Interferon- α Production in HIV-Infected Patients Correlates with Numerical and Functional Deficiencies in Circulating Type 2 Dendritic Cell Precursors. *Clinical Immunology* 101, 201–210.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877.
- Finke, D., Eloranta, M.-L., and Rönnblom, L. (2009). Endogenous type I interferon inducers in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 42, 349–352.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., and Feng, D. (2007). The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie* 89, 843–855.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., and Jacobs, E.S. (2010). Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *Journal of Leukocyte Biology* 87, 609–620.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., Dai, J., and Singh, S. (2008). Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 3–19.
- Foster, G.R., and Finter, N.B. (1998). Are all type I human interferons equivalent? *J. Viral Hepat.* 5, 143–152.
- Freed, E.O. (2001). HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26, 13–33.

- Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., et al. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865–867.
- Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., et al. (2011). Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Science Translational Medicine* 3, 73ra20–73ra20.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Garg, A.D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., and Agostinis, P. (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *BBA - Reviews on Cancer* 1805, 53–71.
- Girard, M.P., Osmanov, S., Assossou, O.M., and Kieny, M.-P. (2011). Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine* 29, 6191–6218.
- Golec, M. (2007). Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. *Ann Agric Environ Med* 14, 1–4.
- Gray, M.W. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science* 283, 1476–1481.
- Ha, T.T.N., Huy, N.T., Murao, L.A., Lan, N.T.P., Thuy, T.T., Tuan, H.M., Nga, C.T.P., Tuong, V.V., Dat, T.V., Kikuchi, M., et al. (2011). Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *PLoS ONE* 6, e25969.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Latz, E., and Wagner, H. (2008). The DNA Sugar Backbone 2' Deoxyribose Determines Toll-like Receptor 9 Activation. *Immunity* 28, 315–323.
- Haas, T., Schmitz, F., Heit, A., and Wagner, H. (2009). Sequence independent interferon- α induction by multimerized phosphodiester DNA depends on spatial regulation of Toll-like receptor-9 activation in plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 126, 290–298.
- Haller, O., Arnheiter, H., Gresser, I., and Lindenmann, J. (1981). Virus-specific interferon action. Protection of newborn Mx carriers against lethal infection with influenza virus. *J.Exp.Med.* 154, 199–203.
- Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., and Herbeuval, J.-P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 17453–17458.
- Haynes, B.F., Markert, M.L., Sempowski, G.D., Patel, D.D., and Hale, L.P. (2000). The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 529–560.

- Heeg, K., Dalpke, A., Peter, M., and Zimmermann, S. (2008). Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides. *International Journal of Medical Microbiology* 298, 33–38.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.
- Herbeuval, J.-P., and Shearer, G.M. (2007). HIV-1 immunopathogenesis: How good interferon turns bad. *Clinical Immunology* 123, 121–128.
- Herbeuval, J.P. (2005). CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524–3531.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 147, 258–267.
- Ishii, K., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends in Immunology* 27, 525–532.
- Ivanov, S., Dragoi, A.M., Wang, X., Dallacosta, C., Louten, J., Musco, G., Sitia, G., Yap, G.S., Wan, Y., Biron, C.A., et al. (2007). A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 110, 1970–1981.
- Kadowaki, N., and Liu, Y.-J. (2002). Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum. Immunol.* 63, 1126–1132.
- Kawasaki, T., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol. Rev.* 243, 61–73.
- Kerkmann, M. (2004). Spontaneous Formation of Nucleic Acid-based Nanoparticles Is Responsible for High Interferon- Induction by CpG-A in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280, 8086–8093.
- Keshari, R.S., Jyoti, A., Kumar, S., Dubey, M., Verma, A., Srinag, B.S., Krishnamurthy, H., Barthwal, M.K., and Dikshit, M. (2011). Neutrophil extracellular traps contain mitochondrial as well as nuclear DNA and exhibit inflammatory potential. *Cytometry* 81A, 238–247.
- Khan, N., Summers, C.W., Helbert, M.R., and Arkwright, P.D. (2010). Effects of age, gender, and immunosuppressive agents on in vivo toll-like receptor pathway responses. *Hum. Immunol.* 71, 372–376.
- Kirchhoff, F. (2009). Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 467–476.
- Klune, J.R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T.R., and Tsung, A. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* 14, 476–484.
- Krieg, A.M. (2001). Now I know my CpGs. *Trends Microbiol.* 9, 249–252.

- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., and Klinman, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546–549.
- Krysko, D.V., Agostinis, P., Krysko, O., Garg, A.D., Bachert, C., Lambrecht, B.N., and Vandenabeele, P. (2011). Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends in Immunology* 32, 157–164.
- Lahoud, M.H., Ahmet, F., Zhang, J.-G., Meuter, S., Policheni, A.N., Kitsoulis, S., Lee, C.-N., O'Keeffe, M., Sullivan, L.C., Brooks, A.G., et al. (2012). DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., et al. (2011). Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. *Science Translational Medicine* 3, 73ra19–73ra19.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., and Golenbock, D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5, 190–198.
- Lepelley, A., Louis, S., Sourisseau, M., Law, H.K.W., Pothlichet, J., Schilte, C., Chaperot, L., Plumas, J., Randall, R.E., Si-Tahar, M., et al. (2011). Innate Sensing of HIV-Infected Cells. *PLoS Pathog* 7, –.
- Levy, J. (1993). Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. pp. 151–152.
- Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., and Oshiro, L.S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225, 840–842.
- Lotze, M.T., and Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5, 331–342.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99–103.
- Matsui, T., Connolly, J.E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C.I., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., et al. (2009). CD2 Distinguishes Two Subsets of Human Plasmacytoid Dendritic Cells with Distinct Phenotype and Functions. *The Journal of Immunology* 182, 6815–6823.
- Matzinger, P. (2002). The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 296, 301–305.

- Meier, A., Chang, J.J., Chan, E.S., Pollard, R.B., Sidhu, H.K., Kulkarni, S., Wen, T.F., Lindsay, R.J., Orellana, L., Mildvan, D., et al. (2009). Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nature Publishing Group* 1–6.
- Netea, M.G., Quintin, J., and van der Meer, J.W.M. (2011). Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host and Microbe* 9, 355–361.
- Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P.A., Carballido, J., Picker, L.J., and Lund-Johansen, F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 94, 12551–12556.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K., and Muto, A. (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev* 56, 229–264.
- O’Brien, M., Manches, O., Sabado, R.L., Jimenez Baranda, S., Wang, Y., Marie, I., Rolnitzky, L., Markowitz, M., Margolis, D.M., Levy, D., et al. (2011). Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 121, 1088–1101.
- Pestka, S., Krause, C., and Walter, M. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202, 8–32.
- Pritschet, K., Donhauser, N., Schuster, P., Ries, M., Haupt, S., Kittan, N.A., Korn, K., Pöhlmann, S., Holland, G., Bannert, N., et al. (2012). CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* 423, 152–164.
- Ries, M. (2008). Die Rolle immunstimulatorischer Nukleinsäure-Motive für die native Immunabwehr viraler Infektionen, Diplomarbeit
- Robinson, H.L. (2002). VACCINES: NEW HOPE FOR AN AIDS VACCINE. *Nat Rev Immunol* 2, 239–250.
- Ronnblom, L., and Pascual, V. (2008). The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 17, 394–399.
- Rönblom, L., Eloranta, M.-L., and Alm, G.V. (2006). The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54, 408–420.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J.Theor.Biol.* 14, 255–274.
- Samulowitz, U., Weber, M., Weeratna, R., Uhlmann, E., Noll, B., Krieg, A.M., and Vollmer, J. (2010). A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides* 20, 93–101.
- Schmidt, B., Ashlock, B.M., Foster, H., Fujimura, S.H., and Levy, J.A. (2005). HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* 343, 256–266.
- Schmookler Reis, R., and Goldstein, S. (1983). Mitochondrial-Dna in Mortal and Immortal

- Human-Cells - Genome Number, Integrity, and Methylation. *Journal of Biological Chemistry* 258, 9078–9085.
- Schuster, P., Donhauser, N., Pritschet, K., Ries, M., Haupt, S., Kittan, N.A., Korn, K., and Schmidt, B. (2010). Co-ordinated regulation of plasmacytoid dendritic cell surface receptors upon stimulation with herpes simplex virus type 1. *Immunology* 129, 234–247.
- Seillet, C., Laffont, S., Tremollieres, F., Rouquie, N., Ribot, C., Arnal, J.F., Douin-Echinard, V., Gourdy, P., and Guery, J.C. (2012). The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor signaling. *Blood* 119, 454–464.
- Sester, D.P., Naik, S., Beasley, S.J., Hume, D.A., and Stacey, K.J. (2000). Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA. *J Immunol* 165, 4165–4173.
- Siegal, F.P. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* 284, 1835–1837.
- Sivori, S., Falco, M., Chiesa, Della, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10116–10121.
- Sтары, G., Klein, I., Kohlhofer, S., Koszik, F., Scherzer, T., Mullauer, L., Quendler, H., Kohrgruber, N., and Stingl, G. (2009). Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 114, 3854–3863.
- Taanman, J.W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 103–123.
- Takeda, K. (2004). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 17, 1–14.
- Tel, J., Benitez-Ribas, D., Hoosemans, S., Cambi, A., Adema, G.J., Figdor, C.G., Tacken, P.J., and de Vries, I.J.M. (2011). DEC-205 mediates antigen uptake and presentation by both resting and activated human plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 1014–1023.
- Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8, 487–496.
- Tripathi, P., and Agrawal, S. (2007). Immunobiology of human immunodeficiency virus infection. *Indian J Med Microbiol* 25, 311–322.
- Uematsu, S., and Akira, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 84, 712–725.

- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., et al. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* *34*, 251–262.
- Whitcomb, J.M., and Hughes, S.H. (1992). Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu. Rev. Cell Biol.* *8*, 275–306.
- Wolowczuk, I., Verwaerde, C., Viltart, O., Delanoye, A., Delacre, M., Pot, B., and Grangette, C. (2008). Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. *Clinical and Developmental Immunology 2008*, 1–19.
- Wyllie, A.H. (2010). “Where, O Death, Is Thy Sting?” A Brief Review of Apoptosis Biology. *Mol Neurobiol* *42*, 4–9.
- Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Lippa, P.B., Schmitz, F., Haas, T., Heit, A., Bauer, S., and Wagner, H. (2006). CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of “natural” phosphodiester DNA. *Eur. J. Immunol.* *36*, 431–436.
- Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C.J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H., and Wagner, H. (2005). Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* *174*, 6129–6136.
- Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* *464*, 104–107.

9 Verzeichnis der Vorveröffentlichungen

Originalartikel:

1. Schuster, P., Donhauser, N., Pritschet, K., **Ries, M.**, Haupt, S., Kittan, N.A., Korn, K., & Schmidt, B. (2010). Coordinated regulation of plasmacytoid dendritic cell surface receptors upon stimulation with herpes simplex virus type 1. *Immunology* 129: 234-247.
2. Donhauser, N., Helm, M., Pritschet, K., Schuster, P., **Ries, M.**, Korn, K., Vollmer, J. & Schmidt, B. (2010). Differential effects of P-class versus other CpG oligodeoxynucleotide classes on the impaired innate immunity of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 26: 161-171.
3. Pritschet, K., Donhauser, N., Schuster, P., **Ries, M.**, Haupt, S., Kittan N. A., Korn, K., Pöhlmann, S., Holland, G., Bannert, N., Bogner, E. & Schmidt, B. (2012). CD4- and dynamin-dependent endocytosis of HIV-1 into plasmacytoid dendritic cells. *Virology* 423: 152-164.
4. Donhauser, N., Pritschet, K., Helm, M., Harrer, T., Schuster, P., **Ries, M.**, Bischof, G., Vollmer, J., Smola, S. & Schmidt, B. for the German Competence Network HIV/AIDS (2012). Chronic immune activation in HIV-1 infection contributes to reduced interferon alpha production via enhanced CD40:CD40 ligand Interaction. *PLoS ONE* 7(3):e33925.
5. **Ries, M.**, Schuster, P., Thomann, S., Donhauser, N., Vollmer, J., & Schmidt, B. Identification of novel oligonucleotides from mitochondrial DNA, which spontaneously induce plasmacytoid dendritic cell activation (*J Leucocyte Biol, in revision*).

Übersichtsartikel:

1. **Ries, M.**, Pritschet, K. & Schmidt, B. (2012). Blocking type I interferon production - a new therapeutic option to reduce the HIV-1 induced immune activation. *Clin. Dev. Immunol.*, 534929.

10 Abkürzungsverzeichnis

Häufig verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AIDS	erworbene Immunschwächekrankheit (engl. <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
as	antisense
BDCA	Antigen dendritischer Zellen im Blut (engl. <i>blood dendritic cell antigen</i>)
bp	Basenpaar (engl. <i>base pair</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Oberflächen-Differenzierungsantigen (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
DAMP	Verletzungs-assoziiertes molekulares Muster (engl. <i>damage associated molecular pattern</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ds	Doppelstrang
EEA	Antigen in frühen Endosomen (engl. <i>early endosomal antigen</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoassay (engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence-aided cell sorting</i>)
h	Stunde
g	Gramm
xg	x-fach Erdbeschleunigung
HMGB1	Hoch bewegliches Box-Gruppen Protein (engl. <i>high mobility group box protein</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
M	molar
MFI	Mediane Fluoreszenz Intensität
min	Minute
mt	mitochondrial

Abkürzungsverzeichnis

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ODN	Oligodeoxynukleotide
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	Mononukleäre Zellen im peripheren Blut (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PDC	Plasmazytoide dendritische Zellen (engl. <i>plasmacytoid dendritic cells</i>)
PRR	Mustererkennungsrezeptor (engl. <i>pattern recognition receptor</i>)
s	sense
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
ss	Einzelstrang (engl. <i>single strand</i>)
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor (engl. <i>Toll like receptor</i>)

11 Lebenslauf

12 Danksagung

Vielen Dank an Herrn Professor Fleckenstein für die Möglichkeit meine Promotion im Virologischen Institut in Erlangen durchführen zu können.

Auch danke ich Herrn Professor Maniak für die Übernahme meiner Betreuung und des Erstgutachtens. Ebenso danke ich Herrn Professor Nellen und Herrn Zöltzer, die sich freundlicherweise als Prüfer zur Verfügung gestellt haben.

Ganz besonders danken möchte ich Barbara für Jahre des Lehrens, Motivation, Vorschläge und Unterstützung. Danke! Einer muss ja den großen Überblick behalten.

Danke an das Labor. Meinen langjährigen Mitarbeitern Papa Schlumpf Norbert, Schlaubi Schlumpf Philipp und dem Nesthäkchen Dr. Kathrin für endloses dummes Rumlabern und unglaublich viel Spaß, aber auch ausgesprochen hilfreiche Diskussionen und Ratschläge. Alles zur rechten Zeit. Meistens.

Meinen nicht ganz so langjährigen Mitarbeitern Georg, Katja, Sabrina, Jan, Tanja und Karin für mindestens genauso viel Spaß, und nur unwesentlich weniger Blödsinn.

Ich danke sämtlichen Blutspendern des Instituts für ihr Blut und ihre Zellen.

Nicht zu vergessen, danke ich sämtlichen meiner Vorfahren (besonders meinen Eltern), sie haben in dieser manchmal beklagenswert humorlosen Welt lange genug überlebt um sich fortzupflanzen. Dafür bin ich ihnen allen wirklich ausgesprochen dankbar!

Und überhaupt!
For Science!

13 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Teile der Einleitung sowie für die Abbildungen 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13 und 14 verwendete Daten und Tabelle 11 wurden aus der Diplomarbeit übernommen. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Erlangen, den 28. September 2012

M. Ries