Verstärkte Immunerkennung von UV-geschädigten Nukleinsäuren - ein möglicher Mechanismus der Phototoxizität im SLE

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nadine Gehrke

aus

Koblenz

Bonn, 2011

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gunther Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle

Tag der Promotion: 06.12.2011
Erscheinungsjahr: 2011

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2006 bis Mai 2011 am Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. Gunther Hartmann und Betreuung durch Dr. Winfried Barchet angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit und sämtliche Ergebnisse selbstständig verfasst, erarbeitet und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bonn, im Mai 2011

(Nadine Gehrke)

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Lupus erythematodes (LE) ist eine der meist verbreiteten dermatologischen Autoimmunerkrankungen weltweit. Ihr Verlauf ist meist chronisch schubhaft. Neben Entzündungsreaktionen in den inneren Organen im Falle einer systemischen Manifestation, werden vor allem die für alle LE-Subtypen charakteristischen Hautläsionen, darunter auch das Schmetterlingserythem, bei vielen Patienten durch Sonnenlicht- bzw. UV-Exposition provoziert (Photosensitivität). Die genauen Gründe, warum UV-Strahlung zur Induktion von Lupus-Schüben führt, sind unklar. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nukleinsäuren aus UV-exponierten Zellen das angeborene Immunsystem aktivieren können, indem sie die Erkennung über zytosolische Rezeptoren stimulieren und im Gegensatz zu UV-bestrahlten Zellen, die ein anti-inflammatorisches Zytokinmilieu schaffen, die Produktion und Sekretion von Typ I-Interferon und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12p40 und IP-10 in Immunzellen induzieren. Dieses Phänomen konnte sowohl in humanen Monozyten als auch in murinen myeloiden dendritischen Zellen, Makrophagen und Keratinozyten *in vitro* beobachtet werden. *In vivo*-Studien untermauerten die biologische Relevanz. Obgleich eine Translokation von genomischer DNA ins Zytosol generell zu einer Aktivierung der Zelle führte, so war die durch genomische DNA UV-exponierter Zellen ausgelöste Immunantwort um ein Vielfaches stärker. Die Wellenlänge der UV-Strahlung schien dabei weitgehend unerheblich zu sein. Auch eine direkte Bestrahlung von genomischer DNA sowie anderen DNA- und RNA-Liganden der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren mit UV-Licht bewirkte eine Verstärkung ihres immunstimulatorischen Potenzials. Als Ursache dafür konnten durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte Modifikationen wie die oxidative Basenmutation 8-Oxoguanin identifiziert werden, die in der genomischen DNA UV-bestrahlter Zellen nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus war der gezielte Einbau von 8-Oxoguanin hinreichend, um die immunstimulatorischen Fähigkeiten von DNA und RNA zu verstärken. Für die Immunerkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren waren die jeweils spezifischen zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren notwendig. Die beobachtete Signalverstärkung wird dabei über einen zweiten synergistisch wirkenden Signalweg erreicht, bei dem die Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK eine Rolle spielen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **1**

Inhaltsverzeichnis **2**

1 Einleitung **7**

1.1 Das Immunsystem 7
1.2 Die Pattern Recognition Receptors (PRRs) 9
1.2.1 Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs) 10
1.2.2 Die RIG-like Rezeptoren (RLRs) RIG-I, MDA-5 und LGP2 18
1.2.3 Zytoplasmatische DNA-Sensoren 22
1.3 Das Typ I-Interferon (IFN)-System 24
1.4 Ultraviolette (UV-) Strahlung 26
1.4.1 UV-Strahlung und ihre biologische Wirkung auf das Immunsystem der Haut 26
1.4.2 Direkte und indirekte DNA-Schäden 29
1.4.4 Apoptose 37
1.4.5 Immunsuppressive Effekte der UV-Strahlung 38
1.4.6 Immunaktivierende Effekte von UV-Strahlung 39
1.5 Die Autoimmunerkrankung Lupus erythematodes (LE) 41
1.6 Zielsetzung der Arbeit 47

2 Material und Methoden **48**

2.1 Material 48
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte 48
2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien 50
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien 51
2.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien 54
2.1.5 ELISA (Kits, Antikörper und Enzyme) 57
2.1.6 Magnetische Kügelchen (Beads) 58
2.1.7 FACS-Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe 58
2.1.8 Transfektionsreagenzien 58
2.1.9 Inhibitoren 59
2.1.10 Enzyme 59
2.1.11 Weitere Kits 60

2.1.12 Primer der Genotypisierung ... 60
2.1.13 shRNA-Sequenzen ... 60
2.1.14 Nukleinsäuren ... 61
2.1.15 Verwendete Primärzellen und Zelllinien ... 61
2.1.16 Verwendete Mauslinien ... 62
2.2 Zellbiologische Methoden ... 62
2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen ... 62
2.2.2 Kultivierung von Zellen und ihre Passagierung ... 63
2.2.3 Zellzahlbestimmung ... 63
2.2.4 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen ... 64
2.2.5 Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) ... 64
2.2.6 Isolation von humanen Monozyten ... 65
2.2.7 Isolation von humanen BDCA-1$^+$ dendritischen Zellen ... 66
2.2.8 Isolation von humanen Monozyten und Differenzierung zu dendritischen Zellen (MoDCs) ... 67
2.2.9 Isolierung von Knochenmarkszellen aus der Maus und Differenzierung zu myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) ... 68
2.3 Stimulation von Zellen mit Nukleinsäuren ... 69
2.3.1 Transfektion von Nukleinsäuren mit Dotap ... 69
2.3.2 Transfektion von Nukleinsäuren mit Lipofectamine™ 2000 ... 69
2.3.3 Transfektion von Nukleinsäuren mit TransIT-LT1 Transfection Reagent ... 70
2.3.4 Elektroporation von Nukleinsäuren ... 70
2.4 Induktion von oxidativem Stress ... 71
2.4.1 UV-Bestrahlung von Zellen und Nukleinsäuren ... 71
2.4.2 H_2O_2-Behandlung von Zellen und Nukleinsäuren ... 71
2.5 Immunfluorometrische Methoden ... 72
2.5.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer ... 72
2.5.2 Markierung von Oberflächenantigenen ... 73
2.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion mit Annexin-V-Fluos ... 73
2.5.4 Messung der Zellviabilität mit CellTiter-Blue ... 74
2.6 Zytokinmessung ... 75
2.6.1 Elisa zur Bestimmung der murinen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70 und IP-10 ... 75
2.6.2 ELISA zur Bestimmung des murinen IFN-α ... 76
2.6.3 ELISA zur Bestimmung von humanem IFN-α ... 78
2.7 Molekularbiologische Methoden ... 78

2.7.1 Genotypisierung von Mäusen ... 78
2.7.2 Qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR) ... 79
2.7.3 Aufreinigung von PCR-Produkten ... 81
2.7.4 Isolation von genomischer DNA aus Zellen ... 81
2.7.5 Isolation von totaler RNA aus Zellen ... 82
2.7.6 *In vitro*-Transkription ... 82
2.7.7 Doppelsträngige Oligodesoxynukleotide (dsODNs) ... 84
2.7.8 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ... 84
2.7.9 Agarose-Gelelektophorese ... 85
2.7.10 Einbau und Nachweis von 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OH-dG) in Nukleinsäuren ... 86
2.8 Virologische Methoden ... 89
2.8.1 Herstellung von lentiviralen shRNA-Vektoren ... 89
2.8.2 Herstellung von transduzierten Zelllinien ... 92
2.9 Maus *in vivo* Versuche ... 92
2.10 Statistische Analysen ... 93

3 Ergebnisse ... 94

3.1 UV-Strahlung induziert dosisabhängig Apoptose ... 94
3.2 UV-Strahlung induziert dosisabhängig IL-6 ... 96
3.3 UV-bestrahlte Zellen haben eine immunsuppressive Wirkung auf kokultivierte murine mDCs ... 97
3.4 UV-Strahlung generiert immunogene RNA-Spezies, die IFN-α in murinen mDCs induzieren ... 100
3.5 UV-Strahlung verstärkt die stimulatorischen Eigenschaften von zellulärer DNA 102
3.6 UV-modifizierte DNA induziert eine verstärkte IFN-α-Antwort in humanen Monozyten ... 106
3.7 UV-B- und UV-C-Licht haben aufgrund ihrer Strahlungsenergie eine starke Wirkung auf die stimulatorischen Eigenschaften zellulärer DNA ... 107
3.8 Durch DNase I-Behandlung verliert UV-modifizierte DNA ihre stimulatorische Aktivität ... 110
3.9 UV-modifizierte DNA wird TLR9-unabhängig im Zytosol erkannt ... 111
3.10 Eine direkte Bestrahlung von genomischer DNA mit UV-Licht verstärkt deren stimulatorische Wirkung ... 115
3.11 Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren werden durch UV-Strahlung in ihrer stimulatorischen Aktivität gesteigert ... 118

3.12 Die Basenzusammensetzung hat keine entscheidende Auswirkung auf die Aktivitätssteigerung von UV-bestrahlten Nukleinsäuren 123
3.13 Der UV-Effekt kann durch H_2O_2-Behandlung imitiert werden 124
3.14 Die durch ROS induzierte oxidative Basenmodifikation 8-OH-dG ist in der genomischen DNA UV-bestrahlter Zellen nachweisbar 127
3.15 Durch Inkorporation von 8-OH-dG/8-OH-G in Nukleinsäuren kann deren stimulatorische Wirkung gezielt verstärkt werden 128
3.16 UV-modifizierte DNA induziert auch *in vivo* erhöhte IFN-α-Titer 132
3.17 An der Erkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren ist möglicherweise ein zweiter, synergistisch wirkender Signalweg beteiligt 133
3.18 Das NLRP3-Inflammasom spielt keine Rolle bei der Erkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren 136
3.19 Screening nach einem den UV-Effekt vermittelnden Signalweg deutet auf eine Rolle von p38 und JNK bei der DNA-Erkennung hin 139

4 Diskussion 149

4.1 UV-Strahlung induziert dosisabhängig Apoptose und verändert das Zytokinprofil 149
4.2 UV-bestrahlte, apoptotische Zellen haben eine immunsupprimierende Wirkung auf APCs 153
4.3 UV-Strahlung induziert immunogene RNA-Spezies in apoptotischen Zellen 155
4.4 UV-Strahlung steigert das immunstimulatorische Potenzial genomischer DNA, was sich in einer verstärkten Immunantwort muriner und humaner myeloider Immunzellen widerspiegelt 156
4.5 UV-modifizierte genomische DNA wird zytosolisch erkannt 161
4.6 Eine direkte Bestrahlung von genomischer DNA und anderen Liganden zytosolischer Nukleinsäure-Rezeptoren führt zu einer verstärkten Immunerkennung *in vitro* und *in vivo* 165
4.7 Durch UV-Strahlung generierte ROS induzieren Modifikationen, die das immunstimulatorische Potenzial von Nukleinsäuren steigern 167
4.8 Die oxidative Basenmodifikation 8-OH-dG/8-OH-G in Nukleinsäuren ist für eine verstärkte Immunerkennung hinreichend 169
4.9 Die Stress-aktivierten Proteinkinasen p38 und JNK sind an der IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte genomische DNA beteiligt 172
4.10 In myeloiden Immunzellen könnte die verstärkte Immunerkennung UV-geschädigter Nukleinsäuren anhand oxidativer Modifikationen zur Phototoxizität beim SLE führen 175

5 Anhang 179

5.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide 179
5.2 Abkürzungsverzeichnis 179
5.3 Abbildungsverzeichnis 185
5.4 Tabellenverzeichnis 187
5.5 Literaturverzeichnis 187
5.6 Danksagung 230
5.7 Lebenslauf 232

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper hat sich ständig mit einer Vielzahl von Fremdorganismen auseinander zu setzen und sich den Angriffen von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu erwehren. Diese Aufgabe übernimmt das Immunsystem (vom Lateinischen „immunis“, im übertragenen Sinne unberührt, frei, rein). Das Immunsystem ist ein in seinem Ganzen über Jahrmillionen entstandenes biologisches Abwehrsystem zum Schutz des Menschen vor pathogenen Eindringlingen und Fremdsubstanzen von Außen wie auch vor infizierten bzw. entarteten körpereigenen Zellen. Diese gilt es zu beseitigen. Grundlage für die Abwehrprozesse ist die Fähigkeit des Immunsystems zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden.

Das menschliche Immunsystem besteht aus den phylogenetisch weitaus älteren angeborenen bzw. unspezifischen Abwehrmechanismen („innate immunity“) und aus der adaptiven, spezifischen Abwehr („adaptive immunity“), die sich im Verlauf der Evolution bei Vertebraten zusätzlich entwickelt hat. Ihr Zusammenspiel ist die Voraussetzung für eine effektive Abwehr und Beseitigung von Pathogenen im menschlichen Körper.

Während die Erkennung von körperfremden Strukturen als „Nicht-Selbst“ durch das angeborene Immunsystem auf unveränderlichen, keimbahnkodierten Rezeptoren beruht, die allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern erkennen (Gordon, 2002; Janeway and Medzhitov, 2002), führen beim erworbenen Immunsystem somatische Rekombinationen der T- und B-Zell-Rezeptorgene zu einer hohen Diversität von antigenspezifischen Effektorzellen (Brack et al., 1978; Schatz et al., 1992). Nach Erkennung und Bindung des Antigens expandieren sie spezifisch und vermitteln eine spezifische Immunantwort zur Beseitigung des Krankheitserregers. Gleichzeitig erzeugt die adaptive Immunantwort durch klonale Selektion eine erhöhte Zahl ausdifferenzierter Gedächtniszellen, welche einen stärkeren Schutz gegen eine erneute Infektion bieten. Da zur Generierung einer Immunantwort des erworbenen Immunsystems einige Tage benötigt werden, ist das angeborene Immunsystem in der frühen Phase der Pathogenabwehr von zentraler Bedeutung. Dendritische Zellen (DCs), Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) fungieren in dieser Phase als Abwehrzellen, die durch lösliche Eiweiße des Komplementsystems unterstützt werden.

Neben den keimbahnkodierten Rezeptoren dienen ihnen auch Moleküle, die nur von körpereigenen Zellen exprimiert werden, zur Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“. Hierzu zählen z.B. die Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“, MHC) Klasse I Moleküle, die auf nahezu allen gesunden Körperzellen vorkommen. Wird eine Zelle durch Viren infiziert oder wandelt sich in eine Tumorzelle um, so geht unter Umständen der MHC I-Komplex auf ihrer Zelloberfläche verloren. Das fein ausbalancierte Gleichgewicht von inhibierenden und aktivierenden Rezeptorsignalen wird dadurch zugunsten der Aktivierung von NK-Zellen verschoben. Infolgedessen fällt die erkrankte Zelle einer durch die NK-Zellen ausgelösten Immunreaktion anheim und wird abgetötet („Missing-self“-Hypothese) (Lanier, 1998; Long, 1999). Auch die Moleküle CD46, CD55 und CD59 des Komplementsystems werden nur auf körpereigenen Zellen exprimiert und schützen sie so vor Angriffen des Komplementsystems (Austen and Fearon, 1979).

Ca. 90 % aller Infektionen können durch die angeborene Immunabwehr erkannt und erfolgreich bekämpft werden, andernfalls werden sie von dem angeborenen Immunsystem bis zum Aufbau der adaptiven Immunantwort in Schach gehalten.

Zelluläres Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem sind die Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) des angeborenen Immunsystems, in erster Linie DCs und Monozyten/Makrophagen. Sie können von Pathogenen stammende Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen, prozessieren und als Peptide in Assoziation mit MHC II und ko-stimulatorischen Molekülen den Effektorzellen des erworbenen Immunsystems präsentieren. Erst durch die Hochregulation der ko-stimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und MHC II wird die schnelle klonale Expansion der antigenspezifischen T- und B-Effektorzellen im Rahmen der erworbenen Immunabwehr ermöglicht (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Reis e Sousa, 2004). APCs sind jedoch nicht antigenspezifisch, das heißt, sie prozessieren und präsentieren Antigene unabhängig davon, ob es „Selbst“- oder „Nicht-Selbst“-Antigene sind. Um dennoch eine antigenspezifische Stimulation des erworbenen Immunsystems zu gewährleisten, werden ko-stimulatorische Moleküle auf den APCs nur nach vorheriger Stimulation der „pattern recognition receptors“ (PRRs) durch die entsprechenden „pattern associated molecular patterns“ (PAMPs) heraufreguliert (Kapsenberg, 2003; Medzhitov and Janeway, 2002).

1.2 Die Pattern Recognition Receptors (PRRs)

Die Zellen des angeborenen Immunsystems müssen mit Hilfe einer relativ geringen Anzahl von keimbahnkodierten Rezeptoren die gesamte Vielfalt von Pathogenen gezielt erkennen, um spezifische Abwehrmechanismen zu aktivieren (Akira et al., 2006). Dies geschieht über die so genannten „pattern recognition receptors“ (PRRs), die bei Immunzellen weit verbreitet sind und Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs) erkennen.

Als Liganden dieser PRRs eignen sich folglich nur Strukturen, die hoch konserviert sind, das heißt, der Ligand sollte ein konstitutiv und invariabel exprimiertes Muster darstellen, das auf einer großen Gruppe von Pathogenen vorhanden ist, und keine spezielle, einzelne, seltene Struktur (Akira et al., 2006; Medzhitov and Janeway, 1997). Des Weiteren sollte der Ligand nur von Pathogenen aber nicht von körpereigenen Zellen exprimiert werden (Janeway, 1989; Janeway and Medzhitov, 2002; Medzhitov and Janeway, 2000; Medzhitov and Janeway, 1997), um die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu gewährleisten. Diese Eigenschaften potentieller Liganden des angeborenen Immunsystems wurden schon 1989 von Charles Janeway postuliert (Janeway, 1989). Auch körpereigene Strukturen insbesondere Nukleinsäuren können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu bestimmten PAMPs als Liganden fungieren und das angeborene Immunsystem über die PRRs aktivieren. Dies setzt allerdings die Lokalisation dieser Strukturen in gewissen Zellkompartimenten voraus, in denen zwar die PRRs, sie aber in der Regel nicht vorkommen.

Zu den PRRs zählen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die C-Typ Lektin-like Rezeptoren (LLRs), die als Transmembranrezeptoren PAMPs entweder an der äußeren Zellmembran oder im Endosom detektieren (Kawai and Akira, 2007; Robinson et al., 2006; Willment and Brown, 2008) sowie die Rig-like Rezeptoren (RLRs), die Nod-like Rezeptoren („nucleotide-binding domain and leucin-rich repeat containing molecules“, NLRs) und die DNA-Sensoren, die an der Erkennung zytosolischer PAMPs beteiligt sind (Franchi et al., 2009; Takaoka and Taniguchi, 2008; Takeuchi and Akira, 2008; Yoneyama and Fujita, 2009). Infolge der Detektion von PAMPs werden spezifische Signalkaskaden aktiviert, die zur Produktion von Effektormolekülen wie Zytokinen und Chemokinen sowie zur Expression von Oberflächenmolekülen führen. Diese Effektormoleküle, darunter das Typ I-Interferon (IFN), können antiviral oder antibakteriell wirken, Apoptose induzieren und eine Vielzahl weiterer Effektorzellen des angeborenen Immunsystems aktivieren, die über chemotaktische Prozesse zum entzündeten Gewebe geleitet werden. Darüber hinaus

können spezifische T- und B-Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

1.2.1 Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die Toll-like Rezeptoren („toll-like receptors“, TLRs) stellen eine wichtige Klasse der PRRs dar. Der Begriff „Toll“ bezieht sich auf ein Gen in Drosophila, das für den Rezeptor Toll kodiert und erstmals von der Gruppe um Christiane Nüßlein-Vollhardt beschrieben wurde. Nachdem der Rezeptor Toll in Drosophila zunächst als eines der Moleküle identifiziert wurde, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der dorsoventralen Achse des Embryos spielen (Anderson et al., 1985a; Anderson et al., 1985b), erkannten Lemaitre und Kollegen später auch seine Funktion im Immunsystem der Fliege bei der Abwehr von Pilzinfektionen (Lemaitre et al., 1996). Aufgrund großer Homologie in der Gensequenz und Struktur von definierten Rezeptoren in Vertebraten zu dem Rezeptor Toll, benannte man diese Ende der 1990er Jahre als TLRs.

TLRs sind Typ I Transmembranmoleküle. Neben einer transmembranen Region besitzen sie extrazellulär Leucin-reiche Regionen („leucin rich repeats“, LRRs) (Martin and Wesche, 2002) und intrazellulär eine Toll/Interleukin-1 Rezeptor Homologie (TIR)-Domäne. Die LRRs sind für die spezifische Erkennung der PAMPs verantwortlich. Die zytoplasmatische TIR-Domäne ist für die Erzeugung intrazellulärer Signale essentiell.

Gegenwärtig sind im Menschen 11 und in der Maus 13 TLRs bekannt (Kawai and Akira, 2006b, 2007). Einen Überblick über die TLRs mit Beispielen für ihre jeweiligen Liganden sind in Tabelle 1.1 dargestellt. Typischerweise werden die TLRs auf Immunzellen gefunden, wurden aber auch auf anderen Zelltypen identifiziert, z.B. Fibroblasten, Endothelzellen und intestinalen Epithelzellen (Funami et al., 2004; Latz et al., 2004; Nishiya et al., 2005). Sie sind sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten, den Lysosomen und Endosomen, lokalisiert. Zu den Oberflächenrezeptoren gehören TLR1, 2, 4 und 6, die Lipidliganden erkennen, sowie TLR5 und 11, deren Liganden Proteine sind (Hayashi et al., 2001; Plattner et al., 2008). Der humane TLR11 ist jedoch nicht funktional (Zhang et al., 2004).

Im Gegensatz zu den Oberflächenrezeptoren werden TLR3, 7, 8 und 9 nicht ubiquitär exprimiert, sondern sind vorwiegend in den endosomalen Strukturen von Immunzellen zu finden, wobei sie ein zelltypspezifisches Expressionsmuster haben, das speziesabhängig differiert. Sie erkennen Nukleinsäuren sowohl viraler als auch bakterieller Herkunft (Alexopoulou et al., 2001; Krieg et al., 1995; Krug et al., 2004b; Lund et al., 2003; Lund et

al., 2004). Die gemeinsame Lokalisation dieser TLRs lässt vermuten, dass sie für die spezifische Detektion entsprechender Liganden erforderlich ist. So gelangen Viren und Bakterien bei ihrer Aufnahme in das Lysosom/Endosom der Zelle, wo ihre Nukleinsäuren von den dortigen TLRs detektiert werden können. Für die TLR-Aktivierung ist eine Ansäuerung der Endosomen notwendig, die der Zersetzung viraler Partikel und bakterieller Zellwände dient und die Nukleinsäuren der Pathogene den TLRs zugänglich macht. „Selbst"-Nukleinsäuren sind dagegen unter normalen Konditionen nur im Zytoplasma und im Kern der Zelle vorhanden, eine Erkennung und Aktivierung der TLRs durch „Selbst"-Nukleinsäuren in den Endosomen findet daher im gesunden Zustand der Zelle nicht statt.

TLR3 ist vor allem auf humanen Astrozyten, GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) DCs und BDCA („blood dendritic cell antigen")-3/CD8$^+$ DCs funktional exprimiert, im Maussystem zusätzlich auf Makrophagen. TLR3 erkennt lange Doppelstrang (ds)-RNA (Alexopoulou et al., 2001), die im Genom von dsRNA-Viren vorkommt sowie während der Replikation oder Transkription vieler Einzelstrang (ss)-RNA-Viren oder DNA-Viren gebildet wird (Alexopoulou et al., 2001; Weber et al., 2006). So detektiert TLR3 die genomische dsRNA von Reovirus (Alexopoulou et al., 2001), ssRNA-Viren wie das Respiratorische-Syncytial-Virus, West-Nile-Virus, Encephalomyocarditis-Virus, Semliki-Forest-Virus und Influenza-A-Virus (Le Goffic et al., 2006; Rudd et al., 2006; Wang et al., 2004) sowie die dsDNA-Viren Maus-Zytomegalie-Virus und Herpes-simplex-Virus (HSV) (Tabeta et al., 2004; Zhang et al., 2007). Das enzymatisch generierte Polynukleotid poly I:C („polyinosinic-polycytidilic acid") aktiviert ebenfalls TLR3 und wird gemeinhin als Surrogat für virale dsRNA verstanden. Laut Kleinman und Kollegen wird auch ds „small interfering RNA" (siRNA) von TLR3 erkannt (Kleinman et al., 2008).

TLR7 und 8 sind strukturell homolog und beide Sensoren für ssRNA. Während die Expression von TLR7 in Mauszellen weit verbreitet ist, ist TLR7 in humanen Zellen überwiegend auf plasmazytoiden DCs (PDCs) und B-Zellen zu finden (Krug et al., 2001b). TLR8 hingegen ist nicht funktional im Maussystem (Jurk et al., 2002), scheint aber im Menschen das Fehlen von TLR7 in Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen und myeloiden DCs (mDCs) zu komplementieren (Barchet et al., 2008; Hornung et al., 2002; Krug et al., 2001b). Neben synthetischen Verbindungen wie Imidazoquinolinen und Guanosinderivaten, die im humanen System TLR7 und 8 aktivieren (Gorden et al., 2005; Heil et al., 2003; Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002; Lee et al., 2003), gibt es TLR7-spezifische Moleküle wie Imiquimod R-837, Resiquimod R-848, 3M-001 und Loxoribine, die PDCs zur Produktion von Typ I-IFN stimulieren, sowie den TLR8-spezifischen Stimulus 3M-002, der zwar PDCs nicht aktiviert, aber in Monozyten die Sekretion von Interleukin (IL)-12p70 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)-α induziert. Darüber hinaus

erkennen TLR7 und/oder 8 ssRNA viraler Herkunft, darunter Guanosin- und Uridin-reiche ssRNA im Genom des Humanen Immundefizienz-Virus sowie die genomische RNA von Influenza-A-Virus, Sendai-Virus, Vesicular-Stomatitis-Virus, Coxsackie-B-Virus, Parechovirus 1 (Echovirus 1) sowie Dengue-Virus (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Jurk et al., 2002; Lund et al., 2004; Melchjorsen et al., 2005; Triantafilou et al., 2005a; Triantafilou et al., 2005b; Wang et al., 2006). Als nicht-virale Liganden von TLR7 wurden außerdem aufgereinigte mRNA, synthetische Oligoribonukleotide (ORNs) mit einem hohen Guanosin-Uridin-Gehalt, siRNA mit aktiven ssRNA-Sequenzen und ORNs mit einer Länge von 21 Nukleotiden und aus ausschließlich Uridinen bestehend beschrieben (Barchet et al., 2005; Diebold et al., 2006; Heil et al., 2004; Hornung et al., 2005). Neben dem strikten Expressionsmuster von TLR7/8 dienen möglicherweise auch die Ligandenstruktur sowie Modifikationen z.B. 5-Methylcytidin oder 2'-O-Methylgruppen (Kariko et al., 2005; Robbins et al., 2007), die häufig bei „Selbst-RNA“ vorkommen, der Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“.

TLR9 wird im humanen System nur auf PDCs und B-Zellen exprimiert (Hornung et al., 2002; Krug et al., 2001b), wohingegen er in Mauszellen in einem breiten Spektrum verschiedener Immunzellen exprimiert wird, darunter auch auf bestimmten Subtypen der mDCs. TLR9 erkennt unmethylierte CpG-Motive, die häufig in bakterieller und viraler DNA vorkommen (Basner-Tschakarjan et al., 2006; Hemmi et al., 2000; Hochrein et al., 2004; Krieg, 1996; Krieg et al., 1995; Krieg et al., 1998b; Krug et al., 2004a; Krug et al., 2004b; Lund et al., 2003; Tabeta et al., 2004; Zhu et al., 2007). CpG-Motive sind unmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen (Krieg et al., 1995), wobei das „p” für eine Phosphatbindung zwischen den beiden Basen steht. Während im Genom von Bakterien und Viren statistisch gesehen fast jedes sechzehnte Dinukleotid ein CpG ist und das Cytosin der CpG-Motive weitestgehend in nicht-methylierter Form vorliegt, ist bei Vertebraten nur jedes sechzigste Dinukleotid ein CpG und 80 % der Cytosine sind methyliert. Bakterielle DNA enthält also etwa zwanzigmal mehr unmethylierte CpG-Motive als Vertebraten-DNA. Laut Stacey und Kollegen blockiert eine Methylierung des Cytosins die immunstimulatorische Wirkung von bakterieller DNA oder CpG-Oligonukleotiden (CpG-ODNs) (Stacey et al., 1996). Bei den CpG-ODNs handelt es sich um synthetisch hergestellte ssODNs, in denen sich das CpG-Motiv mehrfach wiederholt. Sie imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und aktivieren ebenfalls TLR9 (Hartmann et al., 2003; Krug et al., 2001a; Verthelyi et al., 2001). TLR9 induziert nach Detektion von CpG-ODNs in PDCs große Mengen Typ I-IFN bzw. aktiviert B-Zellen zur Zellteilung (Hartmann et al., 2003; Poeck et al., 2004), wobei diesbezüglich unterschiedliche Klassen von CpG-ODNs unterschieden werden müssen. CpG-ODNs vom B/K-Typ, die ein Phosphothioat-Rückgrat haben, aktivieren B-Zellen über die

Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und induzieren eine moderate IFN-α-Produktion (Yoneyama and Fujita, 2010). Ein Hauptvertreter ist das CpG-ODN 2006. CpG-ODNs vom A/D-Typ sind hingegen durch eine palindromische Struktur mit Phosphodiester-Rückgrat charakterisiert (Yoneyama and Fujita, 2010). Das CpG-Motiv wird von poly G-Sequenzen flankiert, die G-Tetraden bilden. Diese G-Tetraden binden an Scavenger Rezeptoren, wodurch die CpG-ODNs in die Zelle gelangen. Ein Vertreter der CpG-ODNs vom A/D-Typ ist CpG-ODN 2216, das in starkem Maße IFN-α aber nur eine schwache B-Zell-Aktivierung induziert (Yoneyama and Fujita, 2010). CpG-ODNs vom C-Typ haben eine gemischte Struktur, z.B. Phosphothioat-enthaltende palindromische Sequenzen, und induzieren sowohl IFN-α als auch B-Zell-Aktivierung (Yoneyama and Fujita, 2010). Ursächlich für die unterschiedliche Aktivität der CpG-ODNs ist ihre jeweilige Lokalisation in intrazellulären Kompartimenten. A/D-Typ CpG-ODNs sind überwiegend in den frühen Endosomen von PDCs in einem Komplex mit MyD88 („myeloid differentiation primary response protein 88“) und IRF („interferon regulatory factor“)7 lokalisiert, was zu einer starken IFN-α-Induktion führt, wohingegen B/K-Typ CpG-ODNs vor allem in die späten Endosomen translokalisiert werden und eher inflammatorische Zytokine induzieren als IFN-α (Honda et al., 2005a).

Die Liganden für TLR10, der nur in humanen nicht aber in murinen Zellen exprimiert wird, sowie für die ausschließlich murinen TLR12 und 13 sind noch nicht identifiziert.

Einige TLRs können neben PAMPs auch endogene Liganden erkennen. Dies sind überwiegend Substanzen, die aus nekrotischen oder spätapoptotischen Zellen stammen und somit bei einem normalen Gleichgewicht zwischen Zelltod und Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten nicht freigesetzt werden (Marshak-Rothstein, 2006). So beschreiben mehrere Publikationen endogenes Chromatin als Ligand für TLR9. Dies ist interessant im Zusammenhang mit der Pathogenese systemischer Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE). Da TLR9 mit endosomalen Strukturen assoziiert intrazellulär lokalisiert ist, findet eine Bindung an körpereigenes Chromatin normalerweise nicht statt. Kommt es jedoch in Folge einer unzureichenden Beseitigung apoptotischer Zellen zur Freisetzung von Chromatin-Protein-Komplexen, so können diese von spezifischen B-Zellen aufgenommen werden und intrazellulär an TLR9 binden, wodurch die Autoantikörperbildung in Gang gesetzt wird. In der Folge können sich Immunkomplexe aus Immunglobulin (Ig) und Chromatin bilden, die über Fc-Rezeptoren in Phagozyten gelangen. Dies ermöglicht wiederum die Bindung von Chromatin an TLR9, wodurch es zur Aktivierung der Zielzelle sowie zur Sekretion von Typ I-IFN und pro-inflammatorischen Zytokinen kommt (Barrat et al., 2005; Boule et al., 2004; Means et al., 2005).

TLR	Liganden (PAMPs)	Quelle der Liganden	Referenz
TLR1/TLR2	Triacylierte Lipopeptide	Bakterienzellwand	(Takeuchi et al., 2002)
	Pam_3CSK_4	Synthetisches Analog triacylierter Lipopetide	
TLR2/TLR6	Diacylierte Lipopeptide wie MALP-2 („macrophage activating lipopeptide“, 2 kDa)	Bakterienzellwand, Mykoplasmen	(Aliprantis et al., 1999; Lien et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Takeuchi et al., 2001)
	Pam_2CSK_4	Synthetisches Analog diacylierter Lipopetide	
	Peptidoglykan	Bakterienzellwand	
	Lipoteichonsäure	Zellwand gram-positiver Bakterien	
TLR2/Dectin	Zymosan	Zellwand von Pilzen/Hefen	(Gantner et al., 2003)
TLR3	dsRNA	RNA-Viren	(Alexopoulou et al., 2001)
	poly I:C	Synthetisches Analog von dsRNA	
TLR4	Lipopolysaccharid	Zellwand gram-negativer Bakterien	(Latz et al., 2004; Nishiya et al., 2005; Poltorak et al., 1998)
TLR5	Flagellin	Bakterielle Flagellen	(Hayashi et al., 2001)
TLR7, TLR8	ssRNA	RNA-Viren	(Diebold et al., 2004; Gorden et al., 2005; Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002; Lund et al., 2004)
	einige siRNAs		
	Moleküle der Imidazochinolin-Familie wie Imiquimod (R-837) und Resiquimod (R-848)	Synthetische Moleküle mit antiviraler Aktivität	
TLR9	Hypomethylierte CpG-DNA	Bakterielle, virale DNA	(Hemmi et al., 2000; Krieg, 1996; Krieg et al., 1998a; Krieg et al., 1995)
TLR10	Ligand unbekannt		
TLR11	Unbekannte Komponente	Urpathogene Bakterien	(Plattner et al., 2008; Yarovinsky et al., 2005; Zhang et al., 2004)
	Profilin-ähnliches Protein	Toxoplasma gondii	

Tabelle 1.1: TLR1-11 und Beispiele für ihre Liganden.
TLR1-11 detektieren konservierte molekulare Muster von Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen. Grau unterlegt sind die Nukleinsäure-detektierenden TLRs, die intrazellulär vorliegen.

Körpereigene DNA könnte somit als Auto-Adjuvans wirken (Baccala et al., 2007; Boule et al., 2004; Marshak-Rothstein, 2006). Eine ähnliche Rolle bei der Pathogenese von SLE wurde auch für endogene „small nuclear RNAs“ (snRNAs) vorgeschlagen. Auch diese

werden in Anwesenheit entsprechender Antikörper (AKs) aus SLE-Seren von Phagozyten aufgenommen, wo sie über TLR7/8 stimulatorisch wirken können (Barrat et al., 2005; Marshak-Rothstein, 2006; Martin and Elkon, 2005; Savarese et al., 2006; Vollmer et al., 2005; Wagner, 2006).

Der aktivierende Signalweg, von der Erkennung eines Liganden durch einen TLR bis zur Produktion und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, im Fall der TLRs 3, 4, 7 und 9 auch von Typ I-IFN, sowie der Präsentation ko-stimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche, ist sowohl Zelltyp- als auch TLR-abhängig. Dies ermöglicht eine gezielt auf das aktivierende Pathogen abgestimmte Reaktion der Zelle.

Für die Signaltransduktion der TLRs ist die Bildung von Homo- oder Heterodimeren notwendig (Kawai and Akira, 2006b). TLR2 bildet mit TLR1 und 6 sowie mit CD36 Heterodimere, um zwischen verschiedenen PAMPs zu differenzieren. So sind TLR1/2- und TLR2/6-Heterodimere in der Lage, triacyl- und diacyl-Lipopeptide zu unterscheiden (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002). Ebenso formt TLR10 mit TLR1 und 2 Heterodimere, deren Liganden bislang allerdings noch unbekannt sind. Bei der Erkennung von LPS kooperiert TLR4 mit den extrazellulären Komponenten MD2 und CD14.

Nach Ligand-Bindung und Dimerisierung ändern die TLRs ihre Konformation, wodurch an die Membran rekrutierte intrazelluläre Adapterproteine mit ihrer TIR-Domäne an jene der TLRs binden können. Bislang wurden fünf solcher Adaptermoleküle beschrieben, die selektiv von den TLRs genutzt werden und somit die Immunantwort mitbeeinflussen: MyD88 (Kawai et al., 1999; Medzhitov et al., 1998), Mal/TIRAP („MyD88 adaptor like“/„TIR domain containing adaptor protein“) (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001), TRIF/TICAM1 („TIR domain containing adaptor protein inducing IFN-β“/„TIR domain containing adaptor molecule 1“) (Hoebe et al., 2003; Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2002b), TRAM/TICAM2 („TRIF related adaptor molecule“/„TIR domain containing adaptor molecule 2“) (Fitzgerald et al., 2003b; Yamamoto et al., 2003b) und SARM („sterile alpha and armadillo-motif-containing protein“) (Carty et al., 2006).

TLR4 bindet sowohl MyD88, das die gleichzeitige Bindung von Mal/TIRAP erfordert (Yamamoto et al., 2002a), als auch TRIF, das gemeinsam mit TRAM rekrutiert werden muss (Fitzgerald et al., 2003b). So werden bei TLR4 als einzigem TLR ein MyD88-abhängiger und -unabhängiger (TRIF-abhängiger) Signaltransduktionsweg aktiviert (Yamamoto et al., 2003a).

Bei den meisten anderen TLRs, darunter TLR7, 8 und 9, kommt es jedoch nur zu einer MyD88-abhängigen Signaltransduktion (Kawai et al., 1999; Takeuchi et al., 2000), wobei der Ko-Adapter im Falle der intrazellulären TLRs nicht benötigt wird. MyD88 weist eine TIR-Domäne sowie eine N-terminale „Death“-Domäne auf (Hemmi et al., 2002; Kawai et

al., 1999). Nach Stimulation eines TLRs assoziiert MyD88 mit dessen TIR-Domäne und rekrutiert durch Interaktionen mit der N-terminalen Region von MyD88 Signalmoleküle wie IRAK1/2/4 („interleukine-1 receptor associated kinase“), TRAF3/6 („TNF-receptor associated-factor“) und Osteopontin, wobei erst die Phosphorylierung von IRAK1/2 die Rekrutierung und Aktivierung von TRAF6 ermöglicht (Gohda et al., 2004; Janssens and Beyaert, 2003; Kawagoe et al., 2007; Kawagoe et al., 2008; Kim et al., 2007; Oganesyan et al., 2006; Shinohara et al., 2006; Swantek et al., 2000; Uematsu et al., 2005).

An dieser Stelle teilt sich die Signalkaskade in den IRF- und den NF-κB („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“)-aktivierenden Signalweg auf. IRFs sind neben Transkriptionsfaktoren wie NF-κB und AP-1 („activator protein 1“) essentiell für die Induktion von Typ I-IFN und IFN-abhängigen Genen (Hacker et al., 2006; Oganesyan et al., 2006). In PDCs, die von allen Immunzellen die höchste TLR7- und 9-Expression aufweisen und die Hauptproduzenten von Typ I-IFN darstellen, wird IRF7 konstitutiv exprimiert (Colonna et al., 2004), wohingegen in konventionellen DCs die IFN-α-Produktion vor allem durch die MyD88-abhängige Aktivierung von IRF1 und 5 bestimmt wird (Kawai and Akira, 2006a). Vom Signalkomplex rekrutiertes IRF7 kann entweder direkt mit IRAK1 interagieren, wobei er an spezifischen C-terminalen Serinresten phosphoryliert wird, oder wird durch die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von TRAF6 aktiviert (Honda et al., 2004; Kawai et al., 2004; Uematsu and Akira, 2007). Auch IκB-Kinase-Komplex (IKK)α-Kinasen sind an der Phosphorylierung von IRF7 beteiligt (Hoshino et al., 2006). Darüber hinaus scheint der „phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)-mammalian target of rapamycin“ (mTOR)-vermittelte Signalweg in der MyD88-abhängigen Aktivierung von IRF7 involviert zu sein (Cao et al., 2008; Guiducci et al., 2008). Der phosphorylierte IRF7 gelangt nach Bildung eines Homodimers in den Zellkern, wo er die Produktion von Typ I-IFN induziert.

Für die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF-α ist die Aktivierung von IκB („inhibitor of NF-κB“) erforderlich. Der IRAK1/TRAF6-Komplex dissoziiert vom Rezeptor und assoziiert mit der „transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1“ (TAK1) sowie den TAK1 bindenden Proteinen TAB1 und TAB2 an der Membran (Kawai and Akira, 2007; Wang et al., 2001). Während IRAK1 an der Membran verbleibt und degradiert wird, gelangt der Komplex aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 ins Zytoplasma und bindet dort den als E2-Ligase wirkenden, dimeren Ubiquitin-konjugierenden Enzymkomplex aus Ubc13 und Uev1A, der zur Aktivierung des IKK notwendig ist (Deng et al., 2000). IKK setzt sich aus den katalytischen IKKα- und β-Kinasen und dem regulatorischen Protein NEMO („NF-κB essential modulator“, IKKγ) zusammen. Durch die Rekrutierung von TAK1 werden zwei verschiedene Signalwege

initiiert. Zum einen wird IKK aktiviert (Adhikari et al., 2007; Yamamoto et al., 2006). Dadurch werden an NF-κB gebundene inhibitorische Moleküle (IκB) phosphoryliert, die im unstimulierten Zustand die nukleäre Translokation und/oder die DNA-Bindung von NF-κB verhindern. Infolge der Phosphorylierung dissoziieren diese Inhibitoren ab, werden ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, so dass das p65 (RelA):p50 NF-κB-Dimer in den Zellkern translokalisieren kann und eine NF-κB-abhängige Transkription der für pro-inflammatorische Zytokine kodierenden Gene möglich wird. Zum anderen wird über TAK1 die Signalkaskade der MAP-Kinasen („mitogen activated protein kinases“, MAPKs) aktiviert (Wang et al., 2001), an deren Ende die Phosphorylierung der MAPKs ERK („extracellullar signal-related kinase“), JNK („Jun N-terminal kinase“) und p38 („p38 mitogen-activated protein-kinase“) steht. Sie aktivieren wiederum über Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren wie AP-1, das sich aus ATF2 („activating transcription factor 2“) und c-Jun zusammensetzt, und regulieren so die Produktion inflammatorischer Zytokine mit.

TLR3 agiert als einziger TLR ausschließlich über TRIF (O'Neill and Bowie, 2007; Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2003a; Yamamoto et al., 2002b), wobei der TRIF-abhängige Signalweg von TLR3 und 4 durch direkte Bindung des Adaptermoleküls SARM an TRIF negativ reguliert wird (Carty et al., 2006). TRIF interagiert direkt mit TLR3 über homotypische TIR-TIR-Interaktion und rekrutiert ähnlich dem MyD88-vermittelten Signalweg eine Reihe von Signalmolekülen, darunter TRAF3/6, RIP1 („receptor interacting protein 1“) und TAK1, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, IRF3 und IRF7 führen. Der TLR3/TRIF-Komplex assoziiert zunächst mit TRAF3 und NAP1 („NF-κB-activating kinase (NAK)-associated protein 1“) (Hacker et al., 2006; Oganesyan et al., 2006; Sasai et al., 2005) und aktiviert infolgedessen die als nichtkanonischen IKKs bekannten Moleküle „TRAF-family member associated NF-κB activator (TANK)-binding kinase 1“ (TBK1 bzw. NAK) und IKKi (IKKε), die C-terminale Serinreste von IRF3 und 7 phosphorylieren (Fitzgerald et al., 2003a; Hemmi et al., 2004; McWhirter et al., 2004; Perry et al., 2004; Sharma et al., 2003). Phosphoryliertes IRF3 und 7 dimerisieren und tranlokalisieren in den Zellkern. Dort interagieren sie mit dem transkriptionellen Ko-Aktivator p300/„CREB-binding protein“ (CBP), über den sie an die DNA binden und die Expression von IFN-β induzieren. Auch TRAF6 und RIP1 werden im TLR3/TRIF-Komplex aktiviert (Cusson-Hermance et al., 2005; Sato et al., 2003). Sie aktivieren wiederum TAK1, was zur Aktivierung sowohl von NF-κB als auch des MAP-Kinase-Signalwegs führt.

1.2.2 Die RIG-like Rezeptoren (RLRs) RIG-I, MDA-5 und LGP2

Ebenfalls zur Familie der PRRs gehören die so genannten RIG-like Rezeptoren („RIG-like receptors“, RLRs). Im Gegensatz zu den TLRs sind die RLRs ausschließlich im Zytosol lokalisiert und erkennen virale RNA (Yoneyama et al., 2004). Da die RLR-Gene nur im Genom höherer Vertebraten vorkommen, ist davon auszugehen, dass sich die RLRs im Laufe der Evolution zu spezialisierten Rezeptoren des Typ I-IFN-Systems entwickelt haben (Sarkar et al., 2008). Die Expression der RLRs beschränkt sich nicht nur auf Immunzellen (Kang et al., 2004), sondern sie werden beinahe ubiquitär exprimiert und sind somit für die Beseitigung von Viren mit Hilfe der antiviral wirkenden IFNs essentiell. Zu den RLRs zählen RIG-I („retinoic acid inducible gene I“) und MDA-5 („melanoma differentiation associated gene 5“), die beide eine TLR-unabhängige IFN-α/β-Induktion durch aktiv replizierende RNA-Viren und synthetische RNA vermitteln, sowie LGP2 („laboratory of genetics and physiology 2“) (Yoneyama and Fujita, 2009).
Allen drei RLRs ist eine DExD/H-Box RNA-Helikase-Domäne mit RNA-abhängiger ATPase Aktivität gemeinsam. RIG-I und MDA-5 weisen zudem beide N-terminal zwei Caspase-Rekrutierungsdomänen („caspase recruitment domains“, CARDs) auf, die essentiell für die Signaltransduktion sind. Diese fehlen LGP2. Über die CARDs bilden RIG-I und MDA-5 eine homotypische Interaktion mit der N-terminalen CARD-Domäne ihres Signaladaptermoleküls „IFN-β promoter stimulator 1“ (IPS-1) aus, das C-terminal an der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist. IPS-1 wird in der Literatur auch „mitochondrial antiviral signalling protein“ (MAVS), „virus-induced signalling adaptor“ (VISA) und „CARD adaptor inducing IFN-β“ (CARDif) genannt (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Eine weitere funktionale Domäne der RLRs ist die C-terminale Domäne (CTD), die auch als Repressor-Domäne (RD) bezeichnet wird (Saito et al., 2007; Takahasi et al., 2008). Die CTD/RD von RIG-I und LGP2 hat zwei Funktionen, einerseits dient sie der Hemmung der RIG-I-Aktivität in Abwesenheit viraler Infektionen, andererseits der Detektion von RNA-Liganden (Cui et al., 2008; Takahasi et al., 2008). So induziert die Erkennung von RNA durch die CTD eine Konformationsänderung von RIG-I, die es den N-terminalen CARDs ermöglicht, mit der CARD von IPS-1 zu interagieren (Kumar et al., 2006; Sun et al., 2006). Zur Aktivierung von RIG-I ist zudem Adenosintriphosphat (ATP) notwendig (Yoneyama et al., 2004), wobei es für die Bindung von RNA entbehrlich zu sein scheint (Takahasi et al., 2008). Im Gegensatz zu RIG-I und LGP-2 fehlt MDA-5 die RD. Daher wird MDA-5 in gesunden Zellen durch die Dihydroacetonkinase negativ reguliert (Diao et al., 2007). Ansonsten ist die MDA-5-vermittelte Signaltransduktion weitestgehend identisch mit der von RIG-I,

obwohl noch unklar ist, wie die offen strukturierte CTD von MDA-5 dsRNA bindet (Li et al., 2009a; Takahasi et al., 2009).

Die Bildung des RIG-I bzw. MDA-5/IPS-1-Komplexes an der äußeren Mitochondrienmembran sowie die Aktivierung einer C-terminalen katalytischen Domäne von IPS-1 führt zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle und zur Initiation einer Signalkaskade, die in der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Typ I-IFN endet (Abbildung 1.1).

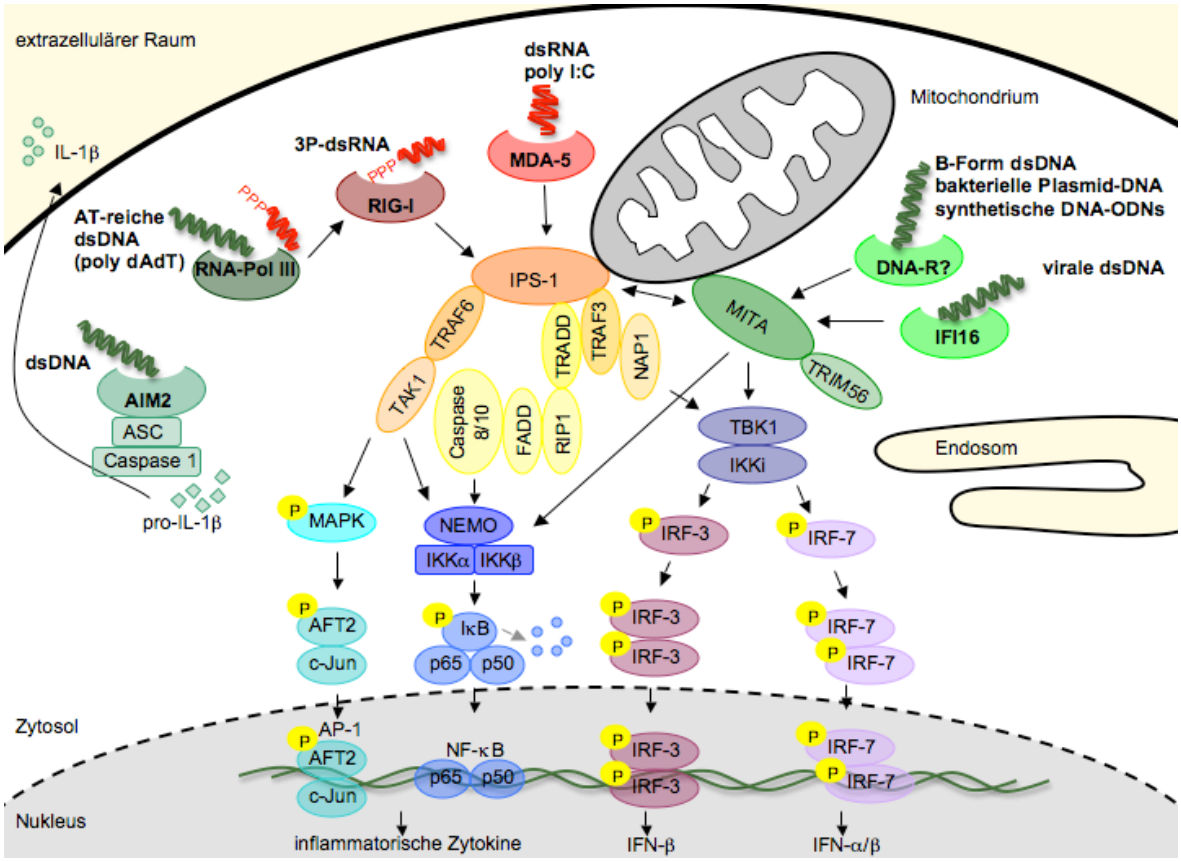


Abbildung 1.1: TLR-unabhängige Signalwege der IFN-α/β-Induktion.

Die Aktivierung der zytosolischen Helikasen RIG-I (z.B. durch 3-P-RNA) und MDA-5 (z.B. durch poly I:C) führt zu Konformationsänderungen, die eine CARD-vermittelte homotypische Interaktion zwischen RIG-I/MDA-5 und dem mitochondrialen Adaptermolekül IPS-1 ermöglichen. Über TBK1/IKKi, IKKα/β/γ und die MAPKs wird die Translokation von IRF3/7, NF-κB und AP-1 in den Zellkern sowie die Transkription Typ I-IFN kodierender Gene induziert. Auch die Detektion von dsDNA über zytosolische DNA-Sensoren, darunter IFI16, vermittelt die Aktivierung von TBK1/IKKi und IKKα/β/γ, die Translokation von IRF3 und NF-κB sowie die Expression von IFN-α/β. AT-reiche dsDNA (poly dAdT) im Zytosol humaner monozytärer Zellen wird von der RNA-Polymerase III erkannt und in 3-P-RNA transkribiert, die über den RIG-I-Signalweg IFN-α/β induziert. Darüber hinaus kann zytosolische dsDNA auch von AIM2 detektiert werden, was zur Bildung des Caspase 1-aktivierenden AIM2-Inflammasoms und letztlich zur Sekretion von IL-1β führt. Die IFN-α/β-Induktion wird dadurch aber nicht beeinträchtigt.

Zusammen mit TRAF3, TRADD („tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein“) und NAP1 vermittelt IPS-1 die Aktivierung von TBK1 und IKKi (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006; Xu et al., 2005). Diese wiederum phosphorylieren und aktivieren IRF3 und 7, die daraufhin in den Zellkern translokalisieren und die Transkription Typ I-IFN kodierender Gene einleiten, wobei sowohl RIG-I als auch MDA-5 durch das IFN-α/β über einen positiven Rückkopplungsmechanismus zusätzlich aufreguliert werden. Darüber hinaus vermittelt IPS-1 über TRAF6 und TAK1 die Aktivierung des IKK sowie der MAP-Kinasen JNK und p38, die wiederum die Transkriptionsfaktoren ATF2 und c-Jun aktivieren (Yoshida et al., 2008). IKK wird außerdem durch Assoziation von IPS-1 mit FADD („FAS-associated death domain“), TRADD, RIP1 sowie den Caspasen 8 und 10 aktiviert (Balachandran et al., 2004; Michallet et al., 2008; Takahashi et al., 2006). Dies führt zur Phosphorylierung von IκB. IκB wird polyubiquitiniert und degradiert, so dass NF-κB in den Nucleus translokalisieren kann, um die Transkription von Genen zu aktivieren, die für pro-inflammatorische Zytokine kodieren.

Der RIG-I/MDA-5-vermittelte Signalweg scheint vor allem für die IFN-α/β-Produktion in Fibroblasten, konventionellen DCs und Makrophagen von Bedeutung zu sein und weniger in PDCs, die über die TLR-Signalwege agieren.

RIG-I und MDA-5 differieren im Bezug auf ihre Liganden. Als nicht viraler Ligand für RIG-I wurde zunächst *in vitro*-transkribierte RNA beschrieben (Kato et al., 2006), bis Hornung sowie Pichlemair und Kollegen 2006 publizierten, dass das 5’-Triphosphat von *in vitro*-transkribierter RNA (3-P-RNA) bzw. durch virale Polymerasen generiertes 5’-Triphosphat am Ende einer RNA für die RIG-I-vermittelte Erkennung von RNA-Molekülen verantwortlich ist (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). So erkennt RIG-I vor allem Negativ-ss-Viren z.B. Sendai-Virus und Newcastle-Disease-Virus aus der Familie der Paramyxoviren, Orthomyxoviren wie Influenza-A-Virus und Rhabdoviren wie Vesicular-Stomatitis-Virus (Kato et al., 2006), die bereits vor oder während der Replikationsphase eine 5’-Triphosphatstruktur in ihrem RNA-Genom aufweisen. Weil das 5’-Ende von Picornaviren hingegen durch das kovalent gebundene virale Protein Vpg geschützt ist (Paul et al., 2003), kann es nicht von RIG-I detektiert werden.

Die Erkennung von RNA durch RIG-I endet durch Abtrennen des 5’-Triphosphatrestes oder durch Nukleosidmodifikationen, wie es bei posttranskriptionellen RNA-Prozessen bei Eukaryoten vorkommt (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). So verlieren die meisten endogenen RNAs ihre 5’-Triphosphatgruppe während der Maturation bzw. werden mit einem 5’-Methylguanosin-„Cap“ versehen, bevor sie den Zellkern verlassen (Shatkin and Manley, 2000). Auch durch interne Modifikationen wie Pseudouridin, 2-Thio-Uridin und 2’-O-Methyl-Uridin wird die Erkennung von 5’-Triphosphat-RNA verhindert

(Hornung et al., 2006). Dieses spezifische Erkennungsmuster ermöglicht es RIG-I, zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu differenzieren. Es wurde jedoch beschrieben, dass auch „small self-RNA“, die durch 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS)-induzierte RNase L generiert wurde, eine IFN-Produktion ohne virale Infektion induzieren kann (Malathi et al., 2007). Takahasi und Kollegen zeigten 2008, dass auch kurze dsRNA (< 1 kb) unabhängig von ihrer Sequenz und einem 5’-Triphosphat als Ligand für RIG-I fungieren kann (Takahasi et al., 2008). Schlee und Kollegen publizierten 2009, dass weder das 5’-Triphosphat noch die Struktur der dsRNA für die Aktivierung von RIG-I ausreicht, sondern dass es dafür einer so genannten „panhandle“-Struktur bedarf, die durch Basenpaarung der 5’- und 3’-Region des viralen Genoms ausgebildet wird (Schlee et al., 2009; Schmidt et al., 2009).

Im Gegensatz zu RIG-I erkennt MDA-5 Picorna-Viren, darunter Encephalomyocarditis-Virus, Theiler’s-Virus und Mengo-Virus (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006), darüber hinaus murines Norovirus-1 aus der Familie der Calci-Viren, murines Hepatitis-Virus, das zu der Familie der Corona-Viren zählt, sowie lange Segmente des Reovirus (Kato et al., 2008; McCartney et al., 2008; Roth-Cross et al., 2008). An der Erkennung von Flavi-Viren wie West-Nile-Virus und Dengue-Virus sind hingegen sowohl RIG-I als auch MDA-5 beteiligt (Fredericksen et al., 2008; Loo et al., 2008). Weil Picorna-Viren während ihres Replikationszyklus in infizierten Zellen lange dsRNA generieren (Weber et al., 2006), wurde vermutet, dass die dsRNA-Struktur einen spezifischen Liganden für MDA-5 darstellt. Kato und Kollegen konnten allerdings zeigen, dass relativ langes poly I:C (> 1 kb) zwar selektiv von MDA-5 erkannt wird, wird poly I:C jedoch enzymatisch in kürzere Fragmente verdaut (< 1 kb), nimmt die MDA-5-abhängige Aktivität proportional zur Länge ab und die kürzeren poly I:C-Fragmente werden unabhängig von einem 5’-Triphosphat von RIG-I erkannt (Kato et al., 2008). Die natürliche RNA-Struktur, die MDA-5 aktiviert, konnte bislang noch nicht identifiziert werden.

Während RIG-I und MDA-5 als positive Regulatoren antiviraler angeborener Immunität gelten, ist die Funktion von LGP2 unklar, da eine Analyse LGP2-defizienter Mäuse zeigte, dass sich LGP2 sowohl negativ als auch positiv auf die gegen Encephalomyocarditis-Virus- und Vesicular-Stomatitis-Virus-Infektionen gerichtete Immunantwort auswirken kann (Venkataraman et al., 2007). Weitere *in vitro*- und *in vivo*-Experimente untermauerten jedoch die inhibitorische Rolle von LGP2 bei der Erkennung viraler RNA durch RIG-I (Komuro and Horvath, 2006; Rothenfusser et al., 2005; Yoneyama et al., 2005). Dass LGP2 aufgrund einer ähnlichen RNA-Bindungsoberfläche in der Lage ist, RIG-I-Liganden wie kurze dsRNA mit höherer Affinität zu binden als RIG-I (Li et al., 2009b; Pippig et al., 2009; Takahasi et al., 2009), scheint dafür allerdings nicht ursächlich zu sein, da eine LGP2-Mutante, die keine RNA binden konnte, die RIG-I-Aktivität immer

noch unterdrückte (Li et al., 2009b). Möglicherweise wird RIG-I durch eine direkte Interaktion mit der RD von LGP2 in seiner Aktivität inhibiert (Saito et al., 2007). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass LGP2 auch direkt mit IPS-1 interagieren kann und mit IKKi um die Bindung an IPS-1 konkurriert (Komuro and Horvath, 2006), was ebenfalls die RIG-I-vermittelte Signalkaskade blockieren würde. Die negative Rückkopplung durch LGP2, dessen Expression durch die Typ I-IFN Produktion nach Aktivierung von RIG-I und MDA-5 ansteigt, verhindert so pathologische Konditionen aufgrund überhöhter Zytokinproduktion als Antwort auf eine Virusinfektion.

1.2.3 Zytoplasmatische DNA-Sensoren

DNA viralen und bakteriellen Ursprungs sowie von beschädigten oder der Apoptose entgangenen körpereigenen Zellen aktiviert das angeborene Immunsystem (Hornung and Latz, 2010; Ishii and Akira, 2006; Nagata et al., 2010; Yanai et al., 2009). Obgleich TLR9 CpG-DNA von Viren und Bakterien im Endolysosom detektiert, gibt es klare Hinweise darauf, dass auch dsDNA, die ins Zytoplasma von Zellen gelangt, von einem oder mehreren zytosolischen DNA-Rezeptoren erkannt wird (Ishii et al., 2006; Stetson and Medzhitov, 2006a; Yoshida et al., 2005). Bakterielle Plasmide, synthetische Oligonukleotiddoppelstränge, das Dinukleotidmultimer poly dAdT („polydeoxyadenylic-polydeoxythymidilic acid sodium salt“) und ds B-Form DNA induzieren infolgedessen die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Typ I-IFNs (Ishii et al., 2006; Stetson and Medzhitov, 2006a) (Abbildung 1.1).

Die Signalkaskade, die laut Ishii und Kollegen durch Detektion zytoplasmatischer dsDNA der B-Form, aber nicht Z-Form, initiiert wird, umfasst die Aktivierung von IRF3 via TBK1 und IKKi sowie eine davon unabhängige Aktivierung von NF-κB (Ishii et al., 2006). In beide Signalwege ist das Adaptermolekül IPS-1 involviert, aber weder TLRs noch RIG-I (Ishii et al., 2006).

Ishikawa und Kollegen zeigten, dass STING („stimulator of interferon genes“), auch MITA („mediator of IRF-3 activation“) genannt, die IFN-α-Induktion, die durch intrazelluläre DNA-Spezies ohne CpG-Motive ausgelöst wird, reguliert (Ishikawa et al., 2009). Zellen von STING-defizienten Mäusen waren daher nicht in der Lage, eine Typ I-IFN-Produktion als Antwort auf dsDNA bzw. eine Infektion mit HSV-1 oder *Listeria monocytogenes*, die DNA ins Zytoplasma der infizierten Zelle freisetzen, zu induzieren (Ishikawa et al., 2009). Auch STING-defiziente Mäuse waren anfällig gegenüber HSV-1-Infektionen (Ishikawa et al., 2009). Darüber hinaus zeigten diese Tiere eine deutliche Reduktion der zytotoxischen

T-Zell-Antwort nach Vakzinierung mit Plasmid-DNA (Ishikawa et al., 2009). Als Antwort auf eine Stimulation mit dsDNA interagiert STING mit IPS-1 und wird zu punktförmigen Strukturen relokalisiert, wohin auch TBK1 rekrutiert wird (Ishikawa and Barber, 2008; Saitoh et al., 2009; Zhong et al., 2008). Wahrscheinlich induziert diese Rekrutierung eine gleichzeitige Aktivierung von TBK1, was zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und zur Transkription von Typ I-IFN-Genen führt.

Tsuchida und Kollegen identifizierten 2010 außerdem die Ubiquitin-Ligase TRIM56 („interferon-inducible tripartite-motif 56“) als Regulator der durch zytosolische dsDNA-vermittelten Typ I-IFN-Induktion (Tsuchida et al., 2010). TRIM56 interagiert mit STING und fördert dessen Ubiquitinierung, wobei die daraus resultierende Dimerisierung von STING erst die Rekrutierung von TBK1 und die Typ I-IFN-Induktion ermöglicht (Tsuchida et al., 2010).

Von Takaoka und Kollegen wurde 2007 „DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors“ (DAI), auch „Z-DNA binding protein 1“ (ZBP1) oder DLM-1 genannt, als möglicher Kandidat für einen zytosolischen DNA-Rezeptor identifiziert (Takaoka et al., 2007). Sie zeigten, dass DAI zytosolische dsDNA bindet und dass eine Expression von DAI in murinen Fibroblasten die DNA-abhängige Induktion von Typ I-IFN erheblich steigert (Takaoka et al., 2007). Es konnte eine direkte Interaktion von DAI mit TBK1 und IRF3 sowie eine Aktivierung von IRF3 als Antwort auf ds B-Form DNA nachgewiesen werden (Takaoka et al., 2007). Darüber hinaus zeigten Rebsamen und Kollegen eine Beteiligung von RIP1 und 3 an der DAI-vermittelten Aktivierung von NF-κB (Kaiser et al., 2008; Rebsamen et al., 2009). Dass DAI der einzige DNA-Sensor im Zytosol von Zellen ist, konnte jedoch durch die Generierung von ZBP1-defizienten Mäusen widerlegt werden (Ishii et al., 2008). In DAI-defizienten Mäusen konnte kein Phänotyp beobachtet werden, da die DNA-induzierte IFN-Produktion nicht signifikant niedriger ausfiel (Ishii et al., 2008).

2009 beschrieben Ablasser sowie Chiu und Kollegen, dass synthetische AT-reiche dsDNA (poly dAdT) stattdessen von der RNA-Polymerase (Pol) III im Zytosol humaner monozytärer Zellen transkribiert wird und die daraus resultierende 5’-Triphosphat-enthaltende dsRNA von RIG-I erkannt wird (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009). Demnach kann der Pol III-RIG-I-vermittelte Signalweg bei einer Infektion mit Adenovirus, HSV und Epstein-Barr-Virus induziert werden.

Darüber hinaus wurde 2009 AIM2 („absent in melanoma 2“) als Sensor von zytosolischer dsDNA identifiziert (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009). Nach Bindung von dsDNA rekrutiert und aktiviert AIM2 Caspase 1, woraufhin unter Beteiligung von ASC („apoptosis-associated speck-like protein“) das AIM2-Inflammasom gebildet wird, das die Spaltung von pro-IL-1β zu IL-1β

und dessen Sekretion vermittelt. Allerdings ist AIM2 für die IFN-Induktion durch zytosolische dsDNA nicht von Bedeutung.
2010 wurde IFI16 („interferon-inducible protein 16“) (Trapani et al., 1992) bzw. sein Mausortholog p204 (Choubey et al., 1989) von Unterholzner und Kollegen als weiterer intrazellulärer DNA-Sensor identifiziert, der die Induktion von IFN-β vermittelt (Unterholzner et al., 2010). Laut Unterholzner und Kollegen bindet IFI16 direkt an IFN-β-induzierende virale DNA-Motive. Infolgedessen wird STING rekrutiert und über die Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF-κB wird die Produktion von IFN-β veranlasst. Welche Eigenschaften bzw. welches Erkennungsmuster virale dsDNA zur Interaktion mit IFI16 besitzen muss und wie IFI16 stimuliert wird, um MITA zu rekrutieren, konnten sie nicht beantworten.
Es ist sehr wahrscheinlich, dass neben den bereits identifizierten DNA-Sensoren noch weitere existieren. Auch ein Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren für die Erkennung von zytosolischer dsDNA wäre möglich.

1.3 Das Typ I-Interferon (IFN)-System

Typ I-Interferon (IFN) wurde vor mehr als 50 Jahren als antivirales Zytokin identifiziert, das von Virus infizierten Zellen sekretiert wird (Isaacs and Lindenmann, 1957; Nagano and Kojima, 1954). Nach heutigem Kenntnisstand besteht die Familie der Typ I-IFNs, deren Gene nur im Genom von höheren Vertebraten vorkommen, im Gegensatz zum IFN-γ und -λ als einzigem Typ II- bzw. Typ III-IFN aus einer Vielzahl an Mitgliedern, die strukturell untereinander, jedoch nicht mit dem IFN-γ und dem IFN-λ verwandt sind. Im humanen System wurden bislang vier verschiedene Proteingruppen der Typ I-IFNs charakterisiert: IFN-α, -β, -κ und -ω (Roberts et al., 1998). In der Klasse der Mammalia wurden darüber hinaus noch weitere Typ I-IFNs identifiziert. Dazu zählt das nur innerhalb der Unterordnung Ruminantia verbreitete IFN-τ oder das IFN-δ, welches bisher nur in Schweinen und Pferden nachgewiesen werden konnte (Lefevre et al., 1998; Roberts et al., 1998). Trotz dieser Vielfalt sind das IFN-α und -β die wesentlichen Mediatoren bei der Etablierung einer antiviralen Aktivität des Immunsystems und immunologisch am relevantesten.
Während in der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Säugetierarten für das IFN-β nur je ein Genlocus nachgewiesen wurde, setzt sich das IFN-α aus einer Multigen-Familie von mehr als zehn Isoform-Genen zusammen, die in einem Gencluster angeordnet sind

(Roberts et al., 1998). Die Aktivierung der IFN-β-Gene wird über die Transkriptionsfaktoren ATF2/c-jun, NF-κB und IRFs durch Bindung spezifischer Motive in der IFN-β-Promoterregion, die „positive regulatory domain“ (PRD) IV, PRDII bzw. PRDI/III, reguliert (Du and Maniatis, 1992; Fujita et al., 1989; Lenardo et al., 1989; Miyamoto et al., 1988). Diese Aktivatoren bilden ein so genanntes „Enhanceosom“ und aktivieren gemeinsam die Transkription der IFN-β-Gene (Carey, 1998). Der Promoter der IFN-α-Gene beinhaltet hingegen nur PRDI/III-ähnliche Motive (Ryals et al., 1985). Dies macht IRFs für die Aktivierung aller Typ I-IFN-Gene notwendig, wobei unter den neun identifizierten Mitgliedern der IRF-Familie (IRF1-9) vor allem IRF3 und 7 eine tragende Rolle bei der Aktivierung von IFN-α/β spielen (Honda et al., 2005b; Sato et al., 2000).

Die biologische Aktivität des Typ I-IFN wird durch die Bindung an den gemeinsamen transmembranen Typ I-IFN-Rezeptor (IFNAR), der aus den Untereinheiten IFNAR1 und 2 besteht (Uze et al., 2007), sowie den infolgedessen aktivierten Jak (Janus Kinase)-Stat („signal transducer and activator of transcription“)-Signalweg vermittelt (Schindler et al., 2007). Stat1 und Stat2 werden durch die Jak-Kinasen Jak1 und Tyk2 (Tyrosin Kinase 2) an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert. Daraufhin wird ein „IFN-stimulated gene factor 3“ (ISGF3)-Komplex gebildet, der sich aus Stat1, Stat2 sowie dem DNA-bindenden IRF9 zusammensetzt und in den Zellkern translokalisiert. Dort bindet der ISGF3-Komplex an bestimmte Nukleotidsequenzen, die so genannten „IFN-stimulated response elements“ (ISREs), in den Promoterregionen von „IFN-stimulated genes“ (ISGs) (Leonard and O'Shea, 1998). ISREs sind an der Induktion von über 300 ISGs beteiligt, die eine Vielfalt von biologischen Funktionen zelltypspezifisch regulieren (Der et al., 1998), darunter die Gene für PKR („dsRNA-dependent protein kinase“) (Kerr et al., 1977; Meurs et al., 1990), OAS (Marie et al., 1990; Sadler and Williams, 2008), ADAR („RNA-specific adenosine deaminase“) (Patterson and Samuel, 1995) sowie Mx („myxovirus resistance GTPase“) (Kochs and Haller, 1999), die als Regulatoren der antiviralen Abwehr dienen (Sadler and Williams, 2008).

Eine Hauptwirkung der Typ I-IFNs, die in erster Linie von Immunzellen wie DCs und Makrophagen sekretiert werden, besteht in der Aktivierung von DCs und der Aufregulation von MHC und ko-stimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86) auf deren Zelloberfläche, wodurch eine effiziente Antigenpräsentation ermöglicht wird (Baccala et al., 2007). Zudem fördern Typ I-IFNs das Überleben der DCs. Die aktivierten DCs produzieren wiederum Zytokine wie BAFF („B cell activating factor of the TNF family“), auch Blys („B lymphocyte stimulator“) genannt, und APRIL, die gemeinsam mit IFN-α/β das Überleben und die Differenzierung von B-Zellen sowie den Klassenwechsel fördern (Baccala et al., 2007). Die Wirkung von Typ I-IFNs auf T-Zellen äußert sich in einer

erhöhten Aktivierung, einem verlängerten Überleben, „Cross-Priming“ sowie einer T_H1-Verschiebung (Baccala et al., 2007; Stetson and Medzhitov, 2006b). Auch NK-Zellen werden durch Typ I-IFNs aktiviert (Stetson and Medzhitov, 2006b).
Neben ihrer zentralen Bedeutung im Rahmen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr scheinen die Typ I-IFNs darüber hinaus in der Entwicklung von Autoimmunantworten eine wichtige Rolle zu spielen. So sind in Patienten mit LE die IFN-α-Mengen im Serum und in den betroffenen Geweben während aktiver Krankheitsphasen deutlich erhöht (Baccala et al., 2007).

1.4 Ultraviolette (UV-) Strahlung

1.4.1 UV-Strahlung und ihre biologische Wirkung auf das Immunsystem der Haut

Ultraviolette (UV-) Strahlung repräsentiert 45 % des gesamten Sonnenlichtspektrums und wird nach ihrer Wellenlänge in den UV-A- (320-400 nm), den UV-B- (295-320 nm) und den UV-C-Bereich (100-295 nm) unterteilt. Aufgrund der Absorption von UV-Strahlung unter 310 nm durch atmosphärischen Sauerstoff sowie die Ozonschicht in der Erdatmosphäre, dringen die energiereiche, kurzwellige UV-C-Strahlung sowie beinahe 90 % der langwelligeren UV-B-Strahlung nicht bis zur Erdoberfläche vor (van der Leun, 2004). Im Zuge der Ozonausdünnung muss jedoch damit gerechnet werden, dass in Zukunft größere Anteile dieser Strahlung bis auf die Erdoberfläche gelangen könnten (Norval, 2006). So konnte für die UV-B-Strahlung bereits eine Korrelation zwischen abnehmendem Ozongehalt in der Stratosphäre und zunehmend höherer UV-B-Strahlung auf der Erde nachgewiesen werden (Seckmeyer et al., 1994). Die langwellige UV-A-Strahlung, die von der Atmosphäre in nur sehr geringem Maße zurückgehalten wird, stellt mit ca. 95 % den prozentual größten Anteil der auf der Erde messbaren UV-Strahlung dar (Maverakis et al., 2010).
Obwohl die UV-Strahlung letztlich nur etwa 6 % der Globalstrahlung ausmacht, besitzt sie aufgrund ihrer Kurzwelligkeit ein enormes energetisches Potenzial. Sie kann Moleküle ionisieren und chemische Reaktionen induzieren (Maverakis et al., 2010). Der Hauptwirkungsort der UV-Strahlung ist die Haut (Kindl and Raab, 1998), die sich von außen nach innen aus der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis, Cutis, Corium)

und der Unterhaut (Subcutis) zusammensetzt, wobei die Eindringtiefe und die Wirkung der UV-Strahlung maßgeblich von deren Wellenlänge abhängen. Die langwelligen UV-A-Strahlen dringen viel tiefer in die Haut ein als UV-B- oder UV-C-Strahlen. Etwa 50 % der UV-A-Strahlung erreicht das Corium und bis zu 1 % die Subcutis. Die UV-B-Strahlen dringen hingegen nur zu 10 % in das Stratum basale, die unterste Schicht der Epidermis, vor. Ihr Hauptanteil wird ebenso wie Strahlung unter 200 nm fast vollständig von der obersten Schicht der Epidermis, dem Stratum corneum, absorbiert (Kindl and Raab, 1998) (Abbildung 1.2).

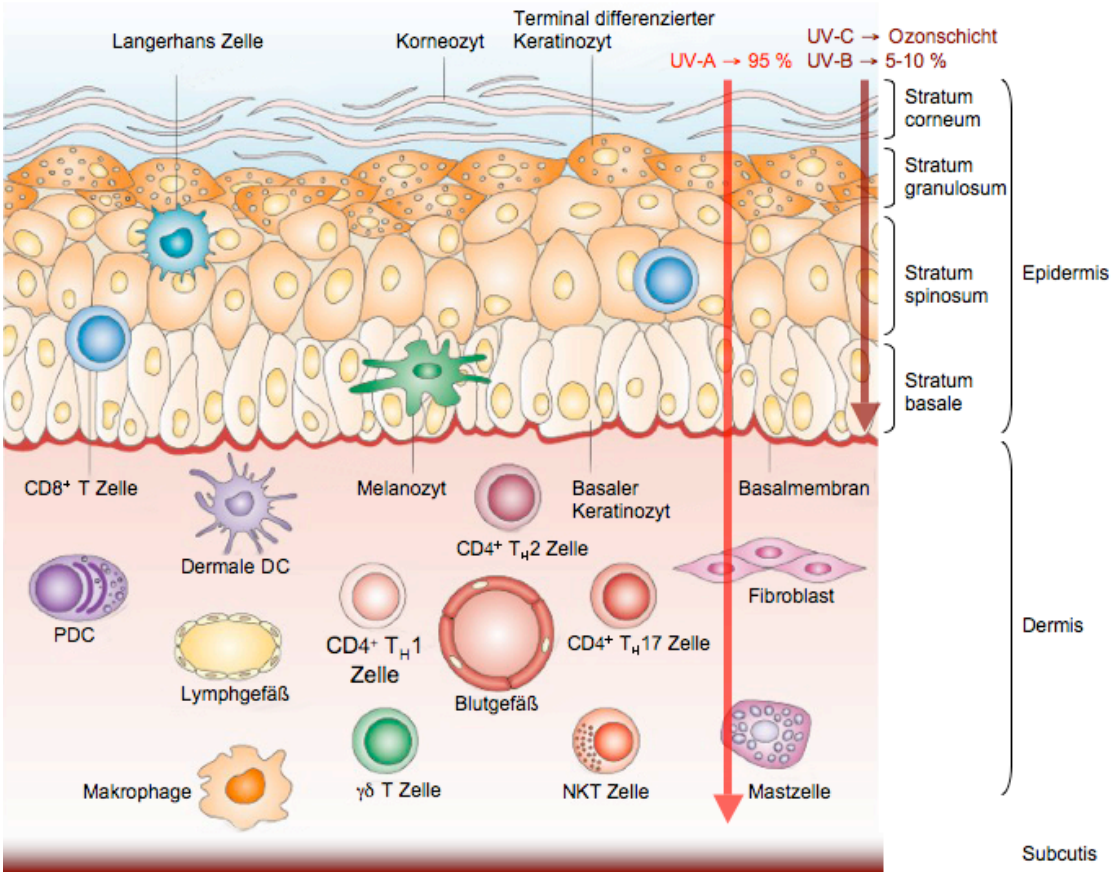


Abbildung 1.2: Eindringvermögen von UV-A-, UV-B- und UV-C-Strahlung in die menschliche Haut. Ca. 90 % der UV-B- und fast die gesamte UV-C-Strahlung werden in der Ozonschicht der Erdatmosphäre absorbiert. UV-A-Strahlen erreichen hingegen zu ca. 95 % die Erdoberfläche. Mit zunehmender Wellenlänge dringen die UV-Strahlen tiefer in die menschliche Haut vor. Auch ihre Wirkung auf die unterschiedlichen in der Haut lokalisierten Zellen wird von ihrer Wellenlänge bestimmt.

Aufgrund ihrer großen Eindringtiefe in die Haut gelten UV-A-Strahlen als Hauptverursacher lichtinduzierter Hautalterung („Photoaging“), die durch irreguläre Pigmentierung, erweiterte Kapillargefäße, übermäßige Verhornung sowie Veränderungen des elastischen Bindegewebes der Dermis charakterisiert ist (Krutmann, 2003). Des Weiteren induziert UV-A-Strahlung eine Sofortpigmentierung („immidiate pigment darkening“), also eine Photooxidation von Melaninvorstufen ohne photoprotektive Wirkung, sowie die Synthese und Freisetzung von Melanin, welches eine auf die Basalzellschicht beschränkte Spätpigmentierung verursacht. Während UV-A-Strahlung erst in höheren Dosen Erytheme auslöst, besitzt UV-B-Strahlung eine 500-1000-fach höhere Erythemwirksamkeit und ist in erster Linie für eine Entzündungsreaktion der Haut mit Rötung, Schwellung, Schmerz und Juckreiz, den so genannten Sonnenbrand (Erythema solare), 6-24 h nach UV-Überdosierung verantwortlich (Spencer and Amonette, 1995). Eine Bestrahlung mit einer UV-B-Dosis, die über der minimalen Erythemdosis liegt, führt histologisch zu charakteristischen phototoxischen Veränderungen an epidermalen Keratinozyten, die bei UV-A-Strahlen hingegen unbeschädigt bleiben (Font et al., 1992). Die Keratinozyten gehen infolge übermäßiger UV-B-Exposition in großer Zahl in Apoptose und werden als „sunburn cells“ bezeichnet (Kerr et al., 1972; Olson and Everett, 1975). Darüber hinaus führen UV-B-Strahlen zu einer Spätpigmentierung der gesamten Epidermis nach 48-72 h. Zu den positiven Effekten der UV-B-Strahlung zählen insbesondere die unter ihrer Einwirkung stattfindende Photoisomerisierung von 7-Dehydrocholesterol und Ergosterol zu den biologisch wirksamen Vorstufen des Vitamin D_2 und D_3 (Maverakis et al., 2010; Schwarz, 2003) sowie ihre Fähigkeit ausgewählte zellvermittelte Immunantworten zu hemmen, z.B. die Autoimmunität gegen UV-B-induzierte Hauttumore, gegen kontaktsensibilisierende Substanzen, gegen Transplantate sowie gegen bestimmte Mikroorganismen (Schwarz, 2003). Andererseits kann eine chronische UV-Exposition insbesondere gegenüber UV-B-Strahlung überaus schädlich für den Organismus sein, da sie sowohl direkt an der DNA als auch indirekt über freie Radikale mutagen wirkt und Hautkrebs induzieren kann (Brash et al., 1991; Cadet et al., 2001; de Gruijl, 1999; Greinert et al., 2003; Ziegler et al., 1993).

UV-C-Strahlung gelangt zwar aufgrund der Filterwirkung der Erdatmosphäre praktisch nicht in die Nähe der Erdoberfläche, aus Untersuchungen mit UV-C-Lampen ist allerdings bekannt, dass sie 6 h nach Exposition an der Haut ein Erythem auslöst, die UV-C-bedingte Hautbräunung ist hingegen gering (Maverakis et al., 2010; Schwarz, 2003). Außerdem führt UV-C- mehr noch als UV-A- und UV-B-Strahlung zu einer konjunktivalen Reizung (Schwarz, 2003).

1.4.2 Direkte und indirekte DNA-Schäden

Die Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut beruht in erster Linie auf der Absorption ihrer Strahlungsenergie durch Biomoleküle und Zellstrukturen. Die wichtigsten Chromophore der Haut sind neben Zellmembranen und Enzymen die aromatischen Basen der DNA. Ihr Absorptionsspektrum liegt im kurzwelligen UV-B/C-Bereich. Die Tatsache, dass das Absorptionsmaximum von DNA bei 260 nm liegt, hat zu einer breiten Nutzung von UV-C-Lampen in Laborstudien geführt (Batista et al., 2009). Durch die aufgenommene Strahlungsenergie werden die Moleküle in einen angeregten Zustand versetzt, der zu einer permanenten chemischen Modifikation des Chromophors, der Entstehung eines so genannten Photoprodukts, führen kann. Das häufigste in der DNA vorkommende UV-Photoprodukt ist das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) (Ley, 1983) (Abbildung 1.3). Es entsteht durch photochemische (2+2)-Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidine, wobei die Bindung zwischen den beiden Pyrimidin-Molekülen an den Positionen C5 und C6 geknüpft wird. Es gibt die Kombinationen Thymin-Thymin (T-T), Thymin-Cytosin (T-C), Cytosin-Thymin (C-T) und Cytosin-Cytosin (C-C), wobei T-T-Dimere in der Natur signifikant häufiger vorkommen als die anderen (Setlow and Carrier, 1966). Besonders gefährdet sind also Regionen auf einem DNA-Strang, in denen sich zwei Thymin-Moleküle in direkter Nachbarschaft befinden, so genannte „hot spots“ (Brash and Haseltine, 1982).

Ein weiteres durch UV-Strahlung induziertes Photoprodukt ist das Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukt (6-4-PP) (Abbildung 1.3), das durch eine Bindung zwischen der C6-Position des 5’-Pyrimidins und der C4-Position des 3’-Pyrimidins entsteht (Rosenstein and Mitchell, 1987). Durch Photoisomerisierung der 6-4-PPs können darüber hinaus durch Absorption langwelligerer Strahlung noch Dewar-Valenz-Isomere gebildet werden (Douki et al., 2003; Perdiz et al., 2000).

Laut Kao und Kollegen entstehen CPDs und 6-4-PPs in einem Verhältnis von 10:1 (Kao et al., 1993), die relativen Raten der Bildung von CPDs und 6-4-PPs variieren jedoch stark und hängen von der spezifischen DNA-Sequenz sowie der Energie und Wellenlänge der UV-Strahlung ab. Während CPDs nach UV-B- und UV-C-Bestrahlung vor allem an T-T-Sequenzen entstehen (Sage, 1993), werden 6-4-PPs bevorzugt nach UV-C-Bestrahlung an T-C-Sequenzen gebildet (Bourre et al., 1987; Douki et al., 1997; Lippke et al., 1981). CPDs und 6-4-PPs bewirken eine Konformationsänderung der DNA-Doppelhelix, die bei unzureichender Reparatur zur Entartung der Zelle führen kann, da diese Läsionen die Replikations- und Transkriptionsmaschinerie blockieren können (Costa et al., 2003).

Unter Einwirkung von UV-Strahlung mit zunehmender Wellenlänge kommt es zu Strangbrüchen und Veränderungen einzelner Basen. Während bei einer Wellenlänge von 254 nm in erster Linie Pyrimidin-Dimere nachweisbar sind, sind bei 365 nm beide Effekte etwa im Gleichgewicht, zwischen 340 und 500 nm überwiegen Einzelstrangbrüche (Peak et al., 1987).

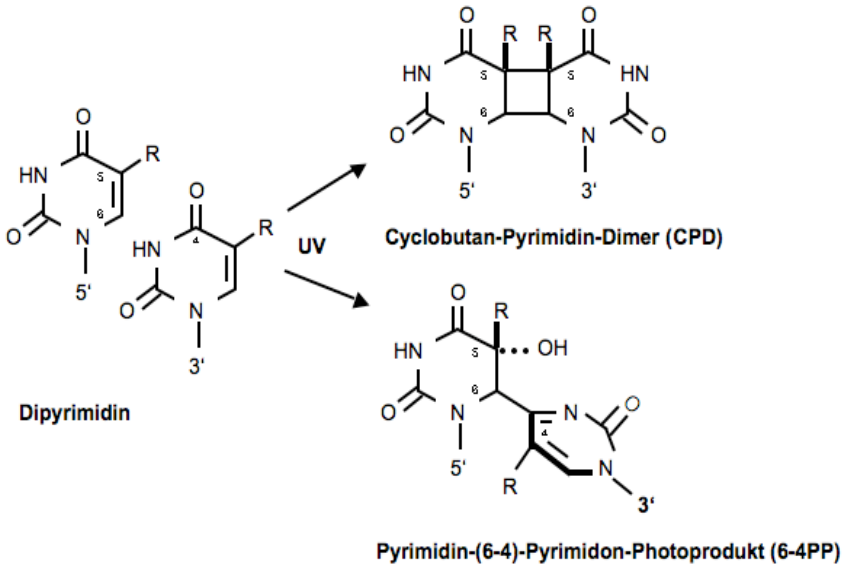


Abbildung 1.3: Struktur UV-modifizierter DNA-Läsionen modifiziert nach (Li et al., 2006).
Durch direkte Absorption von Strahlungsenergie des UV-Lichts wird in der DNA die Bildung von Photoprodukten wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPDs) und (6-4)-Pyrimidon-Photoprodukten (6-4-PPs) aus Dipyrimidinen induziert (R: H oder CH_3).

Ein indirekter Schädigungsmechanismus der DNA läuft über die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS). Dabei wird die Strahlungsenergie nicht von den Pyrimidinen und Purinen in der DNA sondern von einem Photosensibilisator-Molekül absorbiert. Infolgedessen geht es in einen energetisch angeregten Singulettzustand und kann entweder unter Bildung freier Radikale direkt mit dem DNA-Molekül interagieren oder seine Energie auf molekularen Sauerstoff transferieren, wodurch ROS induziert werden (Batista et al., 2009), die mit Biomolekülen wie Lipiden, Proteinen oder der DNA wechselwirken können (Cotgreave, 1996). Bei der Generierung von ROS entsteht initial durch Reduktion molekularen Disauerstoffs das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet -}$), das lediglich eine geringe Reaktivität und Toxizität besitzt. Im nächsten Schritt entsteht durch Dismutation Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Es ist chemisch stabiler als Sauerstoffradikale und kann über größere Strecken diffundieren und sowohl Zell- als auch Organellenmembranen überwinden (Wiseman and Halliwell, 1996).

Wie die Peroxylradikale ($HO_2^{\bullet -}$), die ebenfalls als Vertreter der ROS infolge von UV-Bestrahlung auftreten, reagiert H_2O_2 nicht direkt sondern über Zwischenprodukte mit der DNA (Dizdaroglu et al., 1993; Halliwell and Aruoma, 1991). Seine Hauptreaktivität geht auf die Bildung von sehr kurzlebigen und deshalb sehr reaktiven Hydroxylradikalen ($OH^{\bullet}$) zurück (Halliwell and Aruoma, 1991). Neben H_2O_2 entstehen darüber hinaus noch weitere nichtradikalische Sauerstoffverbindungen, die entweder eine oxidierende Wirkung besitzen und/oder leicht in Radikale konvertiert werden können, z.B. Hypochlorige Säure (HOCl), Ozon (O_3), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$).
Vor allem langwelligere UV-A-Strahlung wirkt über die Bildung von ROS auf die DNA ein. Sie wird von endogenen Chromophoren beispielsweise Flavinen, NADH, 2-Thiouracil oder Porphyrinen absorbiert (Cunningham et al., 1985), wodurch freie Radikale und ROS gebildet werden, die durch Energietransfer an die DNA Strangbrüche und oxidative Basenschäden sowie DNA-Protein-„Crosslinks“ induzieren (Hönigsmann and Dubertret, 1996). Unterschiedliche DNA-Läsionen entstehen, je nachdem ob der Angriff der ROS auf die DNA am Zucker oder an der Base erfolgt. So führt ein Angriff von Hydroxylradikalen in C3-, C4- oder C5-Position z.B. zur Bildung von Strangbrüchen, während durch den Angriff auf die C1-Position ein Lakton gebildet wird (Cadet et al., 1999). Besonders kritische Modifikationen entstehen beim Angriff an der Base, da diese Basenläsionen potentiell mutagen sind. Am häufigsten und auch am besten untersucht ist die Guanosinmodifikation 8-Hydroxy-2’-desoxyguanosin (8-OH-dG) bzw. 8-Oxo-2’-desoxyguanosin (8-oxo-dG) (Floyd et al., 1988; Kasai, 1997; Ravanat et al., 2001) (Abbildung 1.4). Ihr Anteil an der Gesamtheit der auftretenden oxidativen Basenmodifikationen wird auf ca. 5 % geschätzt (Beckman and Ames, 1997; Dizdaroglu, 1992). 8-OH-dG entsteht durch Oxidation des Guanins in 4-, 5- oder 8-Position des Purinrings (Floyd et al., 1988; Kasai, 1997). Bei der Replikation paart es sowohl mit Cytosin als auch fehlerhaft mit Adenin gleichermaßen gut, was zu einer Transversion von G-C zu A-T in der DNA führt (Grollman and Moriya, 1993; Kasai, 1997; Wood et al., 1990). Seine schnelle Beseitigung aus dem Genom ist daher für eine normale Zellentwicklung unerlässlich (Batista et al., 2009).

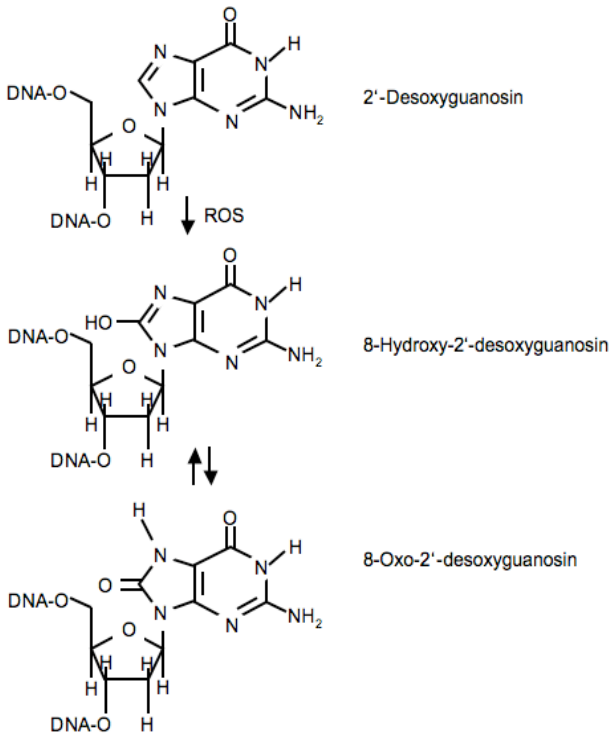


Abbildung 1.4: Struktur des 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosins (8-OH-dG).
Infolge von UV-Strahlung generierte ROS induzieren Modifikationen an den Basen der DNA. Durch Oxidation des 2'-Desoxyguanosins entsteht das mutagene 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OH-dG) bzw. 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (8-oxo-dG).

1.4.3 Wichtige endogene Schutz- und Reparaturmechanismen vor UV-Strahlung

Um sich vor den schädigenden Einflüssen der UV-Strahlung zu schützen und die Integrität der Zellen sowie ihres Genoms zu bewahren, verfügt die menschliche Haut über eine Reihe von Schutzmechanismen.

Melanin, ein UV-absorbierendes Pigment in der Haut, ist beispielsweise in der Lage, UV-Strahlung in harmlose Wärme umzuwandeln (Maverakis et al., 2010). Es wird infolge von UV-Exposititon in Melanozyten gebildet und dann in Keratinozyten transferriert (Maverakis et al., 2010), wobei UV-induzierte CPDs und 6-4-PPs in der DNA anscheinend essentiell für die Initiation dieser Prozesse sind (Eller et al., 1994).

Ebenfalls zu den endogenen photoprotektiven Mechanismen der Haut zählt die so genannte Lichtschwiele. Hierbei handelt es sich um eine Verdickung der Epidermis durch eine Verbreiterung des Stratum spinosum (Akanthose) sowie eine Verdickung der

Hornhaut (Hyperkeratose) aufgrund beschleunigter Zellteilung, die durch wiederholte UV-Exposition ausgelöst wird.

Darüber hinaus dienen antioxidative Enzyme der Photoprotektion, indem sie ROS zu unschädlichen Metaboliten reduzieren. So katalysiert die Superoxid-Dismutase die Reaktion von Superoxidradikalanionen mit Protonen zu Wasserstoffperoxid und Disauerstoff. Die Katalase katalysiert die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Disauerstoff und die Glutathion-Peroxidase sowie die Glutathion-Reductase entgiften organische Peroxide bzw. Wasserstoffperoxid zu Alkoholen und Wasser. Auch Proteine ohne unmittelbare Enzymfunktion wie das Transferrin haben eine antioxidative Funktion, dadurch dass sie Eisen oder Kupfer binden und so ROS generierende Fenton-Reaktionen verhindern (Stocker et al., 1991). Zudem gibt es niedermolekulare nicht-enzymatische Antioxidantien, die freie Radikale abfangen können (Stocker et al., 1991). Zu den fettlöslichen zählen α-Tocopherol, Ubichinon 10, Lycopen, Carotinoide, Lutein und Zeaxanthin, zu den wasserlöslichen Glukose, Pyruvat, Harnsäure, Ascorbinsäure, Bilirubin und Glutathion.

Um maligne Transformationen zu verhindern, die durch bereits gesetzte DNA-Schädigungen ausgelöst werden könnten, verfügen Zellen außerdem über umfassende Reparatursysteme, die unterschiedliche Schäden erkennen und eine Antwort darauf einleiten. Der Aktivierung dieser Reparatursysteme geht eine Expressionssteigerung des Tumorsuppressorgens p53 in der UV-geschädigten Zelle und ein Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase voraus, wodurch eine DNA-Reparatur stattfinden kann, bevor sie in der S-Phase repliziert wird (Smith et al., 1995). Bei UV-Bestrahlung insbesondere bei Wellenlängen zwischen 295 und 305 nm kann es vermutlich durch die Entstehung von Photoprodukten auch zu einem Zellzyklus-Arrest in der S- und G2/M-Phase kommen, um dem Fortschreiten der Replikation vorzubeugen (Weller et al., 1996). Es scheint, dass in erster Linie CPDs für den Zellzyklus-Arrest verantwortlich sind, wohingegen 6-4-PPs Apoptose induzieren (Lo et al., 2005).

Eine Möglichkeit zur direkten Reparatur von UV-induzierten Photoprodukten stellt die Photoreaktivierung dar. Dies ist eine „light repair“-Reaktion, bei der DNA-Photolyasen (CPD-Photolyase bzw. 6-4-PP-Photolyase) an spezifische Photoprodukte binden und unter Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 300-500 nm den Cyclobutanring spalten (Garinis et al., 2006; Menck, 2002).

Die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) ist ein weiterer, jedoch weitaus komplexerer Mechanismus zur Entfernung von Photoprodukten aus der DNA, an dem mindestens 30 verschiedene Proteine beteiligt sind (Volker et al., 2001). Es werden zwei verschiedene Formen der NER unterschieden. Bei der „Global Genome Repair“ werden Schäden über den Proteinkomplex XPC („xeroderma pigmentosum complementation group C“)-HR23B

und den DDB1/DDB2 („damaged DNA binding 1/2“, p48 und p127) im gesamten Genom erkannt und anschließend beseitigt. Bei der „Transcription Coupled Repair“ werden hingegen in erster Linie Schäden in transkriptionell aktivierten Bereichen der DNA behoben, wobei die durch die Schädigung blockierte RNA-Polymerase II zunächst durch CSA und CSB („Cockaine Syndrome complementation group A/B“) entfernt wird (Batista et al., 2009; Costa et al., 2003). Die weiteren Schritte sind bei beiden Reparaturwegen identisch. XPA und RPA, die der weiteren Schadenerkennung dienen, dirigieren die Helikasen XPB und XPD zur UV-induzierten Läsion, um die DNA in diesem Bereich zu entwinden. Die Endonukleasen XPG und XPEF/ERCC1 trennen durch Schneiden in 3’- und 5’-Richtung die Photoprodukte zusammen mit einigen benachbarten Nukleotiden aus dem betreffenden DNA-Strang heraus. Das eliminierte Teilstück wird dann mit Hilfe der DNA-Polymerase β aus einzelnen Nukleotiden neu synthetisiert und durch die DNA-Ligase I in die entstandene Lücke ligiert. Defekte im NER-Reparatursystem führen zu den seltenen rezessiven Erbkrankheiten Xeroderma pigmentosum, Cockayne-Syndrom und Trichothiodystrophie (de Boer and Hoeijmakers, 2000). Diesen Krankheiten ist eine hochgradige Sensitivität gegenüber Sonnen- bzw. UV-Strahlung gemeinsam, die sich auch bei NER-defizienten Zellen bzw. Mäusen widerspiegelt (Dunkern et al., 2001; Jans et al., 2005; Lehmann, 2003; Meunier et al., 2002; Schul et al., 2002). Außerdem entwickeln Patienten mit Xeroderma pigmentosum vermehrt UV-induzierte Hautkarzinome (Lehmann, 2003; Satoh et al., 1993).

Über die Basen-Exzisionsreparatur (BER) werden UV-induzierte Einzelstrangbrüche („single strand breaks“, SSBs), Basenschäden sowie der Verlust einzelner Basen aufgrund der veränderten Raumstruktur der DNA erkannt und repariert. Durch eine auf die Läsion spezialisierte DNA-Glykosylase wird zunächst die betreffende Base durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung vom Zucker abgetrennt, so dass eine basenfreie Lücke entsteht. Im Gegensatz zu monofunktionalen Glykosylasen verfügen bifunktionale Glykosylasen außerdem über eine intrinsische AP-Lyase-Aktivität, mittels derer sie selbst Phosphodiesterbindungen lösen können. Andernfalls wird die generierte apurine/apyrimidine (AP)-Stelle, die auch in großer Zahl direkt durch UV-Strahlung erzeugt wird, von der Endonuklease APE1 („apurinic/apyrimidinic-endonuclease 1“, Ref1) erkannt. Diese schneidet 5’ neben der AP-Stelle in das Zuckerphosphatrückgrat ein, was zur Bildung von 5’-Desoxyribose-5-Phosphat (dRP) und 3’-OH führt (O'Connor et al., 2007). Im Falle der so genannten „short patch BER“ kommt es anschließend zum Verdrängen des dRP-Rests und gleichzeitig zum Einbau eines neuen Nukleotids durch die Polymerase β. Durch die Lyaseaktivität der Polymerase β wird anschließend der dRP-Rest entfernt und es erfolgt die Ligation mit Hilfe des DNA-Ligase III-XRCC1 („X-ray repair

complementing defective repair in chinese hamster cells 1“)-Komplex. Alternativ wird durch die Aktivität von bestimmten Glykosylasen je nach Basenschaden auch die „long patch BER“ initiiert, z.B. bei oxidierten oder reduzierten AP-Stellen. Nach Dissoziation der Polymerase β findet dann eine DNA-Strangersatzsynthese durch die PCNA („proliferating cellular nuclear antigen“)-abhängigen Polymerasen ε und δ statt, die 2-8 Nukleotide an das von Polymerase β neu eingefügte Nukleotid synthetisieren. Dadurch entsteht ein 5’-Überhang („flap“), an dessen Ende sich der 5’-dRP-Rest befindet. Dieser wird von der Flap-Endonuklease-1, die durch PCNA stimuliert und positioniert wird, erkannt und abgeschnitten. Mittels Ligase I, die ebenfalls mit PCNA sowie Polymerase β interagiert, erfolgt die Reparatur abschließende Ligation. Neben PCNA bestimmen auch die Aktivierungsenzyme „replication protein A“ (RPA) und „replication factor C“ (RFC) die Funktion der Replikationsenzyme.

Für die Regulation der BER ist das Protein Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) zuständig. PARP-1 detektiert SSBs, die durch ROS induziert werden oder die infolge enzymatischen Schneidens durch APE1 oder eine bifunktionale DNA-Glykosylase generiert werden (O'Connor et al., 2007), und bindet in dimerisierter Form hochaffin an die geschädigte DNA (Pion et al., 2005; Zhang et al., 1995). Unter einer etwa 500-fachen Aktivitätsteigerung innerhalb von Minuten synthetisiert PARP-1 große Mengen hochgradig negativ geladener, langer linearer und verzweigter ADP-Ribose-Polymere („Poly (ADP-Ribose)“, PAR) (Krupitza and Cerutti, 1989), indem sie die Spaltung zellulärer Nicotinamidadenindinukleotide (NAD^+) zu Nicotinamid und ADP-Ribose katalysiert und letztere auf Akzeptorproteine überträgt, an die noch weitere ADP-Ribose-Einheiten binden können. Das Hauptakzeptorprotein der PARylierung ist PARP-1 selbst, wobei die Automodifikation der Rekrutierung anderer Komponenten der BER dient, um die Reparatur von SSBs zu erleichtern (D'Amours et al., 1999). Darüber hinaus werden noch weitere Akzeptorproteine PARyliert und so deren Aktivität moduliert, z.B. NF-κB, DNA-PK („DNA-dependent protein kinase“), p53, Topoisomerase I und Lamin B (O'Connor et al., 2007). Durch eine Überaktivierung von PARP-1 kann es außerdem zu einer NAD^+-Depletierung und zu einer Translokation des Apoptose induzierenden Faktors aus den Mitochondrien in den Zellkern kommen (Ame et al., 2004). PARP-1 inaktiviert sich selbst, da die starke Negativladung des Polymers zu ihrer Dissoziation von der DNA führt, und wird infolgedessen von Poly (ADP-Ribose)-glykohydrolase (PARG) abgebaut (Bonicalzi et al., 2005). Störungen in diesem ubiquitär vorkommenden Reparaturweg sind aufgrund der essentiellen Bedeutung für die Zellfunktion grundsätzlich letal (Hoeijmakers, 2001).

An der Erkennung, Signalweiterleitung und Reparatur von UV-induzierten Doppelstrangbrüchen („double strand breaks“, DSBs) sind ATM („ataxia-telangiectasia mutated“), ATR („ATM and Rad3 related“) und DNA-PK beteiligt (Abraham, 2004; Smith

and Jackson, 2003). Diese außerordentlich großen Proteine (> 250 kDa) gehören zu einer Familie bestehend aus sechs Protein-Serin/Threonin-Kinasen, die als „phosphatidylinositol 3-kinase related kinases“ (PIKKs) bezeichnet werden (O'Connor et al., 2007). Die DNA-PK ist direkt an der Reparatur von DSBs im Rahmen des nichthomologen Endjoinings (NHEJ) involviert (Smith and Jackson, 1999). Anders als bei der homologen Rekombination, die ebenfalls der Reparatur von DSBs dient, benötigt das NHEJ keine homologe Sequenz und findet hauptsächlich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus statt (Johnson and Jasin, 2001). Es wird durch die spezifische Bindung des Ku70/Ku80-Heterodimers an die beiden DNA-Enden initiiert (Jeggo et al., 1992; Reeves and Sthoeger, 1989), das zusammen mit der katalytischen Untereinheit der DNA-PK, den DNA-PK_{CS}, einen Komplex bildet (Sipley et al., 1995). Die Aktivierung dieses Komplexes durch Autophosphorylierung führt zur Annäherung der beiden DNA-Enden sowie zur Phosphorylierung weiterer Proteine. Phosphoryliertes Artemis entfernt als Endonuklease überschüssige DNA-Einzelstränge oder „Hairpins“ (Ma et al., 2002). Der Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN)-Komplex, der ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert wird und multimerisiert, prozessiert durch seine Aktivitäten als Exonuklease, Endonuklease und Helikase die DNA-Enden und stabilisiert zusammen mit Ku70/Ku80 die End-zu-End-Verbindung (de Jager et al., 2001). Die abschließende Ligation der beiden DNA-Enden wird durch den XRCC4-DNA-Ligase IV-Komplex vorgenommen (Scharer, 2003).

Im Gegensatz zur DNA-PK agieren ATM und ATR als Signalgeber an den Zellzyklus und an die Apoptosemaschinerie (Abraham, 2001). ATM wird infolge von Autophosphorylierung und Bindung über den MRN-Komplex an die DNA aktiviert (O'Connor et al., 2007). Für die Aktivierung und Rekrutierung von ATR an DSBs ist hingegen die Interaktion mit dem Regulatorprotein ATRIP nötig, das wiederum die Assoziation mit dem RPA-ssDNA-Nukleoproteinkomplex an den blockierten Replikationsgabeln begünstigt (Zou and Elledge, 2003). Ebenso wie ATM kann auch ATR CHK1 („checkpoint kinase 1"), den Regulatar des S- und G2/M-Checkpoints des Zellzyklus, aktivieren, aber nicht CHK2, die G1-Arrest und zum Teil auch Apoptose vermittelt (Bartek and Lukas, 2003).

1.4.4 Apoptose

Die Apoptose stellt einen essentiellen Schutz gegen UV-induzierte, irreversible DNA-Schädigungen dar. Mit dem Begriff „Apoptose“ wird der genetisch programmierte Zelltod („programmed cell death“) bezeichnet, der von Kerr und Kollegen 1972 zum ersten Mal beschrieben wurde (Kerr et al., 1972). Dabei handelt es sich um ein aktiv induziertes Absterben einer Zelle ohne Beeinflussung benachbarter Strukturen. Die Apoptose ist daher scharf abzugrenzen von der Nekrose, einem degenerativen Prozess, der mit inflammatorischen Begleiterscheinungen einhergeht und der meist ganze Zellareale betrifft (Wyllie et al., 1980).

Die Apoptose umfasst drei morphologische Phasen: In der initialen Phase kommt es zu einem Verlust der Zell-Zell-Interaktionen sowie zu Veränderungen im zellulären Wasserhaushalt, die zur Entwässerung und Kondensation des Zytoplasmas und somit zu einem Schrumpfen der Zelle führen. Das Chromatin kondensiert im Zellkern, der Halbmond- bzw. Sichelform annimmt. In der zweiten Phasen kommt es zu Membranblebbing (Bläschenbildung) und zu einer Fragmentierung des Zellkerns bzw. des Chromatins durch Endonukleaseaktivität, wobei DNA-Fragmente einer definierten Länge von 200 bp und deren Vielfache entstehen (Wyllie et al., 1980). Kleine membranumschlossene Abschnürrungen, die Chromatinfragmente, zum Teil intakte Organellen und/oder Zytoplasma enthalten, die so genannten „apoptotic bodies“, werden sichtbar. Diese werden von Nachbarzellen oder Phagozyten aufgenommen und abgebaut, ohne dass eine Entzündungsreaktion stattfindet. In der dritten Phase degenerieren die restlichen Kern- und Zytoplasmastrukturen.

Werden UV-induzierte DNA-Schäden nicht mit Hilfe der unterschiedlichen Reparatursysteme beseitigt, löst der Tumorsuppressor p53, der infolge von UV-Strahlung verstärkt exprimiert wird, Apoptose aus (van den Oord et al., 1994). Die Ursache für die vermehrte Bildung von p53 scheint laut Nelson und Kastan allerdings weniger in der Generierung von Thymindindimeren zu liegen als vielmehr in dem durch die DNA-Reparatur verursachten Strangbruch (Nelson and Kastan, 1994). Als eine weitere Möglichkeit zur Auslösung der UV-induzierten Apoptose wird darüber hinaus die Bildung verschiedener DNA-Schäden diskutiert, die einen Transkriptionsstopp und somit eine verringerte Expression von anti-apoptotischen Proteinen bewirken (Roos and Kaina, 2006). p53 induziert pro-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie wie Bax („bcl-2-associated x protein“). Diese stimulieren die intrinsische Apoptosekaskade in der Zelle, indem sie vermutlich die Aktivität von Membrankanälen der äußeren Mitochondrienmembran regulieren, durch die pro-apoptotische Faktoren wie Cytochrom c

ins Zytosol freigesetzt werden können (Cohen-Jonathan et al., 1999). Im Zytosol bildet sich ein Komplex aus Cytochrom c, ATP, Procaspase 9 und Apaf-1 („apoptosis protease activating factor-1“). In diesem als Apoptosom bezeichneten Proteinkomplex wird die Caspase 9 proteolytisch aktiviert, welche im nächsten Schritt die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert. Diese wiederum katalysieren die proteolytische Spaltung von Zellsubstraten wie PARP, Lamin B und dem Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD, DFF-45), wobei durch letzteres die Caspase-aktivierte DNase (CAD, DFF-40) aus dem „DNA fragmentation factor“ (DFF) freigesetzt wird und Chromatin spalten kann. Auf diese Weise kommt es zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose.
Darüber hinaus kann UV-Strahlung über die Generierung von ROS den intrinsischen Signalweg initiieren, da diese mit Lipiden interagieren und so intrazelluläre Membranen inklusive der äußeren Mitochondrienmembran schädigen. Infolgedessen wird ebenfalls Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt und die Caspase-Kaskade über Caspase 9 in Gang gesetzt (Batista et al., 2009; Kulms and Schwarz, 2002; Roos and Kaina, 2006).
UV-induzierte Apoptose kann aber auch über eine Aktivierung von Todesrezeptoren z.B. FAS (CD95) oder TNF-Rezeptor 1 (TNFR1, CD120a) auf der Zelloberfläche eingeleitet werden (extrinsischer Apoptosesignalweg) (Kulms et al., 2002; Leverkus et al., 1997). Über das Vermittlerprotein FADD wird Caspase 8 aktiviert, welche die Signalkaskade zu den Effektorkaskaden initiiert. Durch Aktivierung des TNFR1 infolge von UV-Exposition können zudem über TRADD und TRAFs die Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 aktiviert werden, die anti-apoptotische Wirkungen besitzen. UV-Strahlen sollen zudem über Faktoren an der Membran (Sphingomyelin) sowie im Zytoplasma (Ceramid) die Apoptose in der Zelle beeinflussen können (Haimovitz-Friedman, 1998).

1.4.5 Immunsuppressive Effekte der UV-Strahlung

UV-Strahlung wirkt in den meisten Situationen immunsuppressiv und löst dabei eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte aus. Zum einen beeinflusst sie immunkompetente Zellen wie die Langerhans Zellen und das Zytokinmilieu in der Haut. Langerhans Zellen, deren Funktion in der Haut darin besteht, als Antigen-präsentierende DCs T-Zellen zu stimulieren (Stingl et al., 1978), sind sehr sensitiv gegenüber UV-Strahlung. Infolgedessen gehen sie vermehrt in Apoptose (Meunier et al., 1995), migrieren verstärkt in die Lymphknoten (Dandie et al., 1998; Vink et al., 1996) und verändern ihren Oberflächenphänotyp durch eine drastisch reduzierte Expression von

Oberflächenmolekülen wie MHC II, ICAM („inter-cellular adhesion molecule“) und B7, wodurch sie ihre Funktion als APCs verlieren (Aberer et al., 1981; Dandie et al., 1998; Weiss et al., 1995). Die veränderten Langerhans Zellen induzieren die Anergie oder Deletion von T_H1-Zellen und stimulieren stattdessen regulatorische T-Zellen (Simon et al., 1994). Die regulatorischen T-Zellen wiederum vermitteln Immunsuppression, indem sie das CD95/CD95L (Fas/FasL)-System aktivieren, um weitere APCs in Apoptose zu treiben (Schwarz, 1998). Darüber hinaus schaffen die regulatorischen T-Zellen durch Sekretion von IL-10 und TGF („transforming growth factor“)-β ein anti-inflammatorisches Zytokinmilieu und hemmen die Produktion von antagonistisch wirkendem IL-12. Auch in die Haut infiltrierende Makrophagen sowie Keratinozyten sekretieren IL-10 (Enk et al., 1995; Kang et al., 1994). Das anti-inflammatorische IL-10 inhibiert zum einen die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, zum anderen die Oberflächenexpression von MHC II und weiteren ko-stimulatorischen Molekülen, die für die T-Zell-Aktivierung und Antigenerkennung erforderlich sind (Maverakis et al., 2010), was wiederum den Funktionsverlust von APCs und die Induktion regulatorischer T-Zellen nach sich zieht (Beissert et al., 1995). Intraepidermale T-Zellen werden darüber hinaus auch direkt durch UV-B-Strahlung apoptotisch (Krueger et al., 1995).

Einen weiteren Erklärungsansatz für die immunsuppressive Wirkung von UV-Strahlung bietet die Urocaninsäure. Sie befindet sich in relativ großer Menge in der Epidermis und ist in der Lage, UV-B-Strahlung zu absorbieren, wodurch sie vom trans- in ihr cis-Isomer umgewandelt wird (De Fabo and Noonan, 1983). In dieser Form kann sie die Zahl der Langerhans Zellen um die Hälfte reduzieren (Kurimoto and Streilein, 1992b), die Aktivität von NK-Zellen (Gilmour et al., 1993) und polymorph kernhaltigen Zellen unterdrücken (Kivisto et al., 1996), die Sekretion von Zytokinen wie TNF-α fördern (Kaneko et al., 2008; Kurimoto and Streilein, 1992a, b) und die Migration von IL-10 exprimierenden Zellen induzieren (Moodycliffe et al., 1996).

1.4.6 Immunaktivierende Effekte von UV-Strahlung

UV-Strahlung kann das Immunsystem der Haut auch aktivieren. So induziert UV-Exposition über die Aktivierung von NF-κB die Sekretion verschiedener inflammatorischer Mediatoren, darunter IL-1, IL-6, TNF-α und VEGF („vascular endothelial growth factor“) (Abeyama et al., 2000; Maverakis et al., 2010). In erster Linie produzieren Keratinozyten und Mastzellen TNF-α und IL-1 (Kock et al., 1990; Walsh, 1995). TNF-α löst in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen Effekte aus. Es erhöht die MHC I-Expression auf

Endothelzellen und dermalen Fibroblasten (Collins et al., 1986), induziert die Produktion von IL-1α (Dinarello et al., 1986) und steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule 1“) und E-Selectin unter anderem auf Endothelzellen (Groves et al., 1995), um die Migration von Neutrophilen und zur Antigenpräsentation fähigen Makrophagen in die UV-exponierte Haut zu unterstützen (Baadsgaard et al., 1987). Darüber hinaus fördert es die Bildung von „sunburn cells“ (Schwarz et al., 1995).

IL-1β liegt als inaktive Vorstufe in Keratinozyten vor. Infolge von UV-Exposition wird ein Caspase 1-aktivierender Multiproteinkomplex, das so genannte NLRP3-Inflammasom, gebildet, das neben NLRP3 („NOD-like receptor family, pryin domain containing 3“) und Caspase 1 auch das Adaptermolekül ASC enthält. Aktivierte Caspase 1 prozessiert die inaktive Proteinproform pro-IL-1β in das biologisch aktive Zytokin IL-1β, das von den Keratinozyten sekretiert wird und eine pro-inflammatorische Wirkung besitzt. Es wird mit einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen sowie mit Autoimmunität assoziiert (Maverakis et al., 2010).

Darüber hinaus sekretieren Keratinozyten noch weitere Zytokine wie das chemotaktische IL-8, das für den starken Einstrom von inflammatorischen Zellen in die UV-exponierte Haut mitverantwortlich ist (Kondo et al., 1993). Auch die Expression von IL-12 wird als Antwort auf UV-A- aber nicht auf UV-B-Strahlung aufreguliert (Kondo and Jimbow, 1998).

Neben NF-κB werden auch die als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPKs) bezeichneten MAPKs p38 und JNK durch UV-Strahlung oder UV-induzierte Zytokine im Zytoplasma aktiviert (Coulthard et al., 2009; Kumar et al., 2003; Kyriakis and Avruch, 2001; Nagai et al., 2007; Pearson et al., 2001). Dies geschieht über eine dreistufige Aktivierungskaskade, bei der MAPK-Kinasen (MAPKKs, MEKs bzw. MKKs), die selbst Substrate der MAPKKKs (MEKKs bzw. MKKs) sind, die MAPKs phosphorylieren und somit aktivieren. Als MAPKKK wurde unter anderem die Kinase TAO („thousand and one amino acid“) identifiziert, die nach Bildung von UV-induzierten DSBs über ATM aktiviert wird und über die MAPKKs MKK3 und 6 die Aktivierung von p38 vermittelt (Raman et al., 2007). Auch die durch ROS stimulierte ASK1 („apoptosis signal-regulating kinase“) kann als MAPKKK fungieren und die Aktivierungskaskade von p38 und JNK einleiten (Nagai et al., 2007), wobei die Aktivierung von JNK über SEK1 und MKK7 erfolgt (Kyriakis and Avruch, 2001). Aktiviertes p38 und JNK translozieren in den Nucleus, wo sie über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 Apoptose, Inflammation und Zelldifferenzierung induzieren (Abeyama et al., 2000).

Darüber hinaus induziert UV-Strahlung die Translokation nukleärer und zytoplasmatischer Autoantigene z.B. SSA/Ro und SSA/La auf die Zelloberfläche von apoptotischen Keratinozyten (Furukawa et al., 1990). Anti-Ro-AKs gelten als Indikator für

Photosensitvität z.B. beim LE (Scheinfeld and Deleo, 2004). Die Bindung dieser AKs an die Keratinozyten führt einerseits zu einer Fcγ-Rezeptor vermittelten Aufnahme der apoptotischen Zelle und bedingt durch die Fcγ-Rezeptor-Ligation zu einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (Mevorach, 2000; Reefman et al., 2003), andererseits erhöht sie vermutlich deren komplementabhängige Lysierung durch aktivierte zytotoxische T-Zellen, wodurch zusätzlich unprozessierte, nukleäre Antigene freigesetzt werden (Maverakis et al., 2010).

1.5 Die Autoimmunerkrankung Lupus erythematodes (LE)

Der Lupus erythematodes (LE) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung mit meist schubhaftem Verlauf, die sich klinisch sehr variabel darstellt. Er wird den klassischen Kollagenosen (Bindegewebserkrankungen) und damit den rheumatischen Erkrankungen zugeordnet. Der LE ist durch das Auftreten von Autoantikörpern, die vor allem gegen nukleäre (Antinukleäre AKs, Ana) aber auch zytoplasmatische Antigene gerichtet sind, sowie durch vielfältige Störungen der zellulären Immunantwort sowohl T- als auch B-Zellen betreffend charakterisiert (Lahita, 1992; Tan, 1989). Wie bei allen Autoimmunerkrankungen ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage, zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu differenzieren. Als Folge der Autoimmunreaktion bilden sich unter anderem Immunkomplexe aus AKs und Zellbestandteilen, die sich in den Gefäßen vieler Organe ablagern können und mit zu einer chronisch entzündlichen organspezifischen oder systemischen Gewebszerstörung beitragen.

Der Name Lupus erythematodes setzt sich aus dem lateinischen Wort für Wolf („lupus“) und dem griechischen Wort für Röte („erythema“) zusammen und deutet auf zwei charakteristische Krankheitssymptome hin: die wolfbissähnlichen Hautläsionen sowie die Hautrötungen im Gesicht, die wegen ihrer Form auch als Schmetterlingserythem bezeichnet werden und die durch Sonnenlicht- bzw. UV-Exposition provoziert werden. So wurde der LE im Jahre 1824 von Laurent-Théodore Biett auch zunächst als reine Hauterkrankung beschrieben. Erst 1872 erkannte der Dermatologe Moritz Kaposi seinen systemischen Charakter.

Prinzipiell kann sich der LE in jedem Organsystem manifestieren, insbesondere im Bereich von Haut, Nieren, Gelenken, zentralem Nervensystem (ZNS), Gefäßen, Skelettmuskeln, Herz, Perikard und Pleura, wobei zwischen kutanen LE-Formen und systemischem LE (SLE) differenziert wird (Wenzel et al., 2003).

Die klinische Diagnostik erfolgte in der Vergangenheit nach den Kriterien der „American Rheumatism Association“ (ARA), die jedoch die realen dermatologischen Verhältnisse nur ungenügend widerspiegeln und revidiert werden müssen (Hochberg, 1997; Parodi and Rebora, 1997; Tan et al., 1982).

Die verschiedenen Varianten des kutanen LE (CLE), die sich unter anderem durch eine spezifische Morphe unterscheiden, sind mit einer kurzen Beschreibung nach Wenzel und Kollegen in Tabelle 1.2 dargestellt (Wenzel et al., 2003). Histologisch ist der CLE generell durch das Bild der so genannten „Interface Dermatitis“ charakterisiert: Lymphozyten dringen im Bereich der basalen Epidermis in das Endothel ein (dermo/epidermales „Interface“) und führen zur Apoptoseinduktion basaler Keratinozyten, was sich durch eine hydrophische Auflockerung und der Ausbildung so genannter Kolloidkörperchen zeigt. Ein Übergang von einer rein kutanen in eine systemische Manifestation ist allerdings möglich, ebenso eine Hautbeteiligung beim SLE (Wenzel et al., 2003). So werden bei 70-80 % aller LE-Patienten Hautveränderungen beobachtet, die entweder spezifisch für eine Variante des CLE sind oder unspezifisch im Rahmen eines SLE auftreten (Gilliam and Sontheimer, 1981; Wenzel et al., 2003).

Neben Hautveränderungen stellt die Photosensitivität mit einer Prävalenz von 24-83 % ein weiteres Leitsymptom des LE dar (Sanders et al., 2003). Die Photosensitivität definiert eine pathologische Überempfindlichkeitsreaktion der Haut auf UV-Licht-Provokation (Sanders et al., 2003). So führt eine Photoprovokation unter Verwendung von UV-A- bzw. UV-B-Licht (Baer and Harber, 1965; Epstein et al., 1965; Everett and Olson, 1965; Kuhn et al., 2001; Walchner et al., 1997) sowie von sichtbarem Licht zu kutanen Läsionen unterschiedlichen Schweregrads in allen photosensitiven Formen des LE (Cheong et al., 1994; Sanders et al., 2003), wobei vor allem Patienten mit SCLE (50-100 %), LET (70-81 %) oder SLE (25-85 %) besonders photosensibel sind (Gilliam and Sontheimer, 1981; Kuhn et al., 2001; Walchner et al., 2000). Darüber hinaus sind auch Entzündungsreaktionen in den inneren Organen im Falle einer systemischen Manifestation durch Sonnenlicht- bzw. UV-Exposition induzierbar.

Formen des CLE	
Chronischer CLE (CCLE)	
Chronisch diskoider CLE (CDLE)	- mit 75 % die häufigste kutane LE-Form (Kind and Goerz, 1987) - scharf begrenzte erythematokeratotische, oft scheibenförmige Plaques mit charakteristischer dreiphasiger Struktur aus Erythem, Keratose und Atrophie, die bevorzugt im Gesicht und auf der Kopfhaut lokalisiert sind und Narbenbildung sowie dauerhaften Haarausfall in behaarten Hautbezirken (Alozepie) bedingen - Ana im niedrigen Titerbereich in 20-30 % der Fälle
LE profundus (LEP) (Kaposi Irgang)	- seltenere Verlaufsform - bläulich, derbe, subkutane, oft schmerzhafte Knoten mit eingesunkener Oberfläche überwiegend an Wangen, Glutealregion, Oberarmen und Brust - Ana in 55 % der Fälle
Chilblain LE (ChLE) (Hutchinson)	- häufig Teilsymptom im Rahmen eines SLE, SCLE oder CDLE - blaurote, polsterartige, flache Knoten, teilweise mit einer festhaftenden Keratose, die vor allem an den Dorsalseiten von Fingern und Zehen, seltener an Nase, Ohren, Ellenbogen, Knie und Fersen auftreten und die Überempfindlichkeit gegenüber Berührungsreizen (Hyperästhesie) sowie Akrozyanose aufweisen - Ana in 50-60 % der Fälle
Subakuter CLE (SCLE)	
	- 10 % der kutanen LE-Manifestationen - erythematöse, nicht vernarbende, papulosquamöse und/oder anuläre Hautläsionen im Bereich der gesamten oberen Körperhälfte, die ohne Narbenbildung abheilen, aber zu einer Hyper- oder Hypopigmentierung führen - zusätzlich Manifestation milder extrakutaner Symptome wie Gelenkbeschwerden und Nephropathien, seltener Fieber, allgemeines Krankheitsgefühl, Myalgien oder das Raynaud-Phänomen - Ana in 90 %, anti-SSA/Ro- und anti-SSB/La-AKs in 30-60 % der Fälle, wobei erstere nach diaplazentarer Übertragung einen neonatalen LE induzieren können (Gensch et al., 2005), Erhöhung der Blut-Senkungs-Geschwindigkeit, des C-reaktiven Proteins und weiterer Entzündungsparameter (Hypergammaglobulinämie, Komplementveränderungen) (Sontheimer, 1989)
Akuter CLE (ALE)	
	- zu 20-60 % Teilsymptom im Rahmen eines SLE (Cervera et al., 1993) - lokale flächige Erytheme, im Gesichtsbereich häufig als so genanntes „Schmetterlingserythem", seltener akute generalisierte, makulopapulöse oder papulöse Hautveränderungen
Intermittierender CLE (ICLE)	
LE tumidus (LET)	- 10 % der kutanen LE-Manifestationen - elevierte, scharf begrenzte, erythematöse, nicht squamöse Plaques im Gesichts- und Rumpfbereich - Ana in 35 % der Fälle

Tabelle 1.2: Klassifikation des kutanen Lupus erythematosus (CLE) modifiziert nach (Kuhn and Ruzicka, 2004) mit Kurzbeschreibung der CLE-Varianten nach (Wenzel et al., 2003).

Da die Symptome inter- und intraindividuell mit dem Krankheitsverlauf in ihrer Ausprägung variieren können, sind die klinischen Erscheinungsbilder insbesondere des SLE überaus vielfältig (Vitali et al., 1992). Die häufigsten Symptome beim SLE laut Tan und Kollegen sind in Tabelle 1.3 aufgeführt (Tan et al., 1982).

Klinische Symptome beim SLE	Häufigkeit
Fieber	90 %
Gelenkschmerzen und - entzündungen	85 %
Hautveränderungen: typischerweise ein unscharf begrenztes, oft symmetrisches, makulöses bis urtikarielles Erythem im Gesicht (Schmetterlingserythem), zum Teil uncharakteristische disseminierte Exantheme auch im Bereich von Brust und Rücken, Haarausfall, Schleimhautulzera	80 %, in 25 % bereits initial
Nierenbeteiligung: vor allem Mikrohämaturie/Albuminurie, die in 15 % der Fälle zu Nierenfunktionseinschränkungen führen	60 %
Generalisierte Lymphknotenschwellungen	50 %
Pleuritis	59 %
Raynaud-Symptomatik	59 %
Lungenbeteiligung	30 %
Orale und genitale Schlaumhautbeteiligung: Erytheme, Ulzera	20 %
Peri- und Myokarditis	25 %
Hepatosplenomegalie	25 %
ZNS-Beteiligung: Krämpfe, Psychosen	25 %
Abdominelle Beschwerden	20 %

Tabelle 1.3: Übersicht über die häufigsten klinischen Symptome beim SLE nach (Tan et al., 1982).

Charakteristische laborchemische Auffälligkeiten beim SLE sind die Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (90 %), γ-Globulin-Erhöhung (80 %), Anämie (75 %), Thrombozytopenie und Komplementerniedrigung sowie das Auftreten von Autoantikörpern und zellulären Immunstörungen (Parodi and Rebora, 1997; Tan, 1989; Tan et al., 1982). In Tabelle 1.4 sind die den SLE kennzeichnenden Autoantikörper und die Häufigkeit ihres Auftretens aufgelistet. Die sich bildenden Immunkomplexe aus Autoantigen und Autoantikörpern zirkulieren im peripheren Blut und können sich schließlich an den Basalmembranen der Glomeruli, der Epidermis und der Gefäßwände ablagern und das Komplementsystem aktivieren. So ist beim SLE immunhistopathologisch das so genannte Lupusband, eine bandförmig im Bereich der Basalmembran vorhandene Ablagerung von IgG, IgM oder IgA sowie den Komplementfaktoren C1 und C3, in der Haut zu erkennen (dos Santos et al., 1988). Infolgedessen entstehen Entzündungsreaktionen, die zu Gewebsschädigungen in Form

von Glomerulonephritis und/oder Vaskulitis führen können (Baumann et al., 2001; Mok and Lau, 2003).

Autoantikörper beim SLE	Häufigkeit
antinukleäre AKs (Ana)	90 %
anti-dsDNA AKs	40-90 %
anti-Sm AKs	10-30 %
anti-SSA/Ro und anti-SSB/La AKs	40-60 %
anti-Histon AKs (beim Medikamenten induzierten SLE)	20 %
anti-Cardiolipin AKs	30-40 %
anti-rRNP und anti-snRNP AKs	30-40 %
organ- und zelltypspezifische AKs	

Tabelle 1.4: Charakteristische Autoantikörper beim SLE nach (Tan, 1989; Tan et al., 1982).

Die zellimmunologischen Störungen können Leukozytopenie (Camussi et al., 1982), Lymphozytopenie (Rivero et al., 1978), Störungen im T- (verminderte T-Zell-Antwort auf Antigene, verminderte Generierung zytotoxischer T-Zellen, gesteigerte HLA („human leukocyte antigen“)-DR- und FAS-Antigenexpression $CD4^+$ T-Zellen, verminderte IL-2-ausgelöste Proliferation (Cao et al., 2005; Scheinberg and Cathcart, 1974)) und B-Zell-System (erhöhte Anzahl aktiver B-Zellen, polyklonale B-Zell-Aktivierung, Hypergammaglobulinämie (Gilliam and Hurd, 1976; Noguchi et al., 1992)) und/oder veränderte Zytokinmuster (verminderte IL-2- und IFN-γ-Produktion, erhöhte B-Zell-stimulatorische IL-4-, 5- und 6-Produktion) umfassen.

Der LE ist nicht heilbar. Daher ist es wichtig schubauslösende Faktoren z.B. durch konsequenten Lichtschutz zu vermeiden. Zur symptomatischen Behandlung werden Hautcremes und nichtsteroidale Antirheumatika wegen ihrer entzündungshemmenden Wirkung eingesetzt. Im Rahmen einer internen Basistherapie sind Glukokortikoide wie Prednisolon bzw. Methylprednisolon die Mittel der Wahl zur Entzündungshemmung bei akuten Schüben. Chloroquin alternativ Hydroxychloroquin werden bei leichten LE-Formen mit überwiegender Haut- und Gelenkbeteiligung in Kombination mit niedrigen Prednisolon-Dosen verabreicht. Sie können die Häufigkeit von Lupus-Schüben senken und das Wohlbefinden verbessern. Als weitere Standardtherapeutika werden Immunsuppressiva eingesetzt, z.B. Azathiopren, das die DNA- und RNA-Synthese und somit die T- und B-Zell-Proliferation hemmt, Methotrexat, Cyclophosphamid und Cyclosporin A. Weitere Therapieansätze sind die Plasmaphorese oder Immunadsorption, Ig-Infusionen, G-CSF- und Anakinra-Gabe.

Die kutanen Manifestationen des LE haben im Allgemeinen eine günstige Prognose, zumal die Krankheitsschübe im Laufe der Jahre in ihrer Intensität abnehmen. Die Prognose des SLE ist dagegen vom Schweregrad der Erkrankung und der Ausdehnung der systemischen Manifestation abhängig, wobei ein tödlicher Ausgang des SLE oft von einem aktiven Krankheitsverlauf begleitet ist, bei dem häufig eine Beteiligung der Nieren, des ZNS sowie andere Infektionen eine Rolle spielen. Die 10-Jahresüberlebensrate beträgt mehr als 80 % (Drenkard and Alarcon-Segovia, 2000; Gladman, 1996; Swaak et al., 1989a, b).

Problematisch ist, dass die Ätiologie des LE bis heute weitestgehend unbekannt ist. Es ist davon auszugehen, dass genetische Faktoren, Alter und Geschlecht eine prädisponierende Rolle spielen. So tritt der LE familiär (9 %) sowie bei monozygoten Zwillingen gehäuft auf (Block et al., 1975). Darüber hinaus wird er mit bestimmten HLA-Haplotypen (HLA-B8, -DR2, -DR3 und -DQ2) sowie verschiedenen Genloci und Genmutationen assoziiert z.B. mit einer Mutation im TREX1-Gen, das eine intrazelluläre DNase kodiert, die in der Apoptose eine wichtige Rolle spielt (Green et al., 1986; Rahman and Isenberg, 2008; Wakeland et al., 2001) sowie mit einem fehlerhaften IRF5, der zu einer Überexpression von Typ I-IFN führt (Graham et al., 2007). Auch ein Einzelnukleotidpolymorphismus in dem für die Tyk2 kodierenden Gen wird mit LE assoziiert (Sigurdsson et al., 2005).

Verschiedene exogene Einflüsse wie z.B. Licht (Aharon-Maor and Shoenfeld, 1998), hormonelle Faktoren (Cooper et al., 1998), Arzneimittel wie Hydantoinderivate, D-Penicillamin, Isoniazid oder Procainamid (Pramatarov, 1998) und Infektionen mit dem Zytomegalie-Virus oder dem Epstein-Barr-Virus (Rider et al., 1997; Tsai et al., 1995) können zur Manifestation führen. Neuere Studien weisen ferner darauf hin, dass Störungen bei der Apoptose bzw. bei der Phagozytose apoptotischer Zellen sowie Störungen bei der Interaktion zwischen Makrophagen, DCs und Lymphozyten bei LE-Patienten auftreten und möglicherweise die Erkrankung auslösen (Bijl et al., 2006; Herrmann et al., 2000; Shoshan et al., 2001). So sind der CDLE sowie der SCLE durch eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den Hautläsionen (Baima and Sticherling, 2001; Chung et al., 1998; Kuhn et al., 2006; Pablos et al., 1999) und der SLE durch große Mengen zirkulierender apoptotischer Zellen gekennzeichnet (Courtney et al., 1999; Perniok et al., 1998). Eine mögliche Ursache für die unvollständige Apoptose könnte in quantitativen oder qualitativen Defekten der frühen Komplementfaktoren wie C2, C4 oder C1q bestehen (Bijl et al., 2006; Walport et al., 1998). Insbesondere der C1q-Rezeptor auf der Oberfläche von Phagozyten spielt eine wichtige Rolle in der Beseitigung von apoptotischen Zellen (Korb and Ahearn, 1997), da durch Bindung von Immunkomplexen

an den C1q-Rezoptor die Komplementaktivierung ausgelöst wird. Eine andere Möglichkeit könnte eine reduzierte Anzahl der Komplement-bindenden CR1-Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten sein (Kiss et al., 1996; Mir et al., 1988). Reefman und Kollegen konnten zwar weder eine erhöhte Apoptoserate noch eine verminderte „Clearance"-Rate in UV-exponierter Haut von SLE-Patienten nachweisen, beobachteten aber in der Haut die UV-induzierte Bildung von Zellinfiltraten sowie entzündlicher Läsionen in der Nähe von apoptotischen Zellen (Reefman et al., 2006a; Reefman et al., 2006b). Die genaue Aufklärung der Ätiologie wäre in erster Linie für die Entwicklung neuer bzw. verbesserter therapeutischer Maßnahmen und somit für eine verbesserte Prognose von großer Wichtigkeit.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Warum UV-Strahlung, die in den meisten Situationen eine immunsuppressive Wirkung auf das Immunsystem ausübt, unter bestimmten Konditionen zu einer Immunaktivierung führt, die sich unter anderem in dem Phänomen der Phototoxizität beim LE widerspiegelt, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Um diese Diskrepanz zu erklären, sollen gezielt die Effekte von UV-Exposition auf das angeborene Immunsystem analysiert werden, sowohl auf zellulärer als auch auf Ebene der Nukleinsäuren. Es gilt herauszufinden, ob anders als UV-bestrahlte Zellen, die normalerweise ein anti-inflammatorisches Zytokinmilieu induzieren, aufgereinigte Nukleinsäuren dieser Zellen bzw. direkt bestrahlte Nukleinsäuren über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden und infolgedessen zur Produktion und Sekretion von Typ I-IFN und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen in myeloiden Immunzellen führen. Dies soll *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Eine weitere Fragestellung, die sich daraus ergibt und die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden soll, ist, ob für die Verstärkung des immunstimulatorischen Potenzials von Nukleinsäuren infolge von UV-Exposition physiologische Schädigungen oder aber Modifikationen verantwortlich sind, die auf indirektem Weg durch einen Angriff UV-induzierter ROS entstehen. In diesem Zusammenhang soll untersucht werden, inwieweit die oxidative Basenmodifikation 8-OH-dG bzw. 8-OH-G die immunstimulatorische Wirkung von DNA und RNA beeinflusst. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es näher zu beleuchten, wie die UV-modifizierten Nukleinsäuren detektiert werden, ob TLR-abhängig oder über zytosolische Rezeptoren und ob möglicherweise weitere intrazelluläre Signalwege bei der Erkennung involviert sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Midisart 2000	Sartorius (Göttingen)
Analysewaagen U4100-OD2.2, MC BA 100	Sartorius (Göttingen)
Autoklav Typ VX-150	Systec (Wettenberg)
Bechergläser (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1 l)	Schott (Mainz)
Begasungsbrutschrank MCO-20AIC	Sanyo (San Diego (USA))
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences (Heidelberg)
Einfrierbehälter	VWR (Darmstadt)
Eismaschine AF20	Scotsman (Pogliano (I))
Elektronische Pipetten eLine (5-120 µl, 50-1000 µl)	Biohit (Rosbach v. d. Höhe)
Elektroporator Gene Pulser II	Bio Rad (München)
ELISA-Lesegerät Apollo LB912	Berthold (Bergisch Gladbach)
ELISA-Waschgerät Vacupette	VWR (Darmstadt)
En Vision 2104 Multilabel Reader	PerkinElmer (Rodgau)
Erlenmeyer-Kolben (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml)	Schott (Mainz)
Flex-Cycler	Analytic Jena (Jena)
Fluoreszenzmikroskop IX71	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop Observer D1	Carl-Zeiss (Götingen)
Gefrierschrank (- 20 °C)	AEG-Electrolux (Nürnberg), Siemens (München)
Gefrierschrank (- 80 °C) HFU 586 basic	Thermo Electron (Oberhausen)
Gefriertruhe (- 150 °C) ultra low freezer	Sanyo (San Diego (USA))
Geldokumentation	Peqlab (Erlangen)
Gelkammer Modell 40-1214 und 40-0911 mit Elektrophoreseschlitten und Kamm	Peqlab (Erlangen)
Gewindeflaschen (250 ml, 500 ml, 1 l)	Schott (Mainz)

Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Kolbenhubpipetten Research (0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Kühlschrank	AEG-Electrolux (Nürnberg)
MACS-Separator und Multistand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer Stirrer	VWR (Darmstadt)
Mehrkanalpipetten Ergonomic High-Performance (1-10 µl, 5-50 µl, 20-200 µl)	VWR (Darmstadt)
Messkolben (10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l)	Schott (Mainz)
Mikroskop WIIovert 30	Hund (Wetzlar)
Mikrowelle NN-E205W	Panasonic (Hamburg)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
pH-Meter HI8424	HANNA Instruments (Kehl am Rhein)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Präparierbesteck	Labotec Labor-Technik (Göttingen)
Quadro MACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Reagenzglas-Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York (USA))
Reinstwasseranlage Purelab classic	ELGA (Celle)
Schüttler KS 260 basic	IKA (Staufen)
Spannungsgerät Electrohoresis Power Supply EV231	Peqlab (Erlangen)
Spektralphotometer Nanodrop 1000	Peqlab (Erlangen)
Sterilwerkbank Microbiological Safety Cabinet Typ 1.8	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Stickstofftank	Taylor Wharton (Mildstedt)
Thermostatschrank AQUALytic	Liebherr (Biberach)
UV-Bestrahlungsgerät	Saalmann (Herford)
UV-Crosslinker Bio-Link BLX 254	Peqlab (Erlangen)
Vortexer lab dancer	VWR (Darmstadt)
Wasserbad Isotemp	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

Zentrifugen 5415 D, 5415 R, 5430 R, 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Galaxy mini	VWR (Darmstadt)

2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialie	**Hersteller**
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Einmal-Feindosierungsspritze Omnifix® F (1 ml)	Braun (Melsungen)
Einmal-Handschuhe Dermaclean (S, M, L)	Ansell Healthcare (Brüssel (B))
Einmal-Kanülen Sterican (0,4 x 20 mm, 0,45 x 20 mm)	Braun (Melsungen)
Einmal-Spritzen Discardit II (2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Elektroporationsküvette (4 mm)	Bio Rad (München)
ELISA-Platte groß	Greiner Bio-One (Solingen)
ELISA-Platte klein	Corning Costar (Bodenheim)
FACS-Röhrchen groß	Sarstedt (Nürnbrecht)
FACS-Röhrchen klein	Corning Costar (Bodenheim)
Glaspasteurpipette (230 mm)	Brand (Wertheim)
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One (Solingen)
MACS-Nylonfilter (30 µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS-Separationssäule (MS, LS, LD)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Microtainer Röhrchen	BD Biosciences (Heidelberg)
Mini Quick DNA Spin Columns	Roche (Mannheim)
Pipettenspitzen (0,1-10 µl (kristall), 2-200 µl (gelb), 100-1000 µl (blau))	Greiner Bio-One (Solingen)
Pipettenspitzen mit Aerosolfilter (0,1-2,5 µl, 1-20 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl)	Biozym (Hess. Oldendorf), nerbe plus (Winsen/Luhe)
Petrischalen (Ø 10 cm)	Greiner Bio-One (Solingen)
Plastikpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Costar (Bodenheim)
Reagenz-Reservoir	VWR (Darmstadt)
Reaktionsgefäß (0,2 ml)	BIOplastics (Landgraaf (NL))

Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg), Sarsted (Nümbrecht)
Spritzenfilter (0,45 µm)	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Sterilfilter 500 ml Filtersystem	Corning Costar (Bodenheim)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel), Whatman (Dassel)
Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 175 cm^2)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Kulturplatten (6-, 12-, 24-, 48- und 96-Lochflachbodenplatte, 96-Lochrundbodenplatte)	TPP (Trasadingen (CH))
Zellkulturschalen (100 x 20 mm)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Zellsieb (40 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Solingen)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	**Hersteller**
ADP, CDP, GDP, IDP, UDP	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Agarose	Applichem (Darmstadt)
Aqua Spüllösung	Braun (Melsungen), Delta Select (Pfullingen)
BD Pharmlyse	BD Biosciences (Heidelberg)
Biocoll	Biochrom AG (Berlin)
Borsäure (H_3BO_3)	Carl Roth (Karlsruhe)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Cellgrow® DC Medium	Cellgenix (Freiburg)
Chelex 100 Resin	Bio Rad (München)
Chloroform ($CHCl_3$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroquine diphosphate salt ($C_{18}H_{26}ClN_3 \cdot 2\ H_3PO_4$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diethylenpyrocarbonat-Wasser (DEPC-H_2O)	Invitrogen (Karlsruhe)
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth (Karlsruhe)

DNA-Hybridisierungspuffer 10 x	New England Biolabs (Ipswich (GB))
DreamTaq™ Green Buffer 10 x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 41965	Gibco (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high Glucose 21068-028	Gibco (Karlsruhe)
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories (Pasching)
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (C_2H_6O)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung 0,5 M	PAA Laboratories (Pasching)
FastDigest® Puffer 10 x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco (Karlsruhe)
Gelatine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Geneticindisulfat (G418)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GM-CSF (murin)	Generierter J55811-Zellüberstand nach G418-Selektion
GM-CSF rekombinant (human)	ImmunoTools (Friesoythe)
Größenstandards GeneRuler DNA Ladder (100 bp, 1 kb)	Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Ipswich (GB))
HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Humanes AB-Serum	BioWhittaker (Wakersville MD (USA))
8-Hydroxy-guanosintriphosphat (8-OH-GTP)	TriLink (San Diego (USA))
8-Hydroxy-2-desoxyguanosintriphosphat (8-OH-dGTP)	TriLink (San Diego (USA))
IL-4 rekombinant (human)	ImmunoTools (Friesoythe)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden)
Isopropanol (C_3H_8O)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin 100 x	Cambrex BioWhittaker (New Jersey (USA))
Ladepuffer DNA Loading Dye 6 x	Fermentas (St. Leon-Rot)
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco (Karlsruhe)
MEM Sodium-Pyruvat 100 x	Gibco (Karlsruhe)

2-Mercaptoethanol (C_2H_6OS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) 25 mM	Fermentas (St. Leon-Rot)
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) 50 mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumazetat ($C_2H_3O_2 \cdot Na$) pH 5,2 3 M	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl) 10 %	Braun (Melsungen)
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung 0,9 %	Braun (Melsungen)
Natriumcitrat ($C_6H_7NaO_7$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphoshat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe)
Optimem	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin 100 x	Cambrex BioWhittaker (New Jersey (USA))
Phenol (C_6H_6O)	Carl Roth (Karlsruhe)
Polybrene	Sigma-Aldrich (Steinheim)
poly L-Ornithin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Puromycin dihydrochloride	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI 1640	Gibco (Karlsruhe)
Schwefelsäure (H_2SO_4) 95 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodiumazid (NaN_3)	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
SYBR® Safe DNA gel stain 40000 x	Invitrogen (Karlsruhe)
Tris-Acetat-EDTA (TAE) 50 x	Carl Roth (Karlsruhe)
Taq Puffer 5 x	Promega (Madison (USA))
TMB Substrat Reagenz Set	BD Biosciences (Heidelberg)
Tris ($C_4H_{11}NO_3$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-hydrochlorid ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$) pH 7,5 1 M	Carl Roth (Karlsruhe)
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypanblau ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin EDTA	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)
Uranylacetat ($C_4H_6O_6U$)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Urea (CH_4N_2O)	Carl Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 %	Carl Roth (Karlsruhe)

2.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Alle Puffer, Lösungen und Kulturmedien wurden bis zu ihrer Verwendung, falls von deren Hersteller nicht anders angegeben, bei 4 °C aufbewahrt. Bei allem verwendeten FCS wurden vor dem Einsatz die Komplementfaktoren Hitze inaktiviert (30 min, 56 °C). Lösungen und Medienzusätze wurden wenn nötig sterilfiltriert oder autoklaviert.

Annexin-Binding-Puffer:
1 M HEPES pH 7,4
5 M NaCl
2,5 mM $CaCl_2$

DMEM-Medium für A549 Zellen, HEK293T Zellen, L929 Zellen und 129 WT Makrophagen:
DMEM 41965
10 % (v/v) FCS
2 mM L-Glutamin
0,1 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren
1 mM MEM Sodium-Pyruvat
100 U/ml Penicillin/Streptomycin

DMEM-Medium für SP1 Zellen:
DMEM high Glucose 21068-028
8 % (v/v) Chelex behandeltes FCS (Dazu wurden 50 ml FCS mit 2 g Chelex versetzt und über Nacht bei 4 °C rotiert. Das entkalzifizierte FCS wurde für 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert und sterilfiltriert.)
2 mM L-Glutamin
0,05 mM $CaCl_2$

Einfriermedium:
90 % (v/v) FCS
10 % (v/v) DMSO

ELISA-Assaypuffer (IFN-α (human)):

1 x PBS

2 % (v/v) FCS

0,05 % (v/v) Tween 20

ELISA-Assaypuffer (IFN-α (murin)):

1 x PBS

10 % (v/v) FCS

(0,05 % (v/v) Sodiumazid)

ELISA-Assaypuffer (IL-1β, IL-6, IL-12p40 und IL-12p70 (murin)):

1 x PBS

10 % (v/v) FCS

ELISA-Assaypuffer (IP-10 (murin)):

1 x PBS

1 % (v/v) BSA

ELISA-Beschichtungspuffer (IFN-α, IL-12p40, IL-12p70 (murin)):

0,2 M Natriumphosphat pH 6,5

(12,49 g Na_2HPO_4 und 15,47 g NaH_2PO_4 in H_2O gelöst, pH 6,5 eingestellt und mit H_2O auf 1 l aufgefüllt)

ELISA-Beschichtungspuffer (IL-1β, IL-6 (murin)):

0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5

(7,13 g $NaHCO_3$ und 1,59 g Na_2CO_3 in H_2O gelöst, pH 9,5 eingestellt und mit H_2O auf 1 l aufgefüllt)

ELISA-Waschpuffer:

1 x PBS

0,05 % (v/v) Tween 20

Erylyse:

BD Pharmlyse 1:10 in Aqua Spüllösung

FACS-Puffer:

1 x PBS

2 % (v/v) FCS

Gelatine-Lösung:

0,1 % Gelatine in H_20

HBS (2 x):

4 g NaCl

0,18 g KCl

0,05 g Na_2HPO_4

2,5 g HEPES

0,5 g Glukose

in H_2O gelöst, mit NaOH auf pH 7,1 eingestellt und mit H_2O auf 250 ml aufgefüllt

MACS-Puffer:

1 x PBS

2 % (v/v) FCS

2 mM EDTA

pH 7,2-7,4

poly L-Ornithin-Stammlösung (100 x):

100 mg poly L-Ornithin in 67 ml ddH_2O gelöst (1,5 mg/ml), sterilfiltriert und in 10 ml Aliquots eingefroren

RPMI-Medium für humane Primärzellen:

RPMI 1640

2 % (v/v) humanes AB-Serum

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

RPMI-Medium für murine Primärzellen und RMA Zellen:

RPMI 1640

10 % (v/v) FCS

2 mM L-Glutamin

0,1 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren

1 mM MEM Sodium-Pyruvat

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

Tail-Puffer:

100 mM Tris

5 mM EDTA

0,2 % (v/v) SDS

200 mM NaCl

pH 8,5

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer:

40 mM Tris

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

2.1.5 ELISA (Kits, Antikörper und Enzyme)

Bezeichnung	Hersteller
Donkey Anti-Rabbit $F(ab)^2$-Peroxidase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Human IFN-alpha Module Set	Bender MedSystems (Wien (A))
8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit	StressMarq Biosciences Inc. (Victoria (CA))
Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet	R&D Systems (Minneapolis (USA))
Mouse ELISA Set IL-1β, IL-6, IL-12 (p40), IL-12 (p70)	BD Biosciences (Heidelberg)
MAb to Mouse Interferon-Alpha, neutralizing, Clone RMMA-1	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey (USA))
Mouse Interferon-Alpha A	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey (USA))

PAb to Mouse Interferon-Alpha, Rabbit Serum, neutralizing	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey (USA))

2.1.6 Magnetische Kügelchen (Beads)

Bezeichnung	Hersteller
CD1c (BDCA-1)$^{+}$ Dendritic Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Monocyte Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

2.1.7 FACS-Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Hersteller
Annexin-V-Fluos	Roche (Mannheim)
Cell Titer Blue®	Promega (Madison (USA))
Hoechst H 33258	Hoechst (Frankfurt)

2.1.8 Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Dotap	Carl Roth (Karlsruhe)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
TransIT LT-I	Mirus (Madison (USA))

2.1.9 Inhibitoren

Inhibitor von	Substanz	Hersteller
ATM	KU55933	Tocris (St. Louis (USA))
Cdk2	Cdk2 inhibitor II	Tocris (St. Louis (USA))
JAK3	Janex-1	Cayman Chemical (Ann Arbor (USA))
JNK	SP600125	Tocris (St. Louis (USA))
MAPK (ERK)	UO126	Tocris (St. Louis (USA))
NFAT	Cyclosporin A	Tocris (St. Louis (USA))
NFκB	BAY11-7082	Tocris (St. Louis (USA))
p38	SB202190	Tocris (St. Louis (USA))
PARP1	IQD	Merck (Darmstadt)
PI3K	LY294002	Tocris (St. Louis (USA))
PKC	Gö6850	Tocris (St. Louis (USA))
STAT5	STAT5	Merck (Darmstadt)
SYK	Piceatannol	Tocris (St. Louis (USA))
Vav	6-Thio GTP	Tocris (St. Louis (USA))

2.1.10 Enzyme

Enzym	Hersteller
Ampliscribe T7-Flash Transkription Kit	Epicentre (Madison (USA))
DNase I	Roche (Mannheim)
DreamTaq™ DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Klenow-Fragment Polymerase 1	Fermentas (St. Leon-Rot)
Nuclease P1	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Taq DNA Polymerase	Promega (Madison (USA)), Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.11 Weitere Kits

Kit	Hersteller
innuPREP Micro RNA Kit	Analytic Jena (Jena)
innuPREP PCR pure Kit	Analytic Jena (Jena)

2.1.12 Primer der Genotypisierung

MDA-5-Genotypisierung:

Hec16112r: CTTCTGTTCTTCCTGGGAGACC
Hexon15859f: GGGACTATTGACAGTCGAAGAC
HEC14305: CTTGGCTTCCTCCTAAACTCAG

RIG-I-Genotypisierung:

Primer A: GCATCATCTCTCAGCTGATGAAGGAGA
Primer B: CCTACTACTTTAGGACCCATAGTGGAT
Primer C: CTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTG

2.1.13 shRNA-Sequenzen

Bezeichnung	Vektorhintergrund	Integriertes shRNA-Konstrukt
SHC001	TRC1/1.5	keine integrierte shRNA-Sequenz
SHC002	TRC1/1.5	CCGG**CAACAAGATGAAGAGCACCAA**CTC-GAG**TTGGTGCTCTTCATCTTGTTG**TTTTT
MITA #1	TRC2	CCGG**CAACATTCGATTCCGAGATATCTC**-GAG**ATATCTCGGAATCGAATGTTG**TTTTTG
MITA #2	TRC2	CCGG**AGAGGTCACCGCTCCAAATAT**CTC-GAG**ATATTTGGAGCGGTGACCTC**TTTTTTG
MITA #3	TRC2	CCGG**ATGATTCTACTATCGTCTTAT**CTC-GAG**ATAAGACGATAGTAGAATCA**TTTTTTG

2.1.14 Nukleinsäuren

HPLC-gereinigte ORNs wurden von Biomers (Ulm), Eurogentec (Köln) oder Dharmacon (Chicago (USA)) bezogen. Entsalzene ODNs wurden bei Metabion (Planegg-Martinsried) erworben. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl in DEPC-H_2O in RNase- und DNase-freien Reaktionsgefäßen gelöst und bei - 80 °C oder - 20 °C gelagert.
poly I:C wurde von Invitrogen (Karlsruhe), poly A („polyadenylic acid potassium salt“) und poly dAdT wurden von Sigma-Aldrich (München) bezogen. Sie wurden in einer Endkonzentration von 1 µg/µl in DEPC-H_2O gelöst und in RNase- und DNase-freien Reaktionsgefäßen bei - 20 °C aufbewahrt.
CpG-ODNs wurden von Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert, in 0,9 % NaCl gelöst und bei - 20 °C gelagert.

2.1.15 Verwendete Primärzellen und Zelllinien

A549 Zellen:	humane Lungenkarzinom-Zelllinie
HEK293T Zellen:	humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, bezogen von Invitrogen (Darmstadt)
humane Primärzellen:	isoliert aus Buffy Coats von gesunden Spendern, bezogen vom Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (Bonn)
L929 Zellen:	murine Fibrosarkom-Zelllinie
murine Primärzellen:	isoliert aus Wildtyp-Mäusen oder transgenen Linien
SP1 Zellen:	murine Keratinozyten-Zelllinie (Strickland et al., 1988)
RMA Zellen:	NK-Zellhybridoma ($H2K^b$) (Gays et al., 2000)
129 WT Makrophagen:	aus 129/SV Wildtyp-Mäusen generierte Makrophagen-Zelllinie

2.1.16 Verwendete Mauslinien

Wildtyp:

C57BL/6N und J: Inzuchtstamm mit dem MHC I-Haplotyp $H2K^b$, aus eigener Zucht oder bezogen von Jackson Laboratory

Transgene Linien:

$ASC^{-/-}$: ASC-Gen defiziente Mauslinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Veit Hornung

$MDA\text{-}5^{-/-}$: MDA-5-Gen defiziente Mauslinie, aus eigener Zucht

$NLRP3^{-/-}$: NLRP3-Gen defiziente Mauslinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Veit Hornung

$RIG\text{-}I^{-/-}$: RIG-I-Gen defiziente Mauslinie, aus eigener Zucht

$TLR\text{-}9^{-/-}$: TLR-9-Gen defiziente Mauslinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Limmer

Alle Versuchstiere wurden im „Haus für Experimentelle Therapie“ (HET) oder IMMEI am Universitätsklinikum Bonn unter „specific pathogen free“-Konditionen gezüchtet und gehalten. Die Mäuse waren zu Beginn der Versuche 6-8 Wochen alt.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an Zellkultursterilbanken durchgeführt. Dabei wurden Einmalhandschuhe getragen. Um Kontaminationen sowie Verunreinigungen mit Endotoxinen zu vermeiden, wurden ausschließlich sterile, Endotoxin-freie Verbrauchsmaterialien sowie sterile Lösungen und Medien verwendet.

2.2.2 Kultivierung von Zellen und ihre Passagierung

Die Kultivierung von Primärzellen und Zelllinien erfolgte in CO_2-begasten Brutschränken (5 % CO_2 v/v) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit unter Verwendung der entsprechenden Kulturmedien.
Das käufliche DMEM- und RPMI-Medium enthalten Phenolrot als pH-Indikator, welches bei pH 7,4 eine hellrote Färbung hervorruft. Durch Stoffwechselprozesse der Zellen sinkt der pH-Wert des Mediums und die Färbung wechselt über orange zu gelb. Dieser Farbwechsel erlaubt eine einfache Inspektion der Mediumqualität. Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden in regelmäßigen Abständen, insbesondere bei einer Veränderung der Medienfärbung, mit frischem Medium um den Faktor 5-20 verdünnt.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Vitalität der Zellen wurde mit der Trypanblau-Färbung und die Zelldichte mit der Neubauer Zählkammer (Seitenlänge 1 mm, Tiefe 0,1 mm) bestimmt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der nur von toten Zellen mit defekter Zellmembran aufgenommen und an deren Zellproteine gebunden wird, so dass die nicht gefärbten, lebenden Zellen mikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer gezählt werden können.
Zur Ermittlung der in einer Zellsuspension enthaltenen Lebendzellzahl wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl 0,04 % Trypanblau (1:10 (v/v) Verdünnung der 0,4 % Stocklösung in PBS) gemischt und ein Aliquot davon in die Neubauer Zählkammer gegeben. Bei zu hoher Zelldichte wurde die Zellsuspension noch stärker mit Trypanblau verdünnt (1:2, 1:5, 1:10 oder 1:20). Die vitalen Zellen zweier Großquadrate der Neubauer Zählkammer wurden unter dem Mikroskop bei einer 10-fachen Vergrößerung gezählt. Der Mittelwert der gezählten Zellen in zwei Großquadraten wurde gebildet und die Gesamtzellzahl der Ausgangszellsuspension mit folgender Formel berechnet: Z [Zellen/ml] = N x f x 10^4 mit Z = Zellzahl, N = vitale Zellen in einem Großquadrat und f = Verdünnungsfaktor.

2.2.4 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 0,5-2x10^7 Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen und je 1 ml dieser Lösung in Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden in einem Einfrierbehälter, gefüllt mit kaltem (4 °C) Isopropanol, für mindestens 24 h auf -80 °C gekühlt und anschließend in flüsssigen Stickstoff oder in eine - 150 °C Gefriertruhe zur Endlagerung überführt. Das Auftauen der konservierten Zellsuspensionen wurde rasch bei 37 °C durchgeführt und die Lösung nach dem Auftauen umgehend mit 50 ml des entsprechenden Kulturmediums gewaschen und 10 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert und wie beschrieben propagiert.

2.2.5 Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Blut isoliert. Aufgrund der Dichteunterschiede der zellulären Bestandteile des Blutes trennen sich während des Zentrifugierens über einen Dichtegradienten die verschiedenen Zellen in unterschiedliche Phasen auf. Während die Thrombozyten in der oberen Plasmaphase verbleiben, reichern sich die PBMCs in der Interphase an. Granulozyten sammeln sich in der unteren Schicht des Lymphozytenseparationsmediums. Die Erythrozyten sowie die toten Zellen bilden während des Zentrifugierens ein Zellsediment und sammeln sich unten im Zentrifugenröhrchen. Durch Entnehmen der Interphase können die PBMCs so von den übrigen Zellen getrennt werden.
Blutproben aus Buffy Coats wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen im Verhältnis 1:2 mit 0,9 % NaCl verdünnt. 14 ml Lymphozytenseparationsmedium wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 25 ml verdünntem Blut langsam überschichtet. Anschließend wurden die 50 ml-Zentrifugenröhrchen 20 min bei 800 g und Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch trennte sich das Blut im Lymphozytenseparationsgradienten in die verschiedenen Phasen auf, wobei sich die zu isolierenden PBMCs nun in der Interphase befanden. Diese wurden mit einer Pipette gesammelt und in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit 0,9 % NaCl bis auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 450 g und RT zentrifugiert. Danach wurde das aufgebrochene Zellsediment in 5 ml Erylyse aufgenommen und 5 min

bei RT inkubiert, um Erythrozyten, die möglicherweise die PBMCs verunreinigten, zu lysieren. Es wurde mit 30 ml 0,9 % NaCl gewaschen und nach der Zentrifugation wurden die humanen PBMCs in 50 ml 0,9 % NaCl aufgenommen und gezählt. Für Stimulationsexperimente wurde die Zellzahl auf $4x10^6$ Zellen/ml eingestellt und jeweils 100 µl wurden pro Vertiefung in eine 96-Lochflachbodenplatte gegeben.

2.2.6 Isolation von humanen Monozyten

Monozyten wurden mit einem indirekten magnetischen Markierungssystem („magnetic cell sorting“, MACS), dem Monocyte Isolation Kit II human der Firma Miltenyi Biotec, aus humanen PBMCs isoliert. Bei diesem Verfahren werden bis auf die Monozyten alle anderen Zelltypen der humanen PBMCs, das heißt T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, DCs und basophile Granulozyten, mit Biotin-konjugierten AKs (monoklonale AKs gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glykophorin A) markiert. Anti-Biotin MicroBeads binden an diese AKs, so dass alle markierten Zellen in einer Säule zurückgehalten werden, die in einem Magneten eingespannt ist, während die unmarkierten Monozyten diese passieren und in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden können (Negativselektion).
Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurde bei allen Schritten zur magnetischen Markierung zügig, auf Eis und unter Verwendung gekühlter Lösungen gearbeitet, um ein „Capping“ der AKs auf der Zelloberfläche sowie unspezifische Markierungen zu verhindern. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die PBMCs 10 min bei 1200 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das aufgebrochene Zellsediment in 30 µl MACS-Puffer pro $1x10^7$ Zellen aufgenommen. Zudem wurden 10 µl FcR-Blocking-Reagenz sowie 10 µl Monozyten-Biotin-AK-Cocktail pro $1x10^7$ Zellen zugegeben. Das FcR-Blocking-Reagenz diente dazu, unspezifische Bindungen der AKs an die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Die Zellen wurden gut gemischt und 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin MicroBeads pro $1x10^7$ Zellen wurde erneut gut gemischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit 1-2 ml MACS-Puffer pro $1x10^7$ Zellen und nach 10 min Zentrifugation bei 1200 U/min und 4 °C wurde das aufgebrochene Zellsediment in 500 µl MACS-Puffer pro $1x10^8$ Zellen aufgenommen. Die Zellsupension wurde über einen 30 µm-Nylonfilter auf eine LD-Säule gegeben, die zuvor in einen Magneten (MACS-Separator) eingespannt und mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen worden war. Die markierten Zellen wurden in der Säule zurückgehalten, die unmarkierten Monozyten nicht. Nach zweimaligem Waschen der LD-

Säule mit jeweils 1 ml MACS-Puffer wurde der Durchfluss mit den darin enthaltenen Monozyten zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 0,9 % NaCl gewaschen und anschließend gezählt. In der Regel wurde eine Reinheit von über 98 % erreicht. Für Stimulationsversuche wurde die Zellzahl auf $2x10^6$ Zellen/ml eingestellt und jeweils 100 µl wurden pro Vertiefung in eine 96-Lochflachbodenplatte gegeben.

2.2.7 Isolation von humanen BDCA-1$^+$ dendritischen Zellen

Mit Hilfe des CD1c (BDCA-1)$^+$ Dendritic Cell Isolation Kits der Firma Miltenyi Biotec wurden BDCA-1$^+$ dendritische Zellen (BDCA-1$^+$ DCs) aus PBMCs aufgereinigt. Das BDCA-1-Antigen ist spezifisch auf CD11c^{high}, CD123^{low} DCs exprimiert, welche die größte Gruppe mDCs im humanen Blut darstellen. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers in zwei Schritten, wobei im ersten Schritt CD1c (BDCA-1)-exprimierende B-Zellen mit CD19 Microbeads magnetisch markiert und anschließend über eine MACS-Säule depletiert wurden und im zweiten Schritt die CD1c (BDCA-1)$^+$ mDCs im B-Zell-depletierten Durchfluss nach indirekter Markierung mit CD1c (BDCA-1)-Biotin und Anti-Biotin Microbeads positiv selektioniert wurden.
Gemäß den Herstellerangaben wurden die PBMCs nach Bestimmung der Zellzahl zunächst 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum aufgebrochenen Zellsediment wurden 200 µl MACS-Puffer plus 100 µl FcR-Blocking-Reagenz, 100 µl Anti-CD19 MicroBeads sowie 100 µl CD1c (BDCA-1)-Biotin pro $1x10^8$ Zellen gegeben. Es wurde gut gemischt und 15 min bei 2-8 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 5-10 ml MACS-Puffer pro $1x10^8$ Zellen gewaschen, 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert und in 500 µl MACS-Puffer pro $1x10^8$ Zellen aufgenommen. Die Zellsuspension wurde über einen 30 µm-Nylonfilter auf eine LD-Säule geladen, die zuvor in einem Magneten (MACS-Separator) platziert und mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen worden war. Alle magnetisch markierten CD19$^+$ Zellen wurden nun in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen diese passierten und durch zweimaliges Waschen mit jeweils 1 ml MACS-Puffer aus der Säule herausgespült werden konnten. Diese Zellfraktion war bezüglich CD19$^+$ Zellen depletiert und wurde nach 10 min Zentrifugation bei 300 g und 4 °C in 400 µl MACS-Puffer plus 100 µl Anti-Biotin Microbeads aufgenommen. Es wurde gut gemischt und für 15 min bei 2-8 °C inkubiert. Zum Waschen der Zellen wurden anschließend 5-10 ml MACS-Puffer zugegeben und es wurde 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 500 µl MACS-Puffer pro $1x10^8$ Zellen aufgenommen und über einen 30 µm-Nylonfilter auf eine

MS-Säule geladen, die zuvor in einem MACS-Separator eingespannt und mit 500 µl MACS-Puffer gewaschen worden war. Während die markierten BDCA-1$^+$ DCs in der Selektionssäule zurückgehalten wurden, beinhaltete der Durchfluss die unmarkierte Zellfraktion. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 500 µl MACS-Puffer wurde diese aus dem Magneten entfernt und die gebundenen BDCA-1$^+$ DCs wurden mit 1 ml MACS-Puffer und unter Benutzung eines Säulenstempels aus der Säule eluiert. Um die Reinheit zu erhöhen, wurde die magnetische Separation unter Verwendung einer neuen MS-Säule wiederholt. Abschließend wurden die Zellen einmal gewaschen, dann in Medium aufgenommen und gezählt. Für Stimulationsversuche wurde die Zellzahl auf 1x10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 100 µl wurden pro Vertiefung in eine 96-Lochflachbodenplatte gegeben.

2.2.8 Isolation von humanen Monozyten und Differenzierung zu dendritischen Zellen (MoDCs)

Zur *in vitro*-Generierung von DCs aus humanen Monozyten wurden CD14$^+$ Zellen aus PBMCs unter Verwendung des CD14$^+$ MicroBead Kits der Firma Miltenyi Biotec aufgereinigt, da CD14 spezifisch auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird.
Zur magnetischen Markierung wurden die in ihrer Zellzahl bestimmten PBMCs zunächst 10 min bei 1200 U/min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das aufgebrochene Zellsediment in 80 µl MACS-Puffer pro 1x10^7 Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl CD14 MicroBeads pro 1x10^7 Zellen wurde gut gemischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Zum Waschen wurde MACS-Puffer in einem Volumen von 1-2 ml pro 1x10^7 Zellen hinzupipettiert und 10 min bei 1200 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das aufgebrochene Zellsediment wurde in 500 µl MACS-Puffer pro 1x10^8 Zellen aufgenommen und zur magnetischen Separation über einen 30 µm-Nylonfilter auf eine LS-Säule geladen, die zuvor in einem Magneten (MACS-Separator) eingespannt und mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen worden war. Während die unmarkierten Zellen die Säule passierten, wurden die magnetisch markierten CD14$^+$ Zellen in der Säule zurückgehalten. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wurde die Selektionssäule aus dem Magneten herausgenommen und die positiv selektionierten CD14$^+$ Zellen wurden mit 5 ml MACS-Puffer unter Verwendung eines Stempels aus der Säule eluiert. Die Zellen wurden einmal gewaschen und dann in Cellgrow® DC Medium aufgenommen. Die Zellzahl der isolierten CD14$^+$ Zellen wurde auf 2x10^6 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 5 ml dieser Zellsuspension wurden in Zellkulturflaschen eingesät und 800 U/ml GM-CSF sowie

800 U/ml IL-4 zugegeben, um die Differenzierung der Monozyten zu DCs (MoDCs) zu induzieren. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 für 6-7 Tage, wobei nach 3 Tagen erneut 800 U/ml GM-CSF sowie 800 U/ml IL-4 zugesetzt wurden. Danach wurden die Zellen geerntet und gezählt. Für Stimulationsversuche wurden jeweils $1x10^5$ MoDCs/100 µl pro Vertiefung in eine 96-Lochflachbodenplatte gegeben.

2.2.9 Isolierung von Knochenmarkszellen aus der Maus und Differenzierung zu myeloiden dendritischen Zellen (mDCs)

Aus den Hinterlaufknochen von Mäusen wurden die Knochenmarkszellen isoliert, um diese zu mDCs ausreifen zu lassen.
Dazu wurden nach Tötung der Mäuse durch CO_2-Begasung die Hinterlaufknochen entnommen, die Gelenke der Knochen überdehnt und auseinander gebrochen. Um den Knochenmarkskanal zu eröffnen, wurde an beiden Enden der Knochen jeweils ein kleines Stück entfernt. Mit Hilfe einer mit Medium gefüllten Spritze wurden dann die Knochenmarkszellen aus dem Kanal herausgespült und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1500 U/min und RT zentrifugiert und das aufgebrochene Zellsediment anschließend in 10 ml Erylyse aufgenommen und 5 min inkubiert. Die Erylyse dient der Lysierung der Erythrozyten, beschädigt aber aufgrund ihrer Konzentration keine anderen Zellen. Zum Waschen der Zellen wurde das Zentrifugenröhrchen mit Medium bis auf 50 ml aufgefüllt und 5 min bei 1500 U/min und RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen über ein 40 µm-Zellsieb gegeben und gezählt. Für die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu mDCs wurden jeweils $2x10^5$ Zellen pro Vertiefung in eine 6-Lochbodenplatte ausgesät und in 3 ml Vollmedium mit 3 % GM-CSF für 7 Tage kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und gezählt. Für Stimulationsversuche wurde die Zellzahl auf $2x10^6$ Zellen/ml eingestellt und jeweils 100 µl wurden pro Vertiefung in eine 96-Lochflachbodenplatte gegeben.

2.3 Stimulation von Zellen mit Nukleinsäuren

2.3.1 Transfektion von Nukleinsäuren mit Dotap

Dotap ist ein Reagenz zur Liposomen-vermittelten Transfektion eukaryotischer Zellen, das geeignet ist, um negativ geladene Moleküle wie DNA und RNA in Zellen zu transferieren. Negativ geladene Moleküle bilden dabei mit dem kationischen, liposomalen Transfektionsreagenz spontan stabile Komplexe, die von den Zellen aufgenommen werden und vorwiegend in das Endosom der Zellen gelangen.
2 µl Dotap wurden in 25 µl PBS gegeben und etwa 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden in eine 96-Lochrundbodenplatte 200 ng DNA/RNA in 25 µl PBS vorgelegt und anschließend 25 µl des zuvor verdünnten Dotaps zugegeben. Der Stimulationsansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, wobei sich aus dem kationischen Dotap und den anionischen Nukleinsäuren Komplexe ausbildeten. 45 µl des Nukleinsäure-Dotap-Gemisches wurden auf die Zellen gegeben, die in einer 96-Lochflachbodenplatte in 155 µl Medium ausplattiert waren. Nach 18-24 h Inkubation der stimulierten Zellen bei 37 °C wurden die Überstände entnommen und weiter analysiert bzw. bei - 20 °C eingefroren.

2.3.2 Transfektion von Nukleinsäuren mit Lipofectamine™ 2000

Lipofectamine™ 2000 erlaubt die effiziente Transfektion vieler verschiedener eukaryotischer Zelltypen mit DNA und RNA, auch mit siRNA. Dabei gelangen die transfizierten Nukleinsäuren vorwiegend ins Zytoplasma der Zellen.
Für die Transfektion wurden 0,5 µl Lipofectamine™ 2000 in 25 µl PBS gegeben und etwa 2 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden in eine 96-Lochrundbodenplatte 200 ng DNA/RNA in 25 µl PBS vorgelegt und anschließend 25 µl des zuvor verdünnten Lipofectamines™ 2000 zugegeben. Der Stimulationsansatz wurde 20 min bei RT inkubiert. 45 µl des Nukleinsäure-Lipofectamine™ 2000-Gemisches wurden auf die Zellen gegeben, die in einer 96-Lochflachbodenplatte in 155 µl Medium ausplattiert waren. Nach 18-24 h Inkubation der stimulierten Zellen bei 37 °C wurden die Überstände entnommen und weiter analysiert bzw. bei - 20 °C eingefroren.

2.3.3 Transfektion von Nukleinsäuren mit TransIT-LT1 Transfection Reagent

Mit dem Transfektionsreagenz TransIT-LT1 von Mirus ist es möglich, Nukleinsäuren in das Zytoplasma von Zellen zu transferieren.
Zu 25 µl Optimen-Medium wurden 1,2 µl Mirus gegeben und etwa 5 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden in 25 µl Optimem-Medium 400 ng der zu transfizierenden DNA/RNA pipettiert und anschließend 25 µl des in Optimem-verdünnten Transfektionsreagenzes auf die vorgelegte Nukleinsäure-Lösung gegeben. Der Stimulationsansatz wurde 20 min bei RT inkubiert und anschließend wurden 45 µl des Transfektionsansatzes auf die in 155 µl Medium ausplattierten Zellen gegeben. Die Zellen wurden 18-24 h im Brutschrank inkubiert und dann die Überstände zur weiteren Analyse entnommen bzw. bei - 20 °C eingefroren.

2.3.4 Elektroporation von Nukleinsäuren

Die Elektroporation ist eine weitere Methode, Zellmembranen permeabel zu machen, um so Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Diese Methode ist sehr schnell und eignet sich besonders für Suspensionszellen sowie Zellen, die schwer zu transfizieren sind.
Je $2x10^6$ Zellen wurden in 200 µl Optimem-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 4 mm überführt und die Nukleinsäure wurde in der gewünschten Konzentration hinzupipettiert. Die Elektroporationsküvette wurde im Elektroporator platziert und einem Rechteck-Spannungspuls von 300 V und 6 ms ausgesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 300 g und RT zentrifugiert und anschließend in Medium aufgenommen und ausgesät. Zur Kontrolle wurden auch Zellen ohne Stimulus elektroporiert (Mock-Kontrolle).

2.4 Induktion von oxidativem Stress

2.4.1 UV-Bestrahlung von Zellen und Nukleinsäuren

Zur UV-Bestrahlung von Zellen wurden diese zunächst in einem geringen Volumen in einer Kulturplatte ausgesät. Ein UV-Crosslinker der Firma Peqlab diente der Bestrahlung mit UV-C-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm. Die Kulturplatte wurde in dem Gerät positioniert, der Deckel der Kulturplatte abgenommen und die darin enthaltenen Zellen wurden nach Einstellung der gewünschten UV-C-Dosis in [J/cm^2] bestrahlt. Zur UV-A- und UV-B-Bestrahlung wurde ein Saalmann-UV-Bestrahlungsgerät mit austauschbaren spezifischen UV-A- und UV-B-Filtern verwendet. Die Kulturplatte wurde unter das Handgerät gestellt und die gewünschte Dosis der UV-A- bzw. UV-B-Strahlung in [J/cm^2] bzw. [mJ/cm^2] eingestellt. Sobald die UV-Lampe angeschaltet war, wurde der Deckel der Kulturplatte abgenommen, und bevor die Lampe wieder ausging, wurde er wieder darauf gesetzt. Unter der Sterilwerkbank wurde zu den bestrahlten Zellen in der Kulturplatte Medium gegeben. Zur Kontrolle wurden außerdem unbehandelte Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Zellviabilität überprüft und die genomische DNA aus den Zellen isoliert.
Bei der direkten UV-A-, UV-B- und UV-C-Bestrahlung von Nukleinsäuren wurde gleichermaßen verfahren wie bei der Bestrahlung von Zellen. Die Nukleinsäuren wurden allerdings umgehend nach der Bestrahlung in Stimulationsexperimenten eingesetzt.

2.4.2 H_2O_2-Behandlung von Zellen und Nukleinsäuren

Zur H_2O_2-Behandlung wurden jeweils $5x10^6$-$1x10^7$ Zellen in einer 6-Lochplatte ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen an H_2O_2 (0,1 mM, 1 mM) für 10 oder 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle blieben auch Zellen unbehandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min bei 1200 U/min und 4 °C zentrifugiert und anschließend nochmals mit 1 x PBS gewaschen. Dann wurde die DNA aus den Zellen isoliert.
Zur direkten H_2O_2-Behandlung von Nukleinsäuren wurde die aus unbehandelten Zellen isolierte genomische DNA mit verschiedenen Konzentrationen an H_2O_2 (0,1 µM, 10 µM, 100 µM) für 3 min bei RT inkubiert oder blieb zur Kontrolle unbehandelt. Zur Reinigung

der DNA wurde anschließend eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurden 2/3 Volumen 100 % Ethanol sowie 1/10 Volumen Natriumazetat zur DNA gegeben und für 5 min bei - 80 °C inkubiert. Dann wurde der Ansatz 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes wurden 500 µl 70 % Ethanol zum Waschen der sedimentierten DNA zugegeben. Es wurde erneut 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und die DNA getrocknet. Anschließend wurde die DNA in H_2O aufgenommen und ihre Konzentration für nachfolgende Stimulationsexperimente bestimmt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die DNA bei - 20 °C aufbewahrt.

2.5 Immunfluorometrische Methoden

2.5.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS) ist ein Verfahren zur eindeutigen Identifikation verschiedener Zelltypen anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle („Cluster of Differentiation“, CD). Die FACS-Analyse ermöglicht die Erkennung verschiedener Zellen aufgrund ihrer Größe, ihrer Oberflächenrauhigkeit oder verschiedener extrazellulärer oder intrazellulärer Proteine. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer Eigenschaften von einzelnen Zellen oder Partikeln aus einer Gesamtpopulation. In Suspension befindliche Zellen werden dazu durch eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50-100 µm gepresst. Das dort entstehende laminare Strömungsprofil hat zur Folge, dass sich die Zellen vereinzeln und nacheinander die Kapillare passieren. Der in der Mitte der Kapillare fokussierte Laser trifft auf die Zellen, wodurch der Lichtstrahl abgelenkt wird. Aufgrund des Zellvolumens wird der Lichtstrahl kleinwinklig abgelenkt („Forward Scatter“, FSC, oder „Forward Angle Light Scatter“, FALS). Die Oberflächenrauhigkeit bedingt eine großwinklige Ablenkung des Lichtstrahls („Sideward Scatter“, SSC, oder „Wide Angle Light Scatter“, WALS). Anhand von FSC und SSC lassen sich Zellpopulationen von Zelltrümmern etc. abgrenzen. Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregung) ist bei gewissen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größeren Wellenlängen zu beobachten. Dieses Verhalten, also die Absorption von langwelligem Licht und Emission von kurzwelligem Licht, wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Zelle fluoresziert nach Bindung eines

Fluorochrom (z.B. FITC, PE, APC, PerCp)-konjugierten AKs an Oberflächenantigene oder durch Einbringen eines Gens in die Zelle, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert. Das durch die Lichtanregung des Partikels entstehende analoge Signal wird detektiert und durch einen nachgeschalteten Analog-Digitalwandler für die Analyse mit dem Computer und eine geeignete Software aufbereitet. Verwendet wurden das Durchflusszytometer LSR II der Firma BD Biosciences mit der Software FACS Diva. Die Auswertung wurde mit der Software Flowjo durchgeführt.

2.5.2 Markierung von Oberflächenantigenen

Für die Messung mit dem Durchflusszytometer wurden $2x10^5$ Zellen in eine 96-Lochrundbodenplatte (FACS-Array) gegeben, bei 1500 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit der benötigten Menge des AK gefärbt. Dieser wurde in etwa 20 µl FACS-Puffer aufgenommen und auf die Probe gegeben. Während einer Inkubation von 20 min bei 4 °C band der AK an die entsprechenden Oberflächenantigene. Zur Entfernung nicht gebundenen AK wurden anschließend 200 µl FACS-Puffer zugegeben, es wurde bei 1500 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die folgende FACS-Analyse wurden die Proben in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion mit Annexin-V-Fluos

Mit Hilfe der Markierung von Zellen mittels Annexin-V-Fluos und durchflusszytometrischer Analyse kann man apoptotische und nekrotische Zellen erkennen. Phosphatidylserin findet sich normalerweise auf der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin-V-Fluos ist ein Ca^{2+}-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Durch den Verlust ihrer Membranintegrität binden nekrotische Zellen ebenfalls Annexin. Zur zusätzlichen Differenzierung der apoptotischen von nekrotischen Zellen empfiehlt sich daher die Anwendung eines DNA-Farbstoffs, der nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen passieren kann, z.B. Propidium-Iodid.

18-24 h nach UV-Exposition wurden je $2x10^5$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt, 5 min bei 1200 U/min und RT zentrifugiert, noch einmal mit 1 x PBS gewaschen und dann nach Verwerfen des Überstandes in 100 µl Annexin-Binding-Puffer plus 0,25 µl Annexin-V-Fluos aufgenommen, wobei der Annexin-Binding-Puffer eine Lösung ist, die 1 M HEPES pH 7,4, 5 M NaCl und 2,5 mM $CaCl_2$ enthält. Die FACS-Röhrchen wurden geschwenkt und 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 5 min bei 1200 U/min und RT zentrifugiert, dann in 0,5 ml Annexin-Binding-Puffer aufgenommen und erneut 5 min bei 1200 U/min und RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und die Zellen wurden dann in 100 µl Hoechst 33258, gelöst in Annexin-Binding-Puffer und mit einer Endkonzentration von 0,1 µg/100 µl, aufgenommen. Der Annexin-V-Fluos Assay wurde umgehend mit dem Durchflusszytometer gemessen.

2.5.4 Messung der Zellviabilität mit CellTiter-Blue

Der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay der Firma Promega eignet sich zur Proliferations- und Zytotoxitätsbestimmung von Zellen in Zellkultur. Das CellTiter-Blue®-Reagenz enthält den blauen Redoxfarbstoff Resazurin und wird im Verhältnis 1:10 direkt auf die Zellkultur pipettiert. Nach Zugabe des Reagenz setzen metabolisch aktive Zellen, also lebende Zellen, Resazurin in den pink-farbenen, fluoreszenten Farbstoff Resorufin um. Sterbende Zellen verlieren hingegen innerhalb kurzer Zeit ihre metabolische Aktivität und erzeugen somit kein fluoreszentes Signal. Die Messung des Signals erfolgt nach 1-4 h Inkubation. Das Fluoreszenzsignal entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Das Signal kann im ELISA-Reader bei 570 nm detektiert werden.
Der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay wurde verwendet, um die Viabilität von Zellen 18-24 h nach der Stimulation mit Nukleinsäuren oder nach UV-Bestrahlung zu bestimmen. Dazu wurde 1/10 Volumen CellTiter-Blue®-Reagenz direkt in den Zellüberstand gegeben und durch leichtes Schütteln der Kulturplatten mit dem Kulturmedium gemischt, so dass dieses blau gefärbt wurde. Es wurde 1-4 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellkulturüberstände der unbehandelten Zellen eine pinke Färbung aufwiesen, der in der CellTiter-Blue®-Reagenz enthaltene, blaue Redoxfarbstoff Resazurin also von den unbehandelten Zellen komplett in den pink-farbenen, fluoreszenten Farbstoff Resofurin umgesetzt worden war. Die Fluoreszenzsignale wurden im ELISA-Reader bei 570 nm gemessen. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurde das CellTiter-Blue®-Reagenz auch in Vertiefungen gegeben, in denen keine Zellen ausgesät worden waren,

sondern sich nur Medium befand. Dieser Wert wurde von den Fluoreszenzwerten der ausplattierten Zellen subtrahiert.

2.6 Zytokinmessung

2.6.1 Elisa zur Bestimmung der murinen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70 und IP-10

Mit Hilfe des „Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay“ (ELISA) lassen sich die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Zytokine unter Verwendung von AKs, die diese Zytokine spezifisch binden, quantitativ nachweisen. Dem Verfahren des Sandwich-ELISA liegt folgendes Prinzip zugrunde: über Erstantikörper, mit denen die 96-Loch-ELISA-Platte beschichtet ist, werden bestimmte Zytokine gebunden. Ein Zweitantikörper, an dessen Fc-Teil ein Farbstoffsubstrat umsetzendes Enzym (Peroxidase) gekoppelt ist, bindet an ein zweites Epitop des an den Erstantikörper gebundenen Zytokins. Nach Zugabe eines Substrats, das von diesem Enzym umgesetzt wird, schlägt die zuvor farblose Lösung in eine blaue Lösung um. Diese Farbreaktion kann durch Zugabe von 2 N H_2SO_4 abgestoppt werden, wodurch die Farbe des Substrats von blau nach gelb umschlägt. Die Farbintensität kann in einem ELISA-Reader gemessen werden und erlaubt einen Rückschluss auf die Konzentration des im Zellüberstand enthaltenen Zytokins.
Zur Messung der murinen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70 und IP-10 wurde die 96-Loch-ELISA-Platte mit je 50 µl Erstantikörper-Lösung gegen das nachzuweisende Zytokin pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4 °C (IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70) bzw. RT (IP-10) inkubiert. Als Beschichtungspuffer für den IL-1β- und IL-6-ELISA wurde eine 0,1 M Natriumcarbonat-Lösung mit pH 9,5, für den IL-12p40- und IL-12p70-ELISA eine 0,2 M Natriumphosphat-Lösung mit pH 6,5 und für den IP-10-ELISA 1 x PBS verwendet. Nach Ausklopfen der Platte zur Entfernung der AK-Lösung wurde die Platte einmal (IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70) bzw. dreimal (IP-10) mit 150 µl Waschpuffer (1 x PBS mit 0,05 % Tween 20) pro Vertiefung gewaschen. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurden anschließend pro Vertiefung jeweils 50 µl Assay-Puffer (1 x PBS mit 10 % FCS (IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70) bzw. mit 1 % BSA (IP-10)) gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 50 µl der Proben wurden in der gewünschten Verdünnung in die beschichteten

Vertiefungen der 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert. Eine 8-punktige 1:2 Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Standardzytokins inklusive Leerkontrolle wurde angefertigt und ebenfalls jeweils 50 µl pro Vertiefung auf die Platte aufgetragen, um abschließend die im Zellkulturüberstand enthaltenen Zytokine quantitativ bestimmen zu können. Die Proben sowie das Standardzytokin wurden dazu mit dem jeweiligen Assay-Puffer verdünnt. Nach 2 h Inkubation bei RT wurden die Überstände wieder aus der ELISA-Platte entfernt und es wurde fünfmal (IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70) bzw. dreimal (IP-10) gewaschen. Im Falle des IL-6-, IL-12p40- und IL-12p70-ELISA wurden danach 50 µl einer Zweitantikörper/HRP-Konjugatlösung („horse radish peroxidase“) pro Vertiefung zugegeben und 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Falle des IL-1β- und IP-10-ELISA wurde dagegen zunächst nur der Detektionsantikörper in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung für 1 h (IL-1β) bzw. 2 h (IP-10) aufgetragen und erst dann nach dreimaligem Waschen für weitere 30 min 50 µl der HRP-Konjugatlösung. Der Zweitantikörper band an das zuvor gebundene Zytokin und das HRP-Konjugat an den Zweitantikörper. Nach Entfernung der (Zweitantikörper/)HRP-Konjugatlösung und siebenmal Waschen konnte der ELISA entwickelt werden. Dazu wurden 50 µl Substratlösung pro Vertiefung pipettiert und die ELISA-Platte im Dunkeln bei RT etwa 15 min inkubiert. Das Substrat wurde enzymatisch umgesetzt und es entstand eine Blaufärbung. Bei ausreichender Blaufärbung wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N H_2SO_4 pro Vertiefung abgestoppt. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei 450 und 570 nm gemessen. Die gemessene Absorption diente der Berechnung der Zytokinkonzentration in den analysierten Zellkulturüberständen.

2.6.2 ELISA zur Bestimmung des murinen IFN-α

Zur quantitativen Bestimmung des in Zellkulturüberständen und Seren enthaltenen murinen IFN-α wurde die 96-Loch-ELISA-Platte mit je 50 µl Erstantikörper-Lösung pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dazu wurde der Erstantikörper RMMA-1 (1 mg/ml) 1:1000 in 0,2 M Natriumphosphat-Beschichtungspuffer mit pH 6,5 verdünnt. Nach Ausklopfen der Platte zur Entfernung der AK-Lösung wurde die ELISA-Platte dreimal mit 150 µl Waschpuffer (1 x PBS mit 0,05 % Tween 20) pro Vertiefung gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung jeweils 150 µl Assay-Puffer (PBS mit 10 % FCS und 0,05 % Sodiumazid) gegeben und 3 h bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen der ELISA-Platte mit 150 µl Waschpuffer pro Vertiefung wurden die Proben und der Standard aufgetragen. Bei der

Analyse von Zellkulturüberständen wurden jeweils 50 µl derselben unverdünnt in die beschichteten Vertiefungen der 96-Loch-ELISA-Platte pipettiert. Seren wurden 1:2 oder 1:3 verdünnt aufgetragen. Eine 8-punktige 1:2 Verdünnungsreihe des rekombinanten IFN-α-Standards (10^5 U/ml) inklusive Leerkontrolle wurde angefertigt, wobei der höchste Standard durch 1:200 Verdünnung einer Konzentration von 5347 pg/ml entsprach. Die Verdünnungsreihe wurde mit dem Medium angesetzt, das auch zur Kultivierung der Zellen in dem auszuwertenden Experiment verwendet worden war. Es wurden jeweils 50 µl pro Vertiefung auf die Platte aufgetragen. Die Inkubation des Standards und der Proben erfolgte für mindestens 16 h bis maximal 2 Tage bei 4 °C. Nach Entfernung der Überstände wurde die ELISA-Platte dreimal gewaschen und ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-IFN-α-Detektionsantikörper in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung auf die ELISA-Platte aufgetragen. Dazu wurde der Detektionsantikörper (80 NU/µl) 1:1000 in Assay-Puffer (1 x PBS mit 10 % FCS und 0,05 % Sodiumazid) verdünnt. Während der 3 h Inkubation bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C band der Detektionsantikörper an das zuvor gebundene IFN-α. Nach Entfernen der Detektionsantikörper-Lösung wurde die ELISA-Platte fünfzehnmal mit 150 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen und ein HRP-konjugierter Zweitantikörper aufgetragen, der wiederum an den Detektionsantikörper band. Bei dem HRP-konjugierten Zweitantikörper handelt es sich um eine Esel-anti-Kaninchen-F(ab)^2-Peroxidase, die 1:10000 in Assay-Puffer (1 x PBS mit 10 % FCS ohne Sodiumazid) verdünnt wurde und in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung auf die ELISA-Platte pipettiert wurde. Es wurde 3 h im Dunkeln und bei RT auf dem Schüttler inkubiert und danach zwölfmal gewaschen. Zur Entwicklung des ELISA wurden 50 µl Substratlösung pro Vertiefung pipettiert und die ELISA-Platte im Dunkeln bei RT 5-30 min inkubiert, bis die ersten fünf Standardverdünnungen anhand der Blaufärbung zu erkennen waren. Dann wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 2 N H_2SO_4 pro Vertiefung abgebrochen. Die Farbintensität wurde umgehend im ELISA-Reader bei 450 und 570 nm gemessen. Anhand der Konzentrationen des Standards und deren Absorption konnte die IFN-α-Konzentration in den analysierten Zellkulturüberständen bzw. Seren bestimmt werden.

2.6.3 ELISA zur Bestimmung von humanem IFN-α

Zur Bestimmung von humanem IFN-α in Zellkulturüberständen wurde ein ELISA verwendet, dessen Protokoll zur Durchführung von dem unter „2.6.1 Elisa zur Bestimmung der murinen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-12p70 und IP-10“ beschriebenen Protokoll etwas abwich. Nachdem die ELISA-Platte über Nacht bei 4 °C mit je 50 µl eines in 1 x PBS verdünnten Erstantikörpers pro Vertiefung beschichtet worden war, wurde sie ausgeklopft und unspezifische Bindungsstellen mit jeweils 50 µl Assay-Puffer (1 x PBS mit 2 % FCS und 0,05 % Tween) pro Vertiefung für 1 h bei RT abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (1 x PBS mit 0,05 % Tween 20) wurden dann gleichzeitig mit den verdünnten Proben (50 µl) und der Standardreihe (50 µl) 25 µl der HRP-Konjugat-Lösung pro Vertiefung auf die ELISA-Platte aufgetragen und es wurde 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die ELISA-Platte dreimal gewaschen, das Substrat zugegeben und mit 2 N H_2SO_4 die Farbreaktion abgestoppt, um die Farbintensität zu detektieren.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Genotypisierung von Mäusen

Durch den Nachweis spezifischer Gene in der chromosomalen DNA ist es möglich, Mäuse zu genotypisieren.

Die genomische DNA wurde hierzu aus Schwanzbiopsien der Mäuse isoliert. Zur Probengewinnung wurden ca. 0,5 cm von den Schwanzspitzen der Mäuse mit einer Schere abgesetzt und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in 500 µl Tail-Puffer und 2,5 µl Proteinase K (20 µg/µl) über Nacht (mindestens 6-7 h) bei 55 °C inkubiert. Währenddessen löste sich das Gewebe auf. Der Suspension wurden 500 µl Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1 zugegeben und es wurde gut gemischt. Durch Zentrifugation bei 14000 g und RT für 10 min bildeten sich zwei Phasen, wobei die wässrige obere Phase die DNA enthielt und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurde (ca. 300 µl). Anschließend wurde das doppelte Volumen an 100 % Ethanol hinzugefügt, über Kopf geschüttelt und für maximal 2 min bei 14000 g und RT zentrifugiert. Dadurch sammelte sich die DNA als Sediment am Boden des

Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die DNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abpipettiert worden war, wurde die isolierte DNA bei 37 °C getrocknet und dann in einem geeigneten Volumen (ca. 200 µl) Tris/H_2O aufgenommen. Um die DNA vollständig zu lösen, wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurde eine qualitative Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die verdünnte DNA bei - 20 °C gelagert.

2.7.2 Qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) wird lineare DNA (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) durch eine DNA-Polymerase spezifisch amplifiziert. Zu den grundlegenden Komponenten der PCR gehören: die DNA, die den zu vervielfältigenden Bereich, das so genannte Template, enthält, zwei synthetisch hergestellte ODNs (Primer), die auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen und somit den zu vervielfältigenden Bereich begrenzen, eine hitzestabile DNA-Polymerase zur Replikation des festgelegten Abschnitts, ODNs als Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang, Mg^{2+}-Ionen für die Funktionsfähigkeit der DNA-Polymerase sowie eine Pufferlösung, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellt. In Anwesenheit dieser Komponenten wird die zwischen den Primern liegende Sequenz des Templates in der PCR vervielfältigt. Die PCR läuft dabei in drei verschiedenen Stufen ab:

1. Bei der Denaturierung schmilzt durch Erhitzen des Reaktionsansatzes das doppelsträngige Template zu Einzelsträngen auf.
2. Beim Annealing hybridisieren die Primer spezifisch an das Template.
3. Bei der Elongation beginnt die von den Primern ausgehende Strangsynthese.

Dieser Zyklus wird mehrmals wiederholt, wobei das synthetisierte DNA-Fragment für die folgenden Amplifikationen als Matrize dient. Die Amplifikation der zwischen den Primern liegenden Sequenz verläuft daher exponentiell (Kettenreaktion).
Zur Genotypisierung von MDA-5-defizienten Mäusen wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt, die es erlaubt, in nur einem PCR-Ansatz Wildtyp-Mäuse von hetero- bzw.

homozygoten MDA-5-defizienten Mäusen zu unterscheiden. Ein Reaktionsansatz aus 1 µl Template (ca. 25-200 ng/µl DNA), 2,5 µl Primer Hec16112r (10 µM) und je 1,25 µl der beiden Primer Hexon15859f (10 µM) und HEC14305 (10 µM), 0,25 µl Taq Polymerase, 0,5 µl dNTPs (10 mM), 5 µl 5 x Taq Puffer, 0,8 µl $MgCl_2$ (50 mM) und 12,45 µl H_2O wurde auf Eis zusammenpipettiert und anschließend im PCR-Block mit folgendem Programm gestartet:

94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	Zyklus 30 x
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
4/15 °C		

Bei der Analyse der per PCR amplifizierten Genabschnitte auf einem Agarosegel konnten homozygote MDA-5-defiziente Mäuse anhand einer spezifischen DNA-Bande bei 450 bp identifiziert werden, während die der Wildtyp-Mäuse bei 255 bp lag und heterozygote Tiere beide Banden aufwiesen.

Zur Genotypisierung von homozygoten RIG-I-defizienten Mäusen wurden zwei PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Primerpaaren benötigt. Zum Nachweis des Wildtyp-Allels wurden die Primer A und B verwendet, zum Nachweis des mutierten Allels der Primer B in Kombination mit dem Primer C. Der Reaktionsansatz aus 1 µl Template (ca. 25-50 ng/µl DNA), je 0,5 µl der entsprechenden Primer, 0,125 µl DreamTaq Polymerase, 0,5 µl dNTPs (10 mM), 2,5 µl 10 x DreamTaq Puffer und 19,9 µl H_2O wurde auf Eis zusammenpipettiert und im PCR-Block mit folgendem Programm gestartet:

94 °C	10 min	
94 °C	30 sec	Zyklus 35 x
67 °C	60 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	10 min	
4 °C		

Jeweils beide Ansätze wurden nach der PCR mittels gelelektrophoretischer Auftrennung analysiert. Wildtyp-Mäuse wiesen nur nach Verwendung des Primerpaars A/B eine Bande von 1,2 kb auf, homozygote RIG-I-defiziente Mäuse hingegen nur nach Verwendung des Primerpaars B/C und heterozygote Tiere in beiden Ansätzen.

2.7.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem innuPREP PCRpure Kit der Firma Analytik Jena nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Dabei wird zunächst ein Bindungspuffer zum PCR-Reaktionsansatz gegeben, damit die PCR-Fragmente an einen Säulenfilter binden. Anschließend werden sie mit einem dafür vorgesehenen Puffer eluiert.
Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Ethanolpräzipitation, bei der den PCR-Produkten 3 Volumen 100 % Ethanol sowie 1/10 Volumen Natriumazetat zugesetzt wurden. Der Ansatz wurde gut gemischt, für 5 min bei - 80 °C inkubiert und anschließend 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 500 µl 70 % Ethanol zum Waschen der sedimentierten PCR-Produkte zugegeben. Es wurde erneut 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sediment getrocknet. Anschließend wurden die PCR-Produkte in H_2O aufgenommen und nach Bestimmung ihrer Konzentration bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C aufbewahrt.

2.7.4 Isolation von genomischer DNA aus Zellen

Zur Isolation von genomischer DNA aus Zelllinien wurden maximal $1x10^7$ Zellen pro Ansatz eingesetzt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 x PBS gewaschen und 5 min bei 1200 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das aufgebrochene Pellet in 500 µl Tail-Puffer plus 2,5 µl Proteinase K (20 µg/µl) aufgenommen und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß unter leichtem Schütteln mindestens 2 h bei 55 °C inkubiert. Es wurde weiter verfahren nach dem Protokoll zur Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien, das unter „2.7.1 Genotypisierung von Mäusen“ beschrieben wurde. Die isolierte DNA wurde in reinem H_2O aufgenommen. Nach photometrischer Bestimmung ihrer Konzentration und Reinheit wurde sie bis zu ihrer weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

2.7.5 Isolation von totaler RNA aus Zellen

Die Zellen, aus denen die RNA gewonnen werden sollte, wurden sedimentiert. Der Überstand wurde komplett verworfen, das Zellsediment in 1 ml Trizol aufgenommen und bei - 80 °C eingefroren. Das RNA-enthaltende Trizol wurde aufgetaut mit 200 µl Chloroform vermischt, 15 s geschüttelt und für 2 min bei RT inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 12000 g und 4 °C bildeten sich zwei Phasen, wobei sich in der wässrigen oberen Phase die RNA befand. Diese Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, das bereits 500 µl Isopropanol enthielt. Das Gemisch wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend erneut 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1,4 ml 75 % Ethanol bei 8400 U/min und 4 °C für 5 min gewaschen. Danach ließ man den Rest-Ethanol unter dem Abzug abdampfen. Die sedimentierte RNA wurde in 20 µl DEPC-H_2O aufgenommen und die Konzentration bestimmt. Alternativ wurde die RNA mit dem innuPREP Micro RNA Kit der Firma Analytik Jena nach Angaben des Herstellers gewonnen. Dabei erfolgt zunächst die Lyse des Ausgangsmaterials mit anschließender selektiver Entfernung der genomischen DNA. Dann wird die RNA an einen Säulenfilter gebunden, gewaschen und eluiert. Die extrahierte, hochreine RNA kann für alle gängigen nachfolgenden Anwendungen genutzt werden.

2.7.6 *In vitro*-Transkription

Bei der *in vitro*-Transkription wird mit einer T7-RNA-Polymerase RNA mit einem 5'-Triphosphat (3-P-RNA) hergestellt. Die T7-RNA-Polymerase synthetisiert die RNA dabei ausgehend vom 5'-Ende in Richtung des 3'-Ende. Dazu benötigt sie ein Template, das die komplementäre Sequenz der zu synthetisierenden RNA sowie einen ds T7-Polymerase-Promotor besitzt. Das Template wurde aus zwei ODNs hergestellt, wobei das initiale Nukleotid der RNA ein Guanosin sein sollte, um die Ausbeute zu erhöhen (Abbildung 2.1). Jeweils 2 µl der DNA-Einzelstränge (3' und 5', 100 pmol/µl) wurden mit 1 µl 10 x DNA-Hybridisierungspuffer und 5 µl DEPC-H_2O zusammengegeben, auf 70 °C erhitzt und 5 min inkubiert. Während der Reaktionsansatz anschließend bei RT bis auf 22 °C langsam abkühlte, hybridisierte die DNA zu einem Doppelstrang.

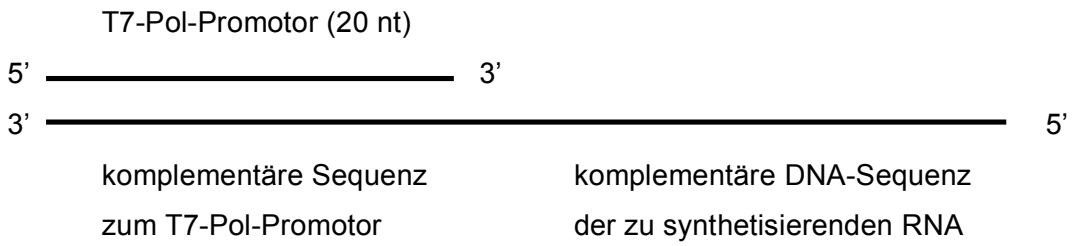


Abbildung 2.1: Template für die T7-RNA-Polymerase-Reaktion zur Herstellung von 3-P-RNA.
Durch Hybridisieren zweier ODNs wird das Template hergestellt. Ein ODN besitzt die Sequenz des T7-Pol-Promotors (T7-Polymerase-Promotor), das andere ODN hat am 3'-Ende die zum T7-Pol-Promotor komplementäre Sequenz und am 5'-Ende die komplementäre Sequenz der zu synthetisierenden RNA.

Für die Klenow-Reaktion wurden zu der hybridisierten DNA 2 µl 10 x Klenow-Puffer, 5 µl DEPC-H_2O, 2 µl dNTP-Mix (100 mM) und 1 µl Klenow-Fragment (Polymerase 1) zugegeben. Es wurde 30 min bei 37 °C im Brutschrank und anschließend 10 min bei 70 °C inkubiert.

Die RNA-Synthese wurde nach den Herstellerangaben mit dem Epicentre AmpliScribe T7 Transcription Kit angesetzt. Gemäß dem Protokoll wurden 2 µl Template nach der Klenow-Reaktion, 7,2 µl Nukleotide (je 1,8 µl ATP, CTP, GTP, UTP, 100 mM), 2 µl Enzym-Mix (mit rekombinanter T7-Polymerase), 2 µl 10 x Puffer, 2 µl DTT (Dithiothreitol) und 4,8 µl DEPC-H_2O zusammengegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit, in der die RNA synthetisiert wurde, wurde 1 µl RNase-freie DNase I zugesetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert, um das enthaltene DNA-Template zu verdauen.

Zur Entfernung von Verunreinigungen wie z.B. Salzen oder überschüssigen Nukleotiden wurde die RNA über eine Mini Quick Spin-Säule gegeben. Dazu wurde das Füllmaterial der Säule zunächst nach unten geschleudert, der Deckel und das Endstück mit einem Öffner entfernt, die Säule in einem 2 ml-Reaktionsgefäß platziert und 2 min bei 1000 g und RT ohne Bremse zentrifugiert, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde das Produkt der *in vitro*-Transkription in einem Volumen von 50 µl auf die Säule pipettiert. Es wurde erneut 4 min bei 1000 g und RT zentrifugiert. Dabei blieben kleine Moleküle wie Salze und Nukleotide in der Säule zurück und im Durchfluss befand sich nur die reine RNA. Die Reinheit und die Konzentration der RNA wurden photometrisch bestimmt und letztere auf 1 µg/µl eingestellt. Die 3-P-RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

2.7.7 Doppelsträngige Oligodesoxynukleotide (dsODNs)

dsODNs wurden durch Zusammengabe der ssODNs generiert. Dazu wurden die ODNs in einer Konzentration von 1 µg/µl in gleichen Mengen (w/w) zusammengegeben und kurzzeitig auf 95 °C erhitzt. Durch das Erhitzen und das anschließende langsame Abkühlen sollte eine optimale Zusammenlagerung der ODNs gewährleistet sein und die ODNs aufgrund ihrer Sequenz hybridisieren. Sofort im Anschluss wurden die ODNs für die Transfektion verwendet.

2.7.8 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung misst man die optische Dichte bei λ = 260 nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Der Extinktionskoeffizient von DNA beträgt 47, der von RNA 40, da eine OD_{260} von 1 47 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA entspricht. Bestimmt man nun photometrisch die optische Dichte (OD_{260}) einer Nukleinsäurelösung, so ergibt sich nach Multiplikation mit dem Extinktionskoeffizienten ε und einem möglichen Verdünnungsfaktor nach der Formel von Lambert Beer für die Konzentration c der Nukleinsäure:

$$c\ [\mu g/ml] = OD_{260} \times \varepsilon \times \text{Verdünnungsfaktor}.$$

Da für eine weitere Verwendung auch die Reinheit der Nukleinsäure von Bedeutung ist, wird auch die Konzentration an Proteinen in der Lösung bestimmt. Dazu wird die optische Dichte bei λ = 280 nm (OD_{280}), dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Setzt man die Maxima in Relation zueinander (OD_{260}/OD_{280}), so erhält man eine Aussage über den Grad an kontaminierenden Proteinen in der Lösung. Eine reine DNA-Lösung sollte ein Verhältnis von 1,8 und eine reine RNA-Lösung von 2,0 aufweisen. Liegt der Wert unterhalb, ist die Probe mit Protein, Phenol und/oder anderen aromatischen Substanzen kontaminiert.

Um die DNA- bzw. RNA-Konzentration der Nukleinsäurelösungen zu bestimmen, wurde mit einem Nanodrop 1000 Spectrophotometer die Absorption bei 260 und 280 nm von 1-2 µl der betreffenden Nukleinsäurelösung gemessen. Das Gerät gab dann die ermittelte DNA- bzw. RNA-Konzentration in [ng/µl] an sowie deren Reinheit in Form des Quotienten A_{260}/A_{280}.

2.7.9 Agarose-Gelelektophorese

Zum Nachweis der Integrität und Länge von Nukleinsäuren vor allem zur Analyse von PCR-Produkten bedient man sich der Methode der Agarose-Gelelektrophorese. Dabei werden DNA-Fragmente, mit einem Dichte erhöhenden Ladepuffer gemischt, in Vertiefungen einer festen Gelmatrix aus Agarose pipettiert und in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wandert aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrates bei neutralem pH-Wert in diesem Feld von der Anode zur Kathode. Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Agarosegel hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab: erstens von der Agarosekonzentration des Gels, denn je höher die eingesetzte Menge an Agarose ist, desto feinmaschiger ist das als Molekularsieb fungierende Polymer, zweitens von der elektrischen Spannung des Gels, weil die Laufgeschwindigkeit proportional zur Spannung steigt, drittens der Größe der DNA, da kleine Fragmente schneller als große wandern, und viertens von der Konformation der DNA. So zeigen z.B. unverdaute Plasmide bei gelelektrophoretischer Auftrennung drei Banden unterschiedlicher Stärke, da relaxierte DNA, die durch einen Einzelstrangbruch ihre superhelikale Struktur verloren hat, am langsamsten wandert, gefolgt von der durch Doppelstrangbruch linearisierten DNA und der sehr kompakten superhelikalen DNA. Der Nachweis der durch Gelelektrophorese erhaltenen Fragmente erfolgt mittels SYBR® Safe DNA gel stain, einer weniger mutagenen Alternative zur Ethidiumbromid-Färbung. An Nukleinsäuren gebunden weist das grün-fluoreszierende SYBR® Safe DNA gel stain eine maximale Fluoreszenzanregung bei 280 und 502 nm auf und ein Emissionsmaximum bei 530 nm.

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurde 1 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und zusammen mit 100 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle ca. 90 s aufgekocht. Der Erlenmeyerkolben mit der Agaroselösung wurde kurz geschwenkt und dann wurde nochmals kurz aufgekocht, bis eine homogene Lösung entstand. Diese wurde in einen Elektrophoreseschlitten gegossen, in den vorher ein Kamm zur Aussparung der Probentaschen eingesetzt worden war. 2,5 µl SYBR® Safe DNA gel stain (40000 x) wurden gleichmäßig darin verteilt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten in eine mit 1 x TAE gefüllte Kammer gelegt. In die Taschen wurden dann 1-10 µl der DNA-Proben gegebenenfalls zusammen mit 1/6 Volumen bromphenolhaltigen Ladepuffers (6 x) pipettiert, so dass man besser verfolgen konnte, wo sich die DNA während des Laufes befand, und damit die DNA durch Erhöhung der Dichte in den Taschen nach unten sank. Um die ungefähre Größe der erhaltenen Banden auf dem Gel später abschätzen zu können, wurden zusätzlich 4-6 µl

Größenstandard in einer Extratasche auf das Gel aufgetragen, da sich das Molekulargewicht der DNA-Fragmente anhand der Laufstrecke im Gel relativ zu der Laufstrecke von parallel aufgetragenen DNA-Fragmenten bekannten Molekulargewichts berechnen lässt. Die Elektrophorese wurde für etwa 45 min bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Abschließend wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt und mit einer digitalen Kamera fotografiert.

2.7.10 Einbau und Nachweis von 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OH-dG) in Nukleinsäuren

Um 8-OH-dG in DNA zu inkorporieren, wurde eine beliebig ausgewählte 1,5 kB lange DNA-Sequenz unter Zugabe unterschiedlicher Mengen an 8-Hydroxy-2-desoxyguanosintriphosphat (8-OH-dGTP) mit der Phusion DNA-Polymerase per PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 10 µl 5 x Puffer mit $MgCl_2$, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl entsprechend vorverdünntem 8-OH-dGTP, je 2,5 µl der beiden Primer, 1 µl Template (< 10 ng), 0,5 µl Phusion-Polymerase und 31,5 µl H_2O zusammen. Unter Verwendung des folgenden Programms wurde die PCR im Thermocycler durchgeführt:

98 °C	1 min	
98 °C	10 sec	Zyklus 25 x
60 °C	30 sec	Zyklus 25 x
72 °C	45 sec	Zyklus 25 x
72 °C	10 min	
8 °C		

Anschließend wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch analysiert, aufgereinigt und es wurde deren Konzentration bestimmt.

Mit Hilfe der *in vitro*-Transkription wurde 3-P-RNA mit unterschiedlichen Mengen an 8-Hydroxy-guanosintriphosphat (8-OH-GTP) synthetisiert. Dabei wurde wie unter „2.7.6 *In vitro*-Transkription“ beschrieben vorgegangen mit der Erweiterung, dass beim Schritt zur RNA-Synthese 8-OH-GTP in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde.

Um das in Nukleinsäuren gezielt inkorporierte 8-OH-dG bzw. 8-OH-G quantitativ nachzuweisen, wurde das 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit der Firma StressMarq Biosciences Inc. verwendet. Des Weiteren konnte mit dem Kit überprüft werden, inwieweit diese Basenmodifikation auch durch UV-Strahlung in genomischer DNA gebildet wurde.

Generell kann mit dem 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit 8-OH-dG als freies Nukleosid oder in Nukleinsäuren inkorporiert in Urin-, Plasma-, Zellkultur- sowie anderen Proben quantitativ bestimmt werden. Das Kit basiert auf dem Prinzip, nach dem das in einer Probe enthaltene 8-OH-dG mit einem 8-OH-dG-Acetylcholinesterase (AChE)-Konjugat (8-OH-dG-Tracer) um die Bindung an einen monoklonalen 8-OH-dG-AK konkurriert. Weil die Konzentration des 8-OH-dG-Tracer im Gegensatz zu der des 8-OH-dG konstant ist, ist die Menge des an den monoklonalen 8-OH-dG-AK bindenden 8-OH-dG-Tracer umgekehrt proportional zur Konzentration des 8-OH-dG in der Probe. Der 8-OH-dG-AK ist dabei in der Lage, sowohl freies als auch in der DNA inkorporiertes 8-OH-dG zu binden. Neben seiner 100 %igen Bindungsspezifität an 8-OH-dG weist er auch eine 23 %ige Spezifität für 8-Hydroxyguanosin (8-OH-G) sowie 8-Hydroxyguanin auf. Die Spezifität für Guanosin ist mit < 0,01 % hingegen vernachlässigbar. Der AK-8-OH-dG-Komplex bindet an einen polyklonalen Ziege-anti-Maus IgG-AK, mit dem die ELISA-Platte beschichtet ist. Zur Entfernung ungebundener Reagenzien wird die ELISA-Platte gewaschen und Ellmann's Reagenz wird zugegeben. Ellmann's Reagenz enthält Acetylthiocholin, das Substrat für die Acetylcholinesterase, sowie 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure. Durch die Hydrolyse von Acetylthiocholin durch die Acetylcholinesterase entsteht Thiocholin. Das Produkt der nicht-enzymatischen Reaktion von Thiocholin mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure ist 5-Thio-2-nitrobenzoesäure, welche eine gelbe Färbung besitzt und bei 412 nm absorbiert. Die Farbintensität, die photometrisch bestimmt werden kann, ist proportional zur Menge an gebundenem 8-OH-dG-Tracer in der Vertiefung der ELISA-Platte. Diese wiederum ist umgekehrt proportional zur Menge des freien 8-OH-dG in der analysierten Probe:

$$\text{Absorption} \propto [\text{gebundener 8-OH-dG-Tracer}] \propto 1/\,[\text{8-OH-dG}].$$

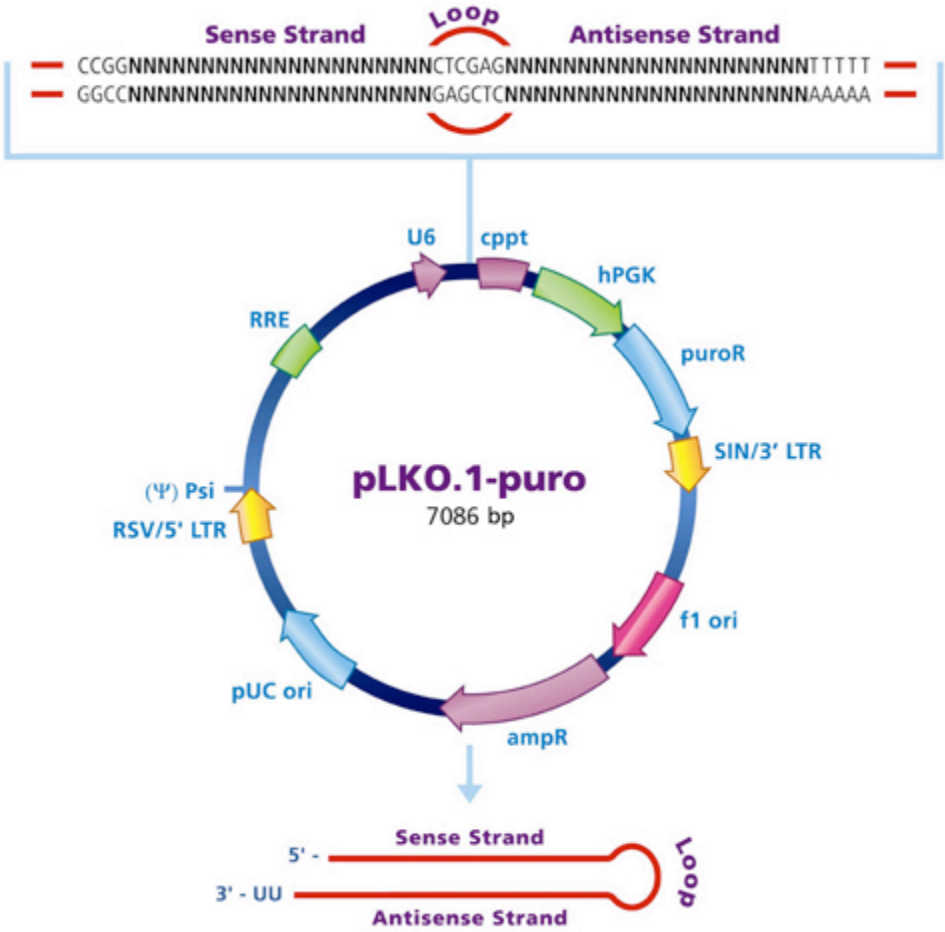
Gemäß den Herstellerangaben wurden die Nukleinsäuren zunächst mit der Nuclease P1 enzymatisch behandelt. Die Nuclease P1 hydrolysiert 3'-5'-Phosphodiesterbrücken in RNA und Hitze-denaturierter DNA sowie 3'-Phosphomonoesterbrücken in Mono- und Oligonukleotiden mit einer 3'-Monophosphatgruppe ohne Basenspezifität. Dazu wurden 2,5 µg Nukleinsäure mit Natriumacetat-Puffer (30 mM, pH 5,3) in einem Volumen von 23 µl zuerst 5 min bei 95 °C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl Nuclease P1 (1 mg/ml) 1 h bei 50 °C. Zur Dephosphorylierung wurden 5 µl 10 x FD-Puffer, 19 µl H_2O und 1 µl alkalische Phosphatase hinzupipettiert, 30 min bei 37 °C und weitere 10 min bei 95 °C inkubiert. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis aufbewahrt. Je 50 µl der Proben wurden pro Vertiefung auf die im Kit enthaltene, vorbeschichtete ELISA-Platte aufgetragen. 50 µl 8-OH-dG-Tracer sowie 50 µl monoklonaler 8-OH-dG-AK wurden zugegeben. Da die genaue Konzentration des in der Probe enthaltenen 8-OH-dG bzw. 8-OH-G nicht bestimmt werden musste, wurde keine Standardreihe mitgeführt. Zum

Nachweis möglicher unspezifischer Bindungen des 8-OH-dG-Tracer wurden zur Kontrolle jedoch in einer Vertiefung nur 50 µl 8-OH-dG-Tracer und 100 µl EIA-Puffer aufgetragen („Non-Specific Binding“, NSB). Um die Maximalmenge des 8-OH-dG-Tracer zu bestimmen, die vom monoklonalen 8-OH-dG-AK in Abwesenheit von 8-OH-dG bzw. 8-OH-G gebunden werden kann, wurden außerdem in eine weitere Vertiefung 50 µl 8-OH-dG-Tracer plus 50 µl monoklonaler 8-OH-dG-AK und 50 µl EIA-Puffer pipettiert („Maximum Binding“, B_0). Zur Detektion der durch das Ellmann’s Reagenz verursachten Hintergrundabsorption blieb eine zusätzliche Vertiefung auf der ELISA-Platte zunächst leer („Blank“, Blk). Die Proben wurden 18 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die ELISA-Platte wurde fünfmal mit je 150 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Zur Entwicklung der ELISA-Platte wurden 200 µl frisch angesetztes Ellmann’s Reagenz in jede Vertiefung gegeben. Die ELISA-Platte wurde bei RT im Dunkeln 90-120 min auf einem Schüttler inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die Absorption der ELISA-Platte bei einer Wellenlänge zwischen 405 und 420 nm photometrisch bestimmt. Sobald die Absorption der B_0-Kontrolle zwischen 0,3 und 1,0 A.U. nach Abzug des Leerwerts lag, wurde auch die Absorption der Proben detektiert. Überschritt die Absorption der Proben einen Wert von 2,0 A.U., musste die ELISA-Platte gewaschen werden, frisches Ellmann’s Reagenz zugegeben werden und erneut entwickelt werden. Bei der anschließenden Auswertung wurde zuerst die gemessene Absorption der Blk-Kontrolle von der Absorption der übrigen Proben subtrahiert. Die Mittelwerte der Absorptionen der NSB-Kontrollen sowie der B_0-Kontrollen wurden gebildet und der NSB-Mittelwert vom B_0-Mittelwert subtrahiert (korrigierter B_0). Der NSB-Mittelwert wurde außerdem von den Absorptionswerten der Proben subtrahiert und es wurde durch den korrigierten B_0 geteilt. Durch Multiplikation mit 100 ergab sich das Verhältnis aus der Absorption einer spezifischen Probe zu der Absorption der korrigierten B_0-Kontrolle in Prozent (% B/B_0).

2.8 Virologische Methoden

2.8.1 Herstellung von lentiviralen shRNA-Vektoren

Das Prinzip der RNA-Interferenz basiert auf dem Mechanismus, dass durch kurze ds RNA-Moleküle endo- oder exogenen Ursprungs eine Degradation der komplementären zellulären RNA induziert wird und die Translation des entsprechenden Proteins reprimiert wird. Um einen gezielten „knockdown“ eines Gens in eukaryotischen Zellen zu erreichen, bietet sich der Einsatz von „short hairpin RNA“ (shRNA)-Konstrukten in lentiviralen Vektoren an. Die shRNA-Konstrukte, die aus einem „sense“-Strang, einem „Loop“-kodierenden Bereich und einem „antisense“-Strang bestehen, werden nach der Transduktion innerhalb der Zelle exprimiert, zu Haarnadelstrukturen gefaltet und von der zelleigenen Endonuklease Dicer zu aktiven siRNAs von 21-23 Nukleotiden Länge prozessiert. Diese werden über den RLC („RISC-loading complex“) auf den RISC („RNA-induced silencing complex“) geladen. Während der „sense“-Strang der siRNA gespalten wird, verbleibt der „antisense“-Strang im RISC und leitet ihn zur komplementären Ziel-RNA. Die katalytische Komponente des RISC (Argonaute Ago2) spaltet dann die Ziel-RNA. Im Gegensatz zu chemisch synthetisierten siRNAs wird shRNA in den Zellen kontinuierlich exprimiert und bleibt folglich über einen langen Zeitraum in der Zellpopulation erhalten, was zu einer stabilen Suppression des Genprodukts führt.
Die lentiviralen Konstrukte wurden als Glycerinstocks der TRC1-shRNA-Bibliothek entnommen, die freundlicherweise von Prof. Dr. Veit Hornung zur Verfügung gestellt wurde. Sequenzen, die nicht in dieser Bibliothek vorhanden waren, stammten aus der TRC1.5- oder TRC2-Bibliothek und wurden in die AgeI- und EcoRI-Schnittstellen des Genomplasmids pLKO.1 kloniert. Der pLKO.1 Vektor ist ein HIV-1 basierter lentiviraler Vektor, der für transiente und stabile Transfektionen von shRNA sowie für die Produktion von viralen Partikeln geeignet ist (Addgene Plasmid 8453, Bob Weinberg) (Stewart et al., 2003) (Abbildung 2.2).



Name	Beschreibung
U6	U6 Promoter
cppt	zentraler polypuriner Teil
hPGK	humane Phosphoglyceratkinase eukaryotischer Promoter
puro R	Puromycin-Resistenzgen für Säuger-Selektion
SIN/3' LTR	3' selbst inaktivierendes „long terminal repeat“
f1 ori	f1 Replikationsursprung
ampR	Ampizillin-Resistenzgen für bakterielle Selektion
pUC ori	pUC Replikationsursprung
5' LTR	5' „long terminal repeat“
Psi	RNA-Verpackungssignal
RRE	Rev „Response“-Element

Abbildung 2.2: Der lentivirale Plasmidvektor pLKO.1-puro und seine Elemente.
Modifiziert nach http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html#pLKO.

Für die Produktion der Lentiviren wurden das Genomplasmid pLKO.1 mit der shRNA-Sequenz, das Verpackungsplasmid psPAX2 der zweiten Generation (Addgene Plasmid 12260, Didier Trono) sowie das Hüllplasmid pMD2.G (Addgene Plasmid 12259, Didier Trono) mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode in HEK293T Zellen transfiziert.
Dazu wurden zuerst Petrischalen mit poly L-Ornithin beschichtet, um die Adhärenz der für die Virusproduktion dienenden HEK Zellen an die Polystyroloberfläche zu erhöhen. Dazu wurden jeweils 5 ml 1:100 in H_2O verdünntes poly L-Ornithin (100 x Stammlösung) pro 10 cm-Petrischale gegeben und anschließend wieder abgesaugt. Die Schalen wurden dann 2-3 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert und danach dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Optional wurden 5 ml Gelatine-Lösung in die Schalen gegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Absaugen der Gelatine wurde einmal mit 1 x PBS gewaschen. Je $4x10^6$ HEK Zellen wurden in die mit poly L-Ornithin beschichteten Petrischalen in einem Volumen von 10 ml ausgesät. Dabei war zu beachten, dass die Ausgangskultur der HEK Zellen nicht dichter als 90 % war, um eine hohe Transfektionsrate zu gewährleisten. Nach 24 h wurden die HEK Zellen mit Lentiviren transfiziert, wobei 1-2 h vor der Transfektion das Medium gewechselt wurde. Optimalerweise waren die HEK Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50-70 % konfluent. Der Transfektionsansatz pro 10 cm-Petrischale setzte sich aus 20 µg lentiviralem Plasmid (pLKO.1), 15 µg Verpackungsplasmid (psPAX2), 6 µg Hüllplasmid (pMD2.G) und optional 0,2 µg GFP-Plasmid (pMAX-GFP) als Transfektionskontrolle zusammen und wurde mit H_2O auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Es wurden 62,5 µl 2 M $CaCl_2$ zugegeben. Der Ansatz wurde gevortext und dabei 500 µl 2 x HBS tropfenweise hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10-20 min bei RT wurde der Ansatz tropfenweise auf den HEK Zellen verteilt. Anschließend wurden die HEK Zellen bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. 8-12 h (maximal 24 h) später erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 10 ml warmem 1 x PBS gewaschen und dann wurde erneut 10 ml warmes Medium zugegeben. 24 h nach der Transfektion wurde die GFP-Expression überprüft. 48 h danach fand die Virusernte durch Abnahme des Zellüberstandes statt. Da sich die HEK Zellen in den mit poly L-Ornithin beschichteten Petrischalen nicht ablösten, konnte mit Medium nachgefüttert werden und nach 24 h konnten erneut Viren geerntet werden. Der Überstand wurde 5 min bei 800 g und RT zentrifugiert, um diesen von Zellen zu befreien, durch einen 0,45 µm-Filter gepresst und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei - 80 °C gelagert.

2.8.2 Herstellung von transduzierten Zelllinien

Um adhärente Zellen wie z.B. 129 WT Makrophagen mit den Lentiviren zu infizieren, wurden diese dünn in Zellkulturschalen in einem Volumen von 10 ml ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium abgenommen. 2-5 ml Lentiviren-Überstand und 10 µl Polybrene (8 mg/ml Stock) wurden mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und in die Zellkulturschale mit den Zellen gegeben. Die MOI betrug ca. 1. Eine Schale wurde als untransduzierte Kontrolle mitgeführt. Nach 24 und 48 h erfolgte ein Mediumwechsel. Bei letzterem wurde das Selektionsantibiotikum Puromycin zugegeben. Seine Konzentration wurde so gewählt, dass untransduzierte Zellen nach 3-5 Tagen starben. Bei 129 WT Makrophagen waren dies 2-5 µg/ml Puromycin. Die transgenen Zellen wurden für 5 Tage unter Selektion gehalten und dann in Stimulationsexperimenten eingesetzt. Dazu wurden je $2x10^4$ Zellen/150 µl pro Vertiefung in eine 96-Lochflachbodenplatte gegeben und bis zur Stimulation 24 h später bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.9 Maus *in vivo* Versuche

50 µg genomische DNA bzw. 20 µg eines DNA-Oligonukleotids wurden mit Dotap im Verhältnis 1:2 und in einem Volumen von 600 µl komplexiert. Das Nukleinsäure-Dotap-Gemisch wurde der Versuchsmaus mittels einer 1 ml-Einmalspritze in die Schwanzvene injiziert (i.v.). Nach 4 und 6 h wurde der Maus unter Isofluran-Betäubung mit Hilfe einer Glaspasteurpipette Blut aus dem Augenhintergrund entnommen und in Microtainer Röhrchen gesammelt. Durch Zentrifugation der Microtainer Röhrchen trennte sich das Serum von den restlichen zellulären Bestandteilen ab und sammelte sich im Überstand. Bis zur weiteren Analyse wurde das Serum bei - 20 °C gelagert.

2.10 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der hier gezeigten Versuche wurden jeweils in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Wurden Experimente weniger als dreimal durchgeführt, ist dies in der zugehörigen Bildunterschrift erwähnt. Stimulationen und Zytokinbestimmungen wurden stets in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind als arithmetrisches Mittel mit Standardabweichung des Mittelwerts („standard error of mean“, SEM) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitige Student’s t-Test verwendet (*=$p \leq 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 UV-Strahlung induziert dosisabhängig Apoptose

Absorption von UV-Strahlung über die Haut ist in der Lage, das Immunsystem in vielfältiger Weise zu beeinflussen. Einerseits kann UV-Strahlung inflammatorische Immunmechanismen aktivieren, andererseits lokale aber auch systemische Immunsuppression bewirken. Die Ursache hierfür liegt in der Fähigkeit des UV-Lichts, Biomoleküle in der Haut zu ionisieren und diese chemisch zu verändern (Maverakis et al., 2010). Diese UV-induzierten chemischen Reaktionen können für den Organismus sowohl nützlich als auch schädlich sein. Ein Beispiel für die nützliche, ja sogar lebensnotwendige Wirkung stellt die Bildung von Pro-Vitamin D_3 aus 7-Dehydrocholesterol dar (Maverakis et al., 2010). Andererseits übt sie als exogener Stressor auch eine Reihe von schädlichen Wirkungen auf den Organismus aus, indem sie bestimmte Biomoleküle und Zellstrukturen, wie z.B. die DNA, Zellmembranen und Enzyme, verändert. Neben zellulären Reparatursystemen für geschädigte Proteine und Nukleinsäuren stellt Apoptose einen weiteren Schutzmechanismus des Körpers gegen UV-Licht bedingte Schäden dar (Batista et al., 2009). Die UV-induzierte Schädigung bewirkt eine Erhöhung des p53-Proteins, eines Tumorsuppressors, durch den eine p53-abhängige Apoptose eingeleitet wird (van den Oord et al., 1994). UV-induzierte Apoptose kann aber auch p53-unabhängig durch membrangetriggerte Signaltransduktionswege ablaufen (Kulms et al., 2002; Leverkus et al., 1997). Durch Apoptose kann malignen Transformationen entgegengewirkt werden, andererseits können dadurch aber auch nukleäre Antigene freigesetzt werden, welche potentiell autoreaktive Immunantworten induzieren oder verschärfen können (Maverakis et al., 2010).

Um ein *in vitro*-Zellkultur-Modell für die immunstimulatorischen vs. immunsupressiven Auswirkungen von UV-Strahlung zu etablieren, wurde zunächst untersucht, in welchem Maße UV-Strahlung als pro-apoptotischer Stimulus die Vitalität von RMA Zellen beeinflusst. Hierfür wurden RMA Zellen mit UV-C-Licht in Dosen von 0-1000 mJ/cm^2 bestrahlt und anschließend für 18-24 h weiter kultiviert. UV-C-Strahlung wirkte dosisabhängig zytotoxisch, was mit Hilfe des CellTiter-Blue-Test® (Promega) quantifiziert wurde (Abbildung 3.1 A). Ab einer Strahlendosis von 250 mJ/cm^2 war eine signifikante Reduktion der Zellviabilität festzustellen. Weniger als 40 % der Zellen waren noch metabolisch aktiv. Bei einer Strahlendosis von 1000 mJ/cm^2 waren es nur noch 10 %.

Mit einer Annexin-V-Fluos-Färbung 18-24 h nach der Bestrahlung der Zellen konnte zusätzlich die Induktion von Apoptose in Abhängigkeit von der Strahlendosis nachgewiesen werden (Abbildung 3.1 B). Die Bestrahlung mit UV-C-Licht in einer Dosis von 250 mJ/cm^2 führte zu etwa 40 % Annexin-V-Fluos$^+$ gefärbter Zellen, in einer Dosis von 500 mJ/cm^2 zu etwa 60 % und in einer Dosis von 1000 mJ/cm^2 zu etwa 90 %. Dies bestätigte die Ergebnisse des CellTiter-Blue-Tests.

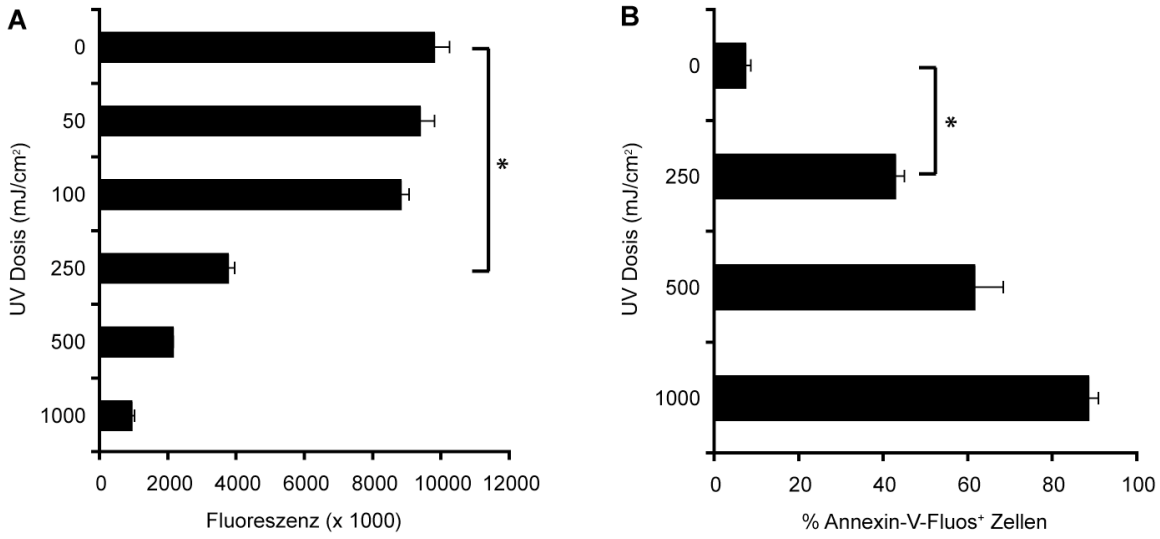


Abbildung 3.1: Dosisabhängige Induktion von Apoptose durch UV-Strahlung.
RMA Zellen wurden mit UV-C-Licht in Dosen von 0-1000 mJ/cm^2 bestrahlt und nach 18-24 h Inkubation wurden die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test (A) sowie die Rate apoptotischer Zellen mit der Annexin-V-Fluos-Färbung (B) bestimmt. Der Mittelwert ± SEM (n=3) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test berechnet (*=$p \leq 0{,}05$).

Die DNA-Fragmentierung ist ein für die späte Apoptose typischer Vorgang, bei dem es zu einer Spaltung des Chromatins zwischen den Nukleosomen durch spezifische Endonukleasen kommt. Dadurch entstehen DNA-Bruchstücke von etwa 200 bp und deren Vielfache.

In der in Abbildung 3.2 dargestellten gelelektrophoretischen Auftrennung der genomischen DNA zeigten RMA Zellen 18 h nach der Bestrahlung mit UV-C-Licht in den Dosen 250 und 1000 mJ/cm^2 eine deutliche DNA-Leiter („DNA-Laddering") mit Banden in Abständen von jeweils etwa 200 bp als Zeichen der stattgefundenen Apoptose. Unbestrahlte RMA Zellen wiesen dagegen nur intakte genomische DNA auf, die sich wegen ihrer Größe am oberen Ende des Gels befand.

In den folgenden Experimenten wurden RMA Zellen mit den hier etablierten Parametern als Zielzellen für UV-Bestrahlungen verwendet.

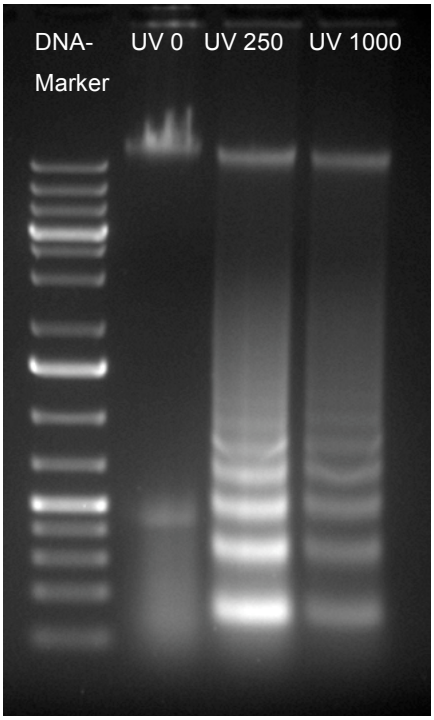


Abbildung 3.2: Elekrophoretische Auftrennung isolierter DNA aus normalen Zellen (hochmolekulare DNA) und aus UV-bestrahlten Zellen (DNA-Leiter).
RMA Zellen wurden mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 250 und 1000 mJ/cm^2 bestrahlt und nach 18 h Inkubation wurde deren genomische DNA aufgereinigt. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden 3 µg DNA plus 1/6 Volumen Ladepuffer auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen. Der Marker (GeneRuler 1 kB Plus DNA Ladder) wurde in einem Volumen von 6 µl auf das Gel aufgetragen.

3.2 UV-Strahlung induziert dosisabhängig IL-6

UV-Strahlung kann im Rahmen einer Immunaktivierung Entzündungsreaktionen in der Haut auslösen. Zu den vielfältigen Mechanismen zählt die vermutlich durch DNA-Schäden induzierte Sekretion von Zytokinen und Chemokinen durch Zellen, die der UV-Strahlung direkt ausgesetzt sind. *In vivo* sekretieren Keratinozyten daraufhin Botenstoffe wie IL-1, IL-6, TNF-α und VEGF, um Lymphozyten zu aktivieren und in die Haut zu rekrutieren (Maverakis et al., 2010).
Ob solche Zytokine auch von RMA Zellen infolge einer Bestrahlung mit UV-C-Licht in Dosen von 0-1000 mJ/cm^2 ausgeschüttet wurden, wurde 18-24 h später mittels ELISA geprüft. In den Überständen der UV-bestrahlten RMA Zellen konnten nur sehr geringe Mengen IL-6 nachgewiesen werden, wobei mit steigender Strahlendosis, die auf die

Zellen eingewirkt hatte, auch mehr IL-6 sekretiert wurde (Abbildung 3.3). Ab einer Strahlendosis von 250 mJ/cm^2 war die IL-6-Induktion signifikant erhöht.

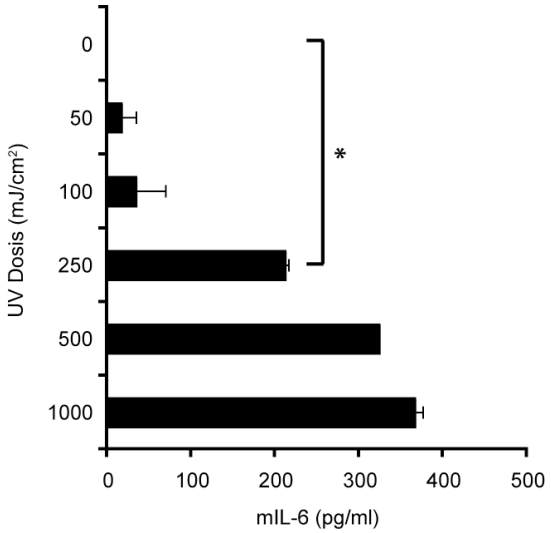


Abbildung 3.3: Dosisabhängige Induktion von IL-6 durch UV-Strahlung.
RMA Zellen wurden mit UV-C-Licht in Dosen von 0-1000 mJ/cm^2 bestrahlt und nach 18-24 h Inkubation wurde in den Überständen die Sekretion von IL-6 mit ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test bestimmt (*=p≤0,05).

3.3 UV-bestrahlte Zellen haben eine immunsuppressive Wirkung auf kokultivierte murine mDCs

In den meisten Situationen wirkt UV-Strahlung immunsuppressiv und löst dabei eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte aus. Langerhans Zellen, deren Funktion in der Haut darin besteht, als Antigen-präsentierende DCs T-Zellen zu stimulieren (Stingl et al., 1978), sind sehr sensitiv gegenüber UV-Strahlung. Als Folge kommt es zu Induktion von Apoptose (Meunier et al., 1995), zunehmender Migration in die Lymphknoten (Dandie et al., 1998; Vink et al., 1996) sowie Veränderungen ihres Oberflächenphänotyps, die einhergehen mit einer drastisch reduzierten Expression von Oberflächenmolekülen wie MHC II, ICAM und B7 und ihrem Funktionsverlust, Antigene zu präsentieren (Aberer et al., 1981; Dandie et al., 1998; Weiss et al., 1995). Die veränderten Langerhans Zellen stimulieren außerdem T-Lymphozyten vom regulatorischen Typ und induzieren Anergie oder Deletion von T_H1-Zellen (Simon et al., 1994). Darüber hinaus bewirkt UV-Strahlung, dass in die Haut infiltrierende Makrophagen sowie Keratinozyten das anti-

inflammatorische Zytokin IL-10 sekretieren (Enk et al., 1995; Kang et al., 1994) und trans-Urocaninsäure in ihr cis-Isomer umgewandelt wird, das ebenfalls immunsuppressive Eigenschaften besitzt (De Fabo and Noonan, 1983).

Welche Wirkung UV-bestrahlte RMA Zellen auf APCs haben und inwieweit sich das Zytokinmilieu infolge der UV-Bestrahlung verändert, sollte in Kokulturansätzen mit murinen mDCs und RMA Zellen untersucht werden. Zum Vergleich wurde außerdem das Zytokinmuster in Kokulturen nach Stimulation der RMA Zellen mit immunstimulatorischen Nukleinsäuren analysiert. Die Stimulation von Zellen mit Nukleinsäuren kann über Signalwege der zytosolischen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zu einer anti-tumoralen oder pro-apoptotischen Antwort führen (Goubau et al., 2009). So induziert poly I:C, ein synthetischer Ligand des zytosolischen Nukleinsäurerezeptors MDA-5, infolge seiner zytosolischen Erkennung IFN-α und andere pro-inflammatorische Zytokine, wobei letztere auch durch Detektion von poly I:C über den endosomalen TLR3 induziert werden können. Da es sich bei RMA Zellen um schwer zu transfizierende Suspensionszellen handelt, wurde poly I:C per Elektroporation in die Zelle eingebracht. Die RMA Zellen wurden zuerst ohne Nukleinsäure (mock), mit der nicht-stimulatorischen RNA poly A oder poly I:C elektroporiert oder alternativ mit UV-C-Licht in Dosen von 250 und 1000 mJ/cm^2 bestrahlt und dann mit mDCs, die aus Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert worden waren, im Verhältnis 1:1 kokultiviert. Die IFN-α-, IL-6-, IL-12p40- und IL-12p70-Produktion in den Mischkulturen wurde nach 18-24 h Inkubation mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurden die Überstände der unbehandelten, elektroporierten oder UV-bestrahlten RMA Zellen untersucht.

Allein die Behandlung mit poly I:C induzierte eine IFN-α-Produktion in RMA Zellen (Abbildung 3.4 A). Diese IFN-α-Antwort nach Stimulation mit Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren war universell in allen murinen Zelllinien zu beobachten und kein spezielles Phänomen der RMA Zellen, wie weiterführende Experimente zeigten. Aus dem Vergleich der IFN-α-Menge in den Überständen von RMA Zellen und Kokulturansätzen ließ sich folgern, dass das IFN-α in den Kokulturexperimenten hauptsächlich von den RMA Zellen stammen musste (Abbildung 3.4 B). Die Messung der anderen pro-inflammatorischen Zytokine zeigte, dass die poly I:C-Elektroporation darüber hinaus auch eine geringe Menge IL-6 in den RMA Zellen induzierte (< 5000 pg/ml), die UV-Bestrahlung ebenfalls (Abbildung 3.4 C). RMA Zellen produzierten jedoch weder IL-12p40 (Abbildung 3.4 E) noch IL-12p70 (Daten nicht aufgeführt).

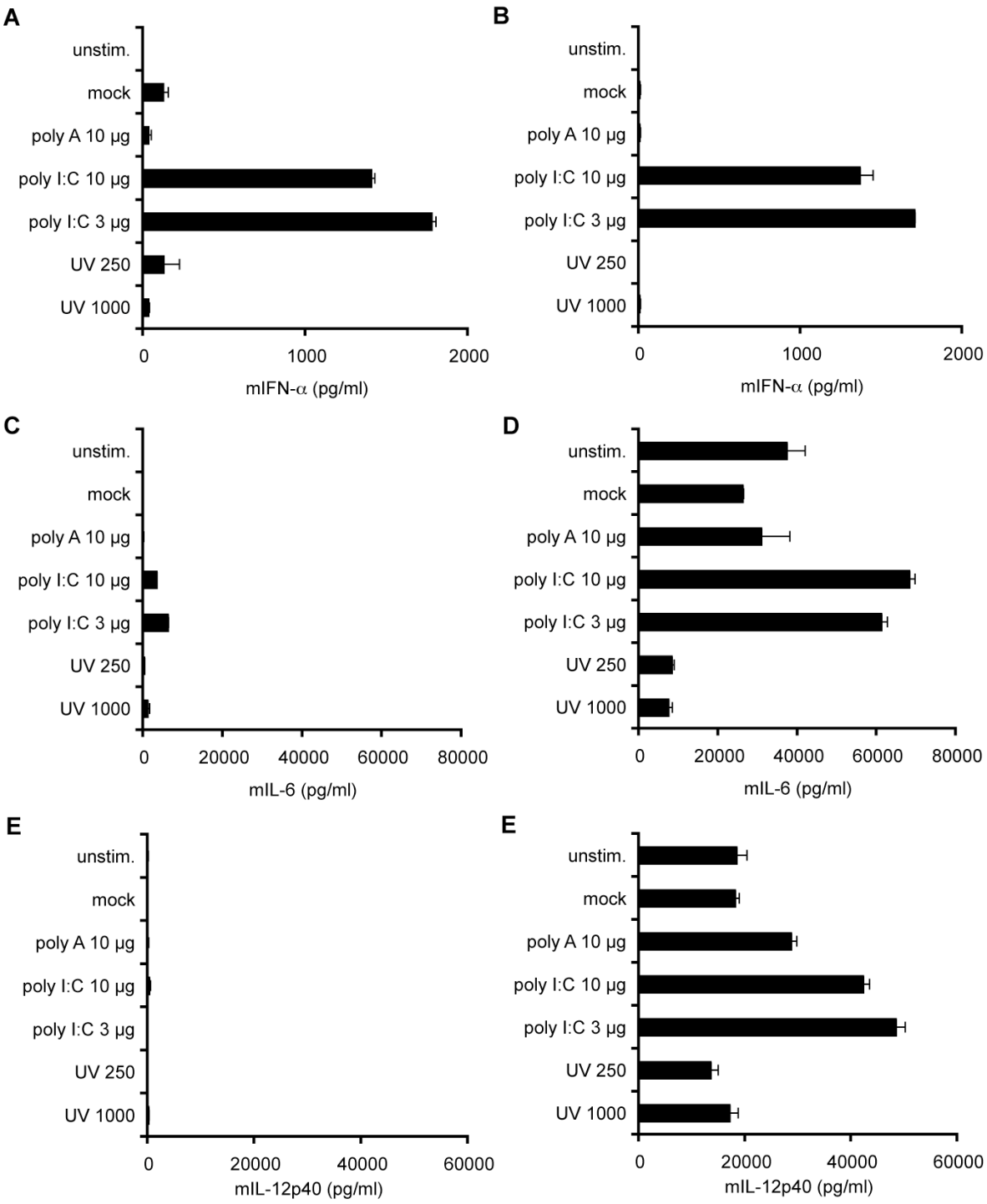


Abbildung 3.4: UV-bestrahlte Zellen induzieren weniger und mit poly I:C elektroporierte Zellen induzieren mehr IL-6 und IL-12p40 in Kokultur mit murinen mDCs.

RMA Zellen wurden mock, mit poly A oder poly I:C elektroporiert oder alternativ mit UV-C-Licht bestrahlt (250 oder 1000 mJ/cm^2) und allein (A, C, E) oder mit murinen Wildtyp-mDCs in Kokultur (B, D, F) für 18-24 h inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf IFN-α (A, B), IL-6 (C, D) und IL-12p40 (E, F) untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

In Kokultur induzierten RMA Zellen IL-6 (Abbildung 3.4 D) und IL-12p40 (Abbildung 3.4 F) jedoch kein IL-12p70 (Daten nicht aufgeführt), wobei poly I:C elektroporierte RMA Zellen deutlich mehr IL-6 und IL-12p40 induzierten als anders behandelte RMA Zellen. UV-bestrahlte RMA Zellen waren nicht immunogener als unbehandelte Zellen und induzierten weniger IL-6 und IL-12p40 als diese. Während die Stimulation der RMA Zellen mit poly I:C also zu einer Immunaktivierung führte, unterdrückte die UV-Bestrahlung die Immunantwort.

3.4 UV-Strahlung generiert immunogene RNA-Spezies, die IFN-α in murinen mDCs induzieren

Es stellte sich die Frage, inwieweit eine Immunaktivierung oder Immunsuppression neben dem Zytokinmilieu auch durch die zellulären Nukleinsäuren der behandelten RMA Zellen vermittelt wird. Dazu wurde die RNA von RMA Zellen isoliert, die 18 h zuvor mock, mit poly A oder poly I:C elektroporiert oder die alternativ mit UV-C-Licht bestrahlt worden waren. Je 400 ng dieser RNA-Proben wurden unter Verwendung des TransIT-LT1 Transfection Reagents in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Nach 18-24 h wurde die IFN-α-Produktion untersucht, um zu analysieren, ob durch RNA der RMA Zellen eine Immunstimulation in den mDCs induziert wurde (Abbildung 3.5). RNA aus unbehandelten und aus elektroporierten RMA Zellen induzierte kein IFN-α. Überraschenderweise induzierte jedoch RNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen IFN-α in mDCs. Mit steigender Strahlendosis, die auf die RMA Zellen eingewirkt hatte, wurde auch mehr IFN-α durch deren RNA induziert.

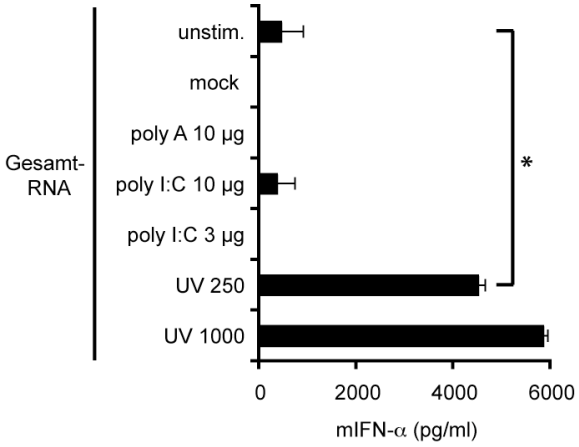


Abbildung 3.5: UV-Strahlung induziert immunogene RNA-Spezies, eine Stimulation mit poly I:C nicht. RMA Zellen wurden mock, mit poly A oder poly I:C elektroporiert oder alternativ mit UV-C-Licht (250 oder 1000 mJ/cm^2) bestrahlt. Nach 18 h wurde deren RNA isoliert und je 400 ng in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. 18-24 h nach der Stimulation wurde IFN-α im Überstand mit ELISA gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (*=p≤0,05).

Um herauszufinden, ob sich diese Beobachtung mit anderen Zelllinien bestätigen ließ, wurden L929 Zellen mit Liganden der verschiedenen zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren (poly I:C, poly dAdT, 3-P-RNA) transfiziert oder mit UV-C-Licht bestrahlt, deren RNA nach 18 h isoliert und jeweils 400 ng in murine Wildtyp-mDCs mittels TransIT-LT1 transfiziert. Nach 18-24 h wurde der Überstand der mDCs auf IFN-α untersucht. Anhand der ELISA-Daten zeigte sich, dass auch hier nur die RNA aus UV-bestrahlten Zellen IFN-α in mDCs induzierte (Abbildung 3.6).

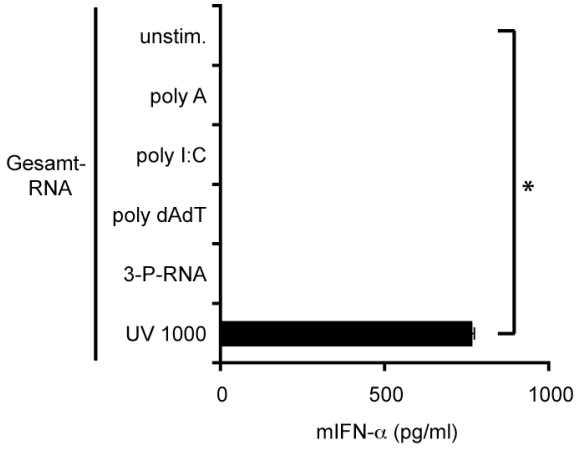


Abbildung 3.6: RNA UV-bestrahlter L929 Zellen induziert IFN-α in murinen mDCs.
L929 Zellen wurden mit poly I:C, poly dAdT oder 3-P-RNA transfiziert oder alternativ mit UV-C-Licht bestrahlt. 18 h nach der Behandlung wurde deren RNA isoliert und je 400 ng in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Die Überstände der mDCs wurden 18-24 h später mit ELISA auf IFN-α untersucht. Der Mittelwert ± SEM (n=3) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test berechnet (*=p≤0,05).

3.5 UV-Strahlung verstärkt die stimulatorischen Eigenschaften von zellulärer DNA

Es ist bekannt, dass UV-Strahlung durch direkte Absorption der Strahlungsenergie oder indirekt über die Generierung von ROS strukturelle Veränderungen an der DNA induzieren kann. Dazu zählen neben der Bildung von Photoprodukten wie CPDs und 6-4-PPs Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenmutationen sowie die Oxidation von Zuckerresten. Möglicherweise beeinflussen solche Modifikationen auch die stimulatorischen Eigenschaften der Nukleinsäuren.
Nachdem gezeigt werden konnte, dass UV-Strahlung immunogene RNA-Spezies erzeugte, die IFN-α in mDCs induzierten, stellte sich die Frage, ob dies auch für genomische DNA zutraf. Daher wurde die Zytokinproduktion von murinen Wildtyp-mDCs als Antwort auf die DNA aus UV-bestrahlten Zellen untersucht. Dazu wurden zunächst RMA Zellen mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 250 und 1000 mJ/cm^2 bestrahlt und nach 18 h Inkubation wurde deren genomische DNA aufgereinigt. Je 400 ng wurden mit TransIT-LT1 komplexiert in mDCs transfiziert. Als Positivkontrolle wurden mDCs mit poly I:C transfiziert. Unstimulierte mDCs dienten als Negativkontrolle. 18-24 h nach der

Stimulation wurde in den Überständen die Sekretion der Zytokine IFN-α, IP-10, IL-6 und IL-12p40 mit ELISA gemessen (Abbildung 3.7).

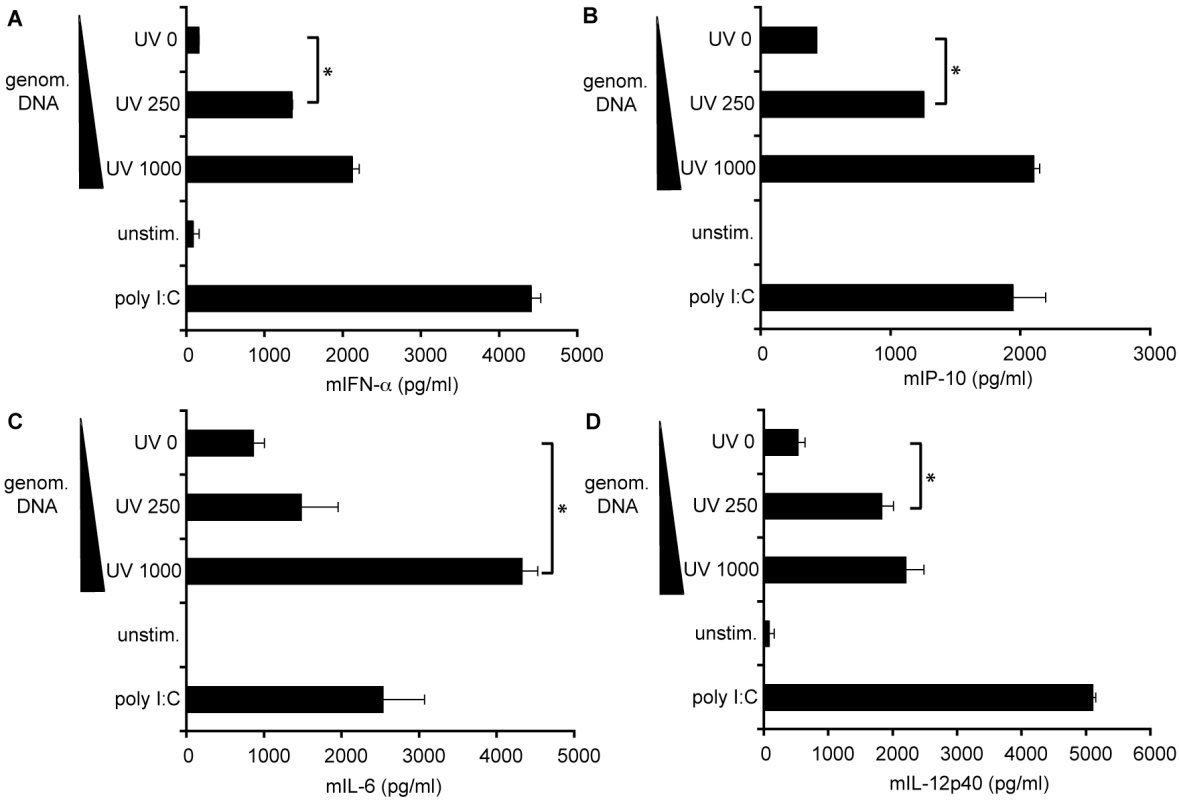


Abbildung 3.7: Erhöhte Induktion von IFN-α sowie anderen pro-inflammatorischen Zytokinen in murinen mDCs nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen.
Genomische DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde isoliert und murine Wildtyp-mDCs mit je 400 ng stimuliert. Als Kontrolle wurde poly I:C verwendet. 18-24 h nach der Stimulation wurde in den Überständen die Sekretion von IFN-α (A), IP-10 (B), IL-6 (C) und IL-12p40 (D) mit ELISA bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (*=p≤0,05).

Wie erwartet produzierten mDCs nach der zytosolischen Erkennung von poly I:C über MDA-5 substanzielle Mengen an IFN-α, IP-10, IL-6 und IL-12p40 (Abbildung 3.7 A-D). Auch die Stimulation mit genomischer DNA (2 µg/ml) führte zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. DNA aus UV-bestrahlten Zellen besaß jedoch eine signifikant stärkere Aktivität im Hinblick auf die Induktion von IFN-α, IP-10, IL-6 sowie IL-12p40 als DNA aus unbestrahlten Zellen. Darüber hinaus war zu erkennen, dass mit steigender Strahlendosis, der die RMA Zellen ausgesetzt worden waren, auch die stimulatorischen Eigenschaften der DNA zunahmen. Im Vergleich zur DNA aus unbestrahlten RMA Zellen induzierte DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen bis zu zehnmal mehr IFN-α (Abbildung

3.7 A), dreimal mehr IP-10 (Abbildung 3.7 B), viermal mehr IL-6 (Abbildung 3.7 C) und zweimal mehr IL-12p40 (Abbildung 3.7 D).

Sogar ohne die Verwendung eines Transfektionsreagenzes konnte durch bloße Zugabe von genomischer DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen in den Überstand von murinen mDCs dosisabhängig IFN-α induziert werden, allerdings im Verhältnis zur eingesetzten DNA-Dosis nur in geringen Mengen (Abbildung 3.8). Genomische DNA aus unbestrahlten RMA Zellen induzierte unter diesen Konditionen hingegen kein IFN-α.

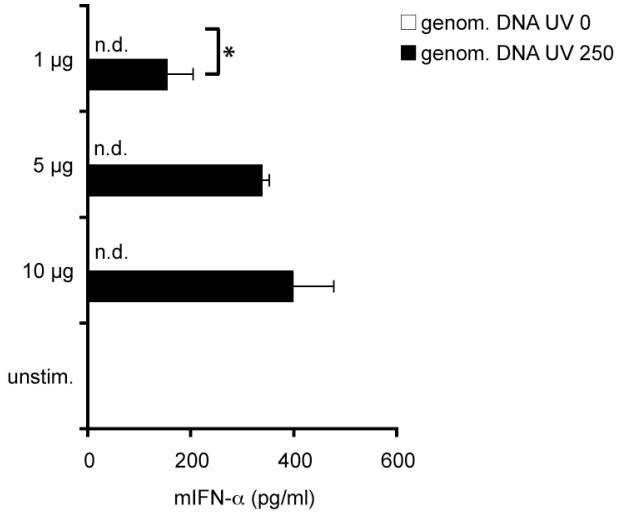


Abbildung 3.8: DNA aus UV-bestrahlten Zellen induziert geringe Mengen IFN-α nach Zugabe in den Überstand von murinen mDCs.

Genomische DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde aufgereinigt und in den angegebenen Mengen in den Überstand von murinen Wildtyp-mDCs gegeben. 18-24 h später wurde IFN-α in den Überständen gemessen. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet (*=$p \leq 0{,}05$).

Um auszuschließen, dass die verstärkte Induktion pro-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit DNA aus UV-bestrahlten Zellen ein zelltypspezifischer Effekt von mDCs war, wurden auch andere murine Zelltypen bzw. -linien diesbezüglich getestet. Dabei wurde methodisch genauso vorgegangen wie bei der Stimulation der mDCs.

Abbildung 3.9 zeigt die IFN-α- und IP-10-Antworten von 129 WT Makrophagen (Abbildung 3.9 A und B) sowie der Keratinozytenzelllinie SP1 (Abbildung 3.9 C und D) 18-24 h nach Stimulation mit genomischer DNA aus unbestrahlten Zellen gegenüber genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen. Als Positivkontrolle für die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine diente in den 129 WT Makrophagen die Transfektion mit poly dAdT, welches mit

Lipofectamine™ 2000 komplexiert wurde, und in SP1 Zellen die Transfektion mit poly I:C komplexiert an TransIT-LT1. Außerdem blieben Zellen als Negativkontrolle unbehandelt.

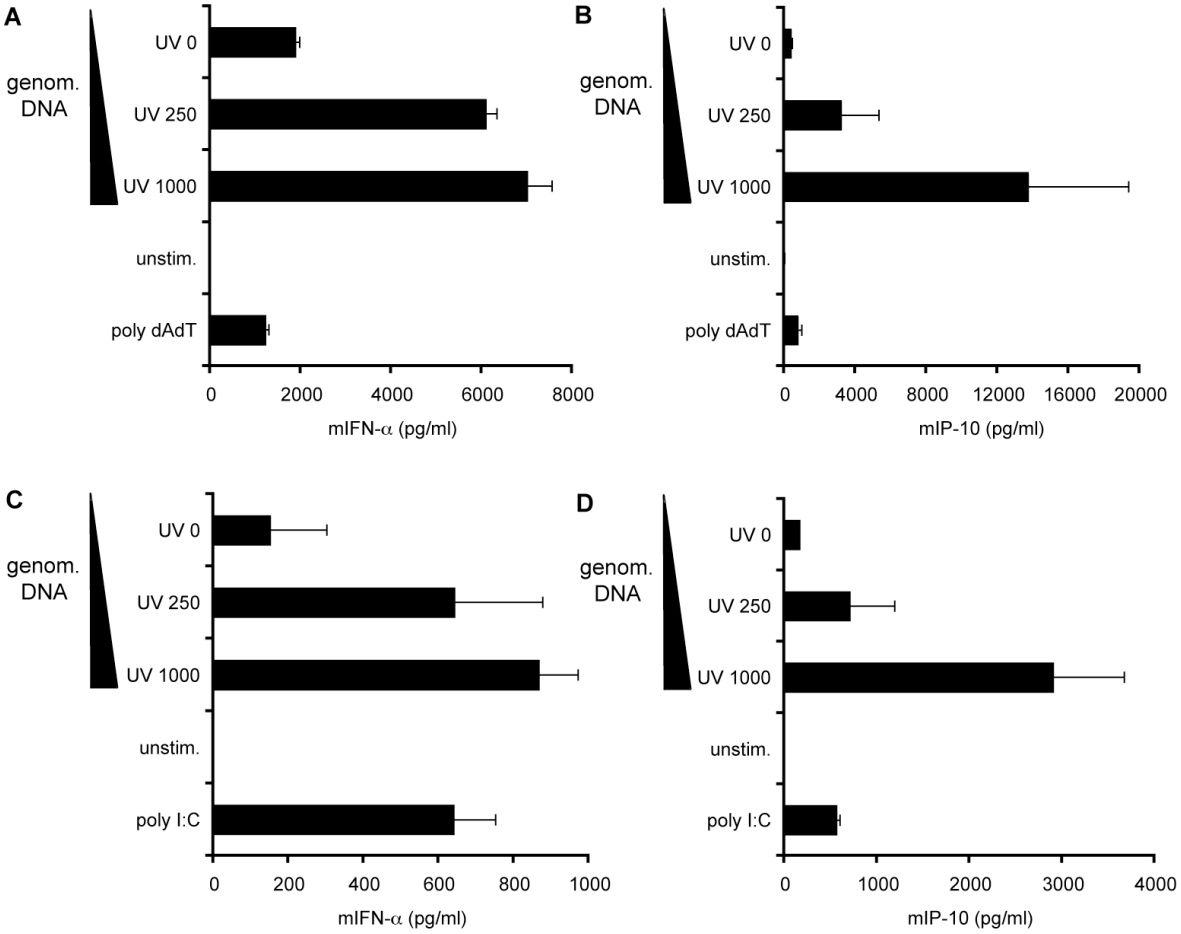


Abbildung 3.9: Verstärkte IFN-α- und IP-10-Induktion in murinen 129 WT Makrophagen sowie SP1 Keratinozyten nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen.
Genomische DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde isoliert und murine 129 WT Makrophagen (A, B) sowie Zellen der murinen Keratinozytenzelllinie SP1 (C, D) mit je 400 ng stimuliert. Als Kontrollen wurden poly dAdT bzw. poly I:C verwendet. Nach 18-24 h wurden die Überstände mittels ELISA auf IFN-α (A, C) und IP-10 (B, D) untersucht. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Wie bei mDCs führte auch die Stimulation von 129 WT Makrophagen mit genomischer DNA (2 µg/ml) zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wobei DNA aus UV-bestrahlten Zellen abermals mehr IFN-α sowie IP-10 induzierte als DNA aus unbestrahlten Zellen. Auch hier war zu beobachten, dass mit steigender Strahlendosis, die auf die RMA Zellen eingewirkt hatte, die stimulatorische Wirkung der DNA zunahm. Gleichermaßen verhielt es sich im Falle der stimulierten Keratinozytenzelllinie SP1,

obgleich diese Zellen im Hinblick auf die Absolutmenge generell deutlich weniger IFN-α und IP-10 sekretierten als mDCs oder Makrophagen.
Neben der Generierung immunogener RNA-Spezies besaß UV-Strahlung also auch die Fähigkeit, die stimulatorischen Eigenschaften von zellulärer DNA zu verstärken. Dies führte in verschiedenen murinen Zelltypen zur Immunaktivierung, die durch signifikant gesteigerte Mengen von IFN-α und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet war.

3.6 UV-modifizierte DNA induziert eine verstärkte IFN-α-Antwort in humanen Monozyten

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich diese im murinen System gemachten Beobachtungen auch auf humane Zellen übertragen ließen. Dazu wurden humane PBMCs aus Buffy Coats aufgereinigt und aus diesen mittels magnetischer Separation Monozyten isoliert. Für die Transfektion in Monozyten wurden je 200 ng der genomischen DNA aus unbestrahlten bzw. UV-C-bestrahlten RMA Zellen oder A549 Zellen mit Dotap komplexiert. Als Kontrollstimulus diente mit Dotap komplexiertes poly dAdT, das im Zytosol der transfizierten Zelle durch RNA-Polymerase III in 3-P-RNA transkribiert wird und über den RIG-I-Signalweg IFN-α induziert (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009).
Abbildung 3.10 illustriert die Ergebnisse des ELISA, der 18-24 h nach der Stimulation zur Messung des in den Überständen enthaltenen IFN-α durchgeführt wurde. Dabei schütteten humane Monozyten nach der Stimulation mit poly dAdT wie erwartet IFN-α aus. Auch die Stimulation mit genomischer DNA (1 µg/ml) führte zur IFN-α-Sekretion, wobei, wie zuvor bei murinen Zellen beobachtet, DNA aus UV-bestrahlten Zellen auch in humanen Monozyten signifikant mehr IFN-α induzierte als DNA aus unbehandelten Zellen. Die IFN-α-Produktion war etwa um Faktor fünf gesteigert.
Es bleibt außerdem anzumerken, dass es unerheblich war, ob die genomische DNA aus murinen RMA Zellen (Abbildung 3.10 A) oder humanen A549 Zellen (Abbildung 3.10 B) aufgereinigt worden war. Der beobachtete Effekt war nicht speziesspezifisch.
Wie in murinen Zellen führte UV-modifizierte DNA also auch in humanen Monozyten zu einer signifikant verstärkten IFN-α-Antwort und beruhte damit auf einem Mechanismus, der sowohl in der Maus als auch im Menschen konserviert ist.

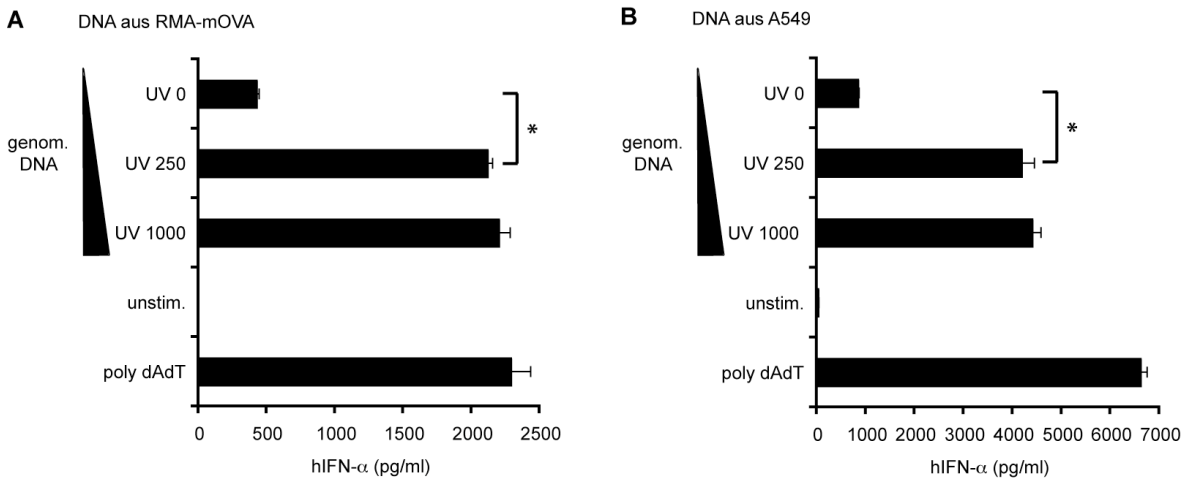


Abbildung 3.10: Erhöhte IFN-α-Sekretion in humanen Monozyten nach Stimulation mit UV-modifizierter DNA.

Humane Monozyten wurden aus Blut von gesunden Spendern isoliert und mit jeweils 200 ng genomischer DNA, die aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen (A) bzw. A549 Zellen (B) aufgereinigt worden war, stimuliert bzw. als Kontrolle mit poly dAdT. 18-24 h nach der Stimulation wurde in den Überständen die Sekretion von IFN-α mittels ELISA bestimmt. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz berechnet (*=$p \leq 0{,}05$).

3.7 UV-B- und UV-C-Licht haben aufgrund ihrer Strahlungsenergie eine starke Wirkung auf die stimulatorischen Eigenschaften zellulärer DNA

In den vorangegangenen Experimenten wurde zur Bestrahlung der Zellen ausschließlich UV-C-Licht verwendet. UV-Strahlung des solaren Spektrums wird jedoch in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der biologischen Wirkung in drei Gruppen unterteilt: UV-A (320-400 nm), UV-B (295-320 nm) und UV-C (100-295 nm). DNA absorbiert elektromagnetische Strahlung im Bereich von 230-300 nm, weshalb UV-C- und UV-B-Strahlung hauptsächlich für direkte DNA-Schädigungen verantwortlich sind, wobei jedoch anzumerken ist, dass UV-C-Strahlen fast vollständig in der Erdatmosphäre absorbiert werden. Durch Sensibilisierung anderer Biomoleküle und indirekte Prozesse können allerdings auch langwelligere und damit energieärmere Strahlen DNA-Schäden induzieren.

Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Bestrahlung von Zellen mit UV-A- oder UV-B-Licht ähnliche Auswirkungen auf die stimulatorischen

Eigenschaften der genomischen DNA hatte wie die Bestrahlung mit UV-C-Licht. Dafür wurden RMA Zellen UV-A-, UV-B- oder UV-C-Strahlung in verschiedenen Dosen ausgesetzt. Zur Bestrahlung mit UV-B-Licht wurden mit 250 und 1000 mJ/cm^2 die gleichen Dosen verwendet wie zur Bestrahlung mit UV-C-Licht. Aufgrund der geringeren Strahlungsenergie wurde zur UV-A-Bestrahlung die jeweils 100-fache Dosis gewählt. Nach 18 h Inkubation wurde die genomische DNA aus den unterschiedlich bestrahlten Zellen sowie aus unbestrahlten Zellen isoliert und je 400 ng mit TransIT-LT1 komplexiert in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Als Kontrollen dienten mit poly I:C stimulierte bzw. unstimulierte Wildtyp-mDCs. 18-24 h später wurde mittels ELISA die IFN-α-Sekretion in den Überständen bestimmt (Abbildung 3.11).

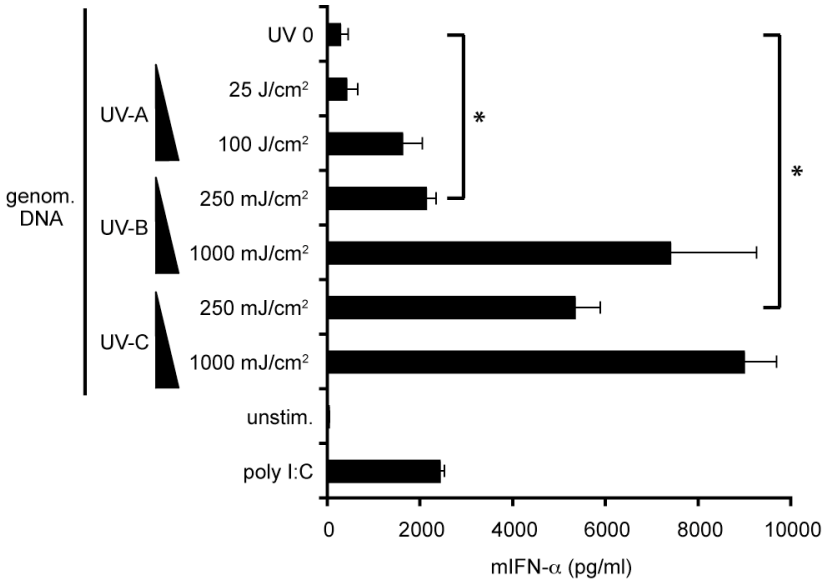


Abbildung 3.11: Genomische DNA aus UV-B- sowie UV-C-bestrahlten Zellen weist eine deutlich verstärkte immunstimulatorische Aktivität auf.

RMA Zellen wurden mit UV-A-, UV-B- oder UV-C-Licht in den angegebenen Dosen bestrahlt. Nach 18 h wurde die genomische DNA aus den unterschiedlich bestrahlten sowie aus unbestrahlten Zellen isoliert und murine Wildtyp-mDCs mit je 400 ng stimuliert. Als Kontrolle wurde poly I:C verwendet. 18-24 h später wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf IFN-α untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (*=$p \leq 0{,}05$).

Genomische DNA aus UV-A-bestrahlten Zellen induzierte zwar tendenziell mehr IFN-α in mDCs als genomische DNA aus unbestrahlten Zellen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Genomische DNA aus UV-B-bestrahlten Zellen induzierte hingegen ebenso wie genomische DNA aus UV-C-bestrahlten Zellen signifikant mehr IFN-α. Unter den verwendeten Konditionen schien UV-B-Strahlung also eine ähnlich starke Wirkung

auf die stimulatorischen Eigenschaften zellulärer DNA zu haben wie UV-C-Strahlung, während UV-A-Strahlung diese nur mäßig beeinflusste. Möglicherweise würden höhere Strahlendosen bzw. eine längere Exposition der RMA Zellen gegenüber UV-A-Licht zu einer deutlicheren Steigerung des immunstimulatorischen Potenzials der genomischen DNA führen.

Dass die Exposition der RMA Zellen gegenüber UV-A-Licht auch wenig Einfluss auf deren Zellviabilität hatte, wurde anhand des CellTiter-Blue-Tests deutlich, der 18-24 h nach der Bestrahlung durchgeführt wurde (Abbildung 3.12). Bestrahlung mit UV-B-Licht wirkte hingegen ähnlich zytotoxisch auf RMA Zellen wie Bestrahlung mit UV-C-Licht.

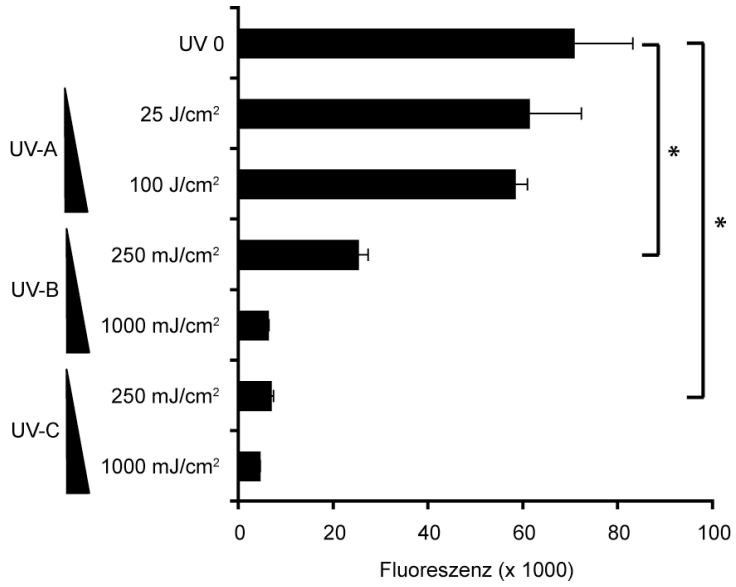


Abbildung 3.12: Einfluss von UV-A-, UV-B- und UV-C-Strahlung auf die Zellviabilität.

RMA Zellen wurden mit UV-A-, UV-B- oder UV-C-Licht in den angegebenen Dosen bestrahlt oder blieben unbestrahlt. Nach 18-24 h Inkubation wurde die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=3) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Mit dem zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz bestimmt (*=$p \leq 0{,}05$).

3.8 Durch DNase I-Behandlung verliert UV-modifizierte DNA ihre stimulatorische Aktivität

Eine Behandlung mit DNase I sollte bestätigen, dass es sich bei der isolierten und den Effekt vermittelnden Nukleinsäure tatsächlich um UV-modifizierte DNA handelte. Dazu wurde die genomische DNA aus RMA Zellen, die mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 250 und 1000 mJ/cm^2 bestrahlt worden waren, vor ihrer Transfektion für 30 min bei 37 °C mit DNase I inkubiert. Als Kontrolle für die Enzymwirkung wurde zusätzlich genomische DNA ohne Zugabe von DNase I für 30 min bei 37 °C inkubiert oder unbehandelt gelassen. Für alle Konditionen wurde darüber hinaus poly dAdT als Positivkontrolle mitgeführt. Je 400 ng genomische DNA wurden mit TransIT-LT1 bzw. 200 ng poly dAdT mit Lipofectamine™ 2000 komplexiert und in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Nach 18-24 h wurde das in die Überstände sekretierte IFN-α mit ELISA gemessen (Abbildung 3.13).

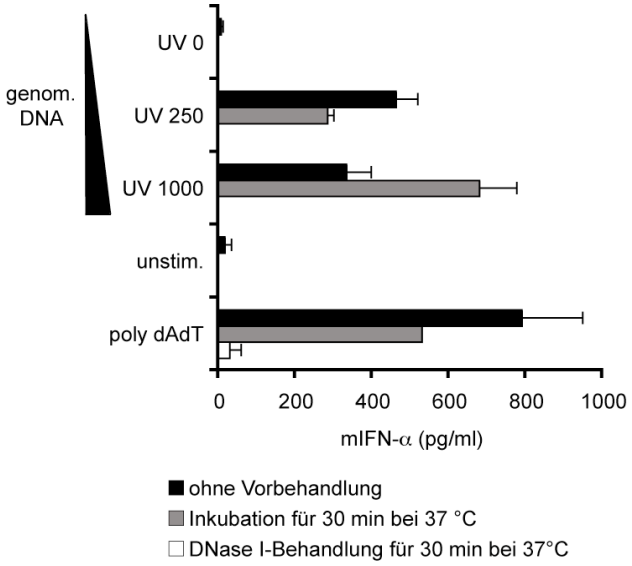


Abbildung 3.13: Verlust der stimulatorischen Aktivität von UV-modifizierter DNA durch DNase I-Behandlung.

Genomische DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde isoliert und vor ihrer Transfektion in murine Wildtyp-mDCs 30 min bei 37 °C unter Zugabe von DNase I inkubiert bzw. als Kontrolle 30 min bei 37 °C ohne DNase I inkubiert oder unbehandelt gelassen. Poly dAdT wurde als Kontrolle mitgeführt. 18-24 h nach der Stimulation wurde IFN-α in den Überständen mit ELISA gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten.

Erwartungsgemäß induzierte poly dAdT ohne Vorbehandlung sowie nach 30 min Inkubation bei 37 °C IFN-α in annähernd gleichen Mengen. Die Vorbehandlung von poly dAdT mit DNase I führte hingegen zu einem deutlichen Rückgang der IFN-α-Sekretion. Im Falle der genomischen DNA aus UV-bestrahlten Zellen verhielt es sich ebenso. Während unbehandelte sowie bei 37 °C vorinkubierte DNA in gleichem Maße IFN-α in mDCs induzierten, verlor die DNA durch DNase I-Behandlung vollständig ihre immunstimulatorische Aktivität. Es war kein IFN-α mehr in den Überständen zu messen. Damit war bestätigt, dass in der Tat UV-modifizierte DNA den zuvor beschriebenen Effekt vermittelte.

3.9 UV-modifizierte DNA wird TLR9-unabhängig im Zytosol erkannt

Aus den vorausgegangenen Ergebnissen leitete sich die Frage ab, über welche(n) intrazellulären Rezeptor(en) UV-modifizierte DNA erkannt wird und IFN-α induziert. Generell kann die Induktion von IFN-α infolge von DNA-Erkennung über verschiedene Rezeptoren des angeborenen Immunsystems vermittelt werden. Der im Endosom lokalisierte TLR9 erkennt nicht-methylierte CpG-Motive, die häufig in bakterieller und viraler DNA vorkommen (Krieg, 1996; Krieg et al., 1995; Krieg et al., 1998b). Nukleinsäure-erkennende TLRs wie TLR9 werden jedoch nicht ubiquitär exprimiert, sondern haben ein zelltypspezifisches Expressionsmuster, das speziesabhängig differiert. Während sich die Expression von TLR9 beim Menschen auf PDCs und B-Zellen beschränkt (Hornung et al., 2002; Krug et al., 2001b), wird TLR9 in Mauszellen in einem breiteren Spektrum von Immunzellen, einschließlich DCs, exprimiert. Darüber hinaus existiert eine Immunerkennung von DNA im Zytosol, die TLR9-unabhängig ist (Ishii et al., 2006; Ishii et al., 2001; Stetson and Medzhitov, 2006a; Yasuda et al., 2005a; Yasuda et al., 2005b). Von welchen Rezeptoren DNA im Zytosol erkannt wird, ist noch umstritten. Da dieser Rezeptor dsDNA verschiedenen Ursprungs erkennen kann (Hochrein et al., 2004; Takaoka et al., 2007), könnte auch ein Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren für die Erkennung zytosolischer dsDNA zuständig sein. Für die Stimulationen mit UV-modifizierter DNA wurden Transfektionsreagenzien verwendet, die sich in erster Linie zum Transfer der Nukleinsäuren ins Zytosol der Zellen eignen, wobei jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass die Nukleinsäuren das Endosom der transfizierten Zelle passieren.

Um auszuschließen, dass der endosomale TLR9 eine Rolle bei der Erkennung UV-modifizierter DNA spielte, wurden mDCs aus Knochenmarkszellen von Wildtyp- und TLR9-defizienten Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert und in diese genomische DNA aus unbestrahlten oder UV-C-bestrahlten RMA Zellen transfiziert. Dazu wurden je 400 ng genomische DNA bzw. als Stimulationskontrolle poly I:C mit TransIT-LT1 komplexiert. Zur Überprüfung der TLR9-Defizienz wurden mDCs zusätzlich mit CpG ODN 1826 durch Zugabe von 1 µg in den Überstand stimuliert. Als Negativkontrolle blieben mDCs unstimuliert. 18-24 h nach der Stimulation wurden mittels ELISA der IFN-α- (Abbildung 3.14 A) und der IL-12p40-Gehalt (Abbildung 3.14 B) in den Überständen bestimmt.

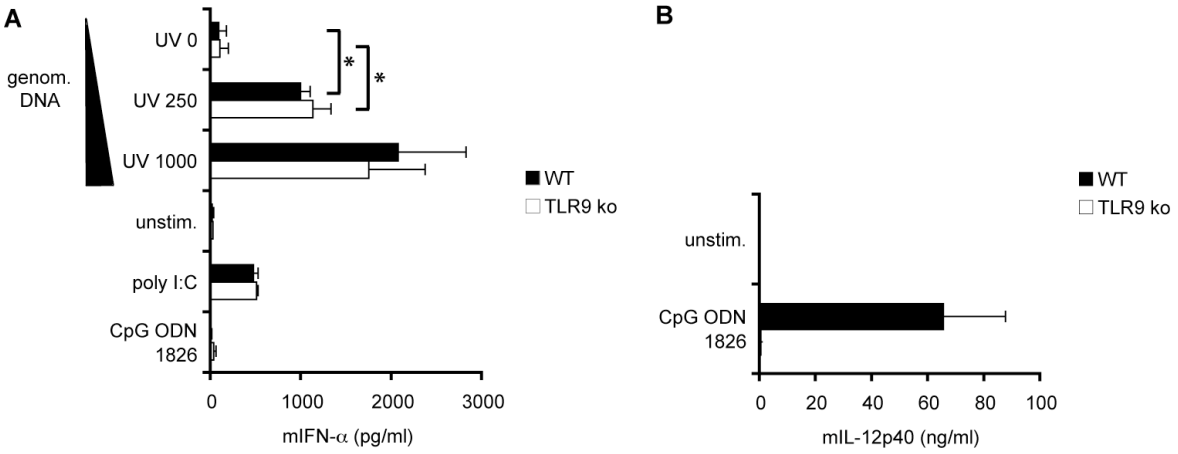


Abbildung 3.14: TLR9-unabhängige Erkennung von UV-modifizierter DNA induziert verstärkte IFN-α-Antwort in murinen mDCs.

mDCs wurden aus den Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen sowie TLR9-defizienten Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert. Genomische DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde isoliert und mDCs mit je 400 ng stimuliert. Als Stimulationskontrolle diente poly I:C. Zur Überprüfung der TLR9-Defizienz wurde zusätzlich mit CpG ODN 1826 stimuliert. Nach 18-24 h wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf IFN-α (A) und IL-12p40 (B) untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet (*=p≤0,05).

CpG ODN 1826, das als CpG des B-Typs aus einem Thiophosphat-Rückgrat mit einem oder mehreren CpG-Dinukleotiden besteht, wird über den endosomalen TLR9 erkannt. Folglich induzierte CpG ODN 1826 in Wildtyp-mDCs substanzielle Mengen an IL-12p40, während die IL-12p40-Sekretion in TLR9 ko-mDCs ausblieb (Abbildung 3.14 B). Die zytosolische Erkennung von poly I:C über MDA-5 induzierte hingegen sowohl in Wildtyp- als auch in TLR9 ko-mDCs gleiche Mengen von IFN-α (Abbildung 3.14 A). Auch für die Erkennung von genomischer DNA aus unbestrahlten und UV-bestrahlten Zellen schien

TLR9 keine Rolle zu spielen, da sich die IFN-α-Antwort in TLR9 ko-mDCs nicht von der in Wildtyp-mDCs unterschied.

Um die Beobachtungen einer TLR9- und damit endosomal-unabhängigen Detektion von UV-modifizierter DNA zu untermauern, wurde zusätzlich die IFN-α-Produktion von murinen Wildtyp-mDCs untersucht, die 1 h vor der Stimulation mit 100 µM Chloroquin vorbehandelt worden waren (Abbildung 3.15). Chloroquin verhindert die Azidifizierung von Endosomen und blockiert so die Erkennung von Nukleinsäuren durch endosomale Rezeptoren. Folglich konnte Chloroquin durch poly I:C induziertes IFN-α in mDCs nicht unterbinden. Trotzdem war eine leichte Abnahme der IFN-α-Produktion erkennbar. Das Gleiche galt für die IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte DNA. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Behandlung der mDCs mit Chloroquin Auswirkungen auf die Transfektionseffizienz oder die Zellviabilität hatte, was jedoch nicht überprüft wurde. Insgesamt sprachen die Ergebnisse dennoch dafür, dass UV-modifizierte DNA in murinen mDCs TLR9-unabhängig von einem zytosolischen DNA-Rezeptor erkannt wurde.

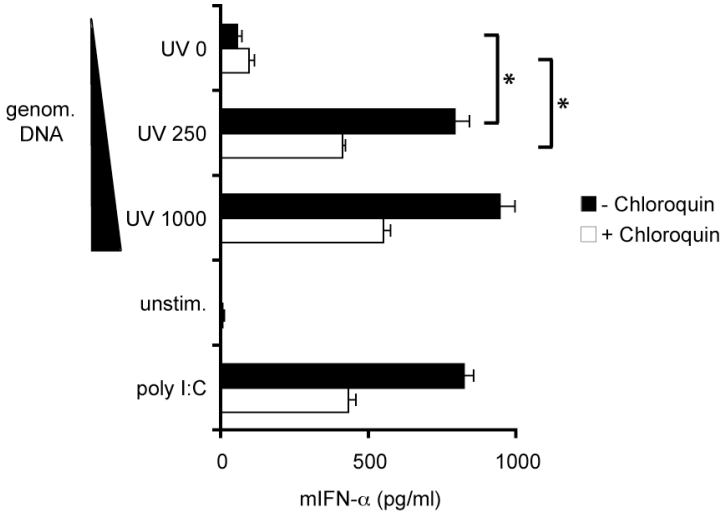


Abbildung 3.15: Endosomal-unabhängige Erkennung von UV-modifizierter DNA induziert erhöhte IFN-α-Sekretion in murinen mDCs.

Murine Wildtyp-mDCs wurden 1 h ± 100 µM Chloroquin vorinkubiert und dann mit je 400 ng genomischer DNA aus unbestrahlten oder UV-C-bestrahlten RMA Zellen bzw. als Kontrolle mit poly I:C stimuliert. Nach 18-24 h wurde in den Überständen die Sekretion von IFN-α mit ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz bestimmt (*=p≤0,05).

Auch eine Beteiligung der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren MDA-5 und RIG-I an der Signaltransduktion konnte anhand von Stimulationsexperimenten mit murinen MDA-5- bzw. RIG-I-defizienten mDCs definitiv ausgeschlossen werden (Daten nicht aufgeführt).

Mit Hilfe von „shRNA-knockdown“-Experimenten sollte die Abhängigkeit der IFN-α-Antwort von dem Signalmolekül MITA eindeutig belegt werden. Dazu wurden 129 WT Makrophagen mit verschiedenen lentiviralen shRNA-Konstrukten transduziert und selektioniert. Als Kontrollen dienten die lentiviralen Vektoren SHC001 und SHC002. SHC001 war ein leerer Vektor ohne integrierte shRNA-Sequenz. SHC002 war eine so genannte „non-targeting control“, das heißt ein Kontrollvektor mit einer shRNA-Sequenz, die zwar mit RISC interagiert, aber keine komplementäre Ziel-mRNA besitzt. MITA #1, #2 und #3 beinhalteten drei verschiedene shRNA-Sequenzen, die über RISC die Degradation der für MITA kodierenden, komplementären mRNA induzieren und damit die MITA-Expression unterbinden sollten. Die unterschiedlich transduzierten 129 WT Makrophagen wurden mit jeweils 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten bzw. UV-C-bestrahlten RMA Zellen unter Verwendung von TransIT-LT1 transfiziert. Als Stimulationskontrollen dienten poly dAdT sowie 3-P-RNA, von denen jeweils 100 ng komplexiert an Lipofectamine™ 2000 eingesetzt wurden. Nach 18-24 h wurde das IFN-α in den Makrophagen-Überstanden mittels ELISA gemessen (Abbildung 3.16).

Es zeigte sich, dass mit SHC001 und SHC002 transduzierte 129 WT Makrophagen nach Stimulation mit UV-modifizierter genomischer DNA sowie nach den Kontrollstimulationen mit poly dAdT und 3-P-RNA ähnlich substanzielle Mengen IFN-α sekretierten. Die IFN-α-Antwort von mit MITA #1, #2 oder #3 transduzierten 129 WT Makrophagen auf 3-P-RNA war ebenfalls erwartungsgemäß auf dem gleichem Niveau wie die der Kontrollen. Ihre IFN-α-Antwort auf DNA (1 µg/ml), sowohl genomische DNA als auch poly dAdT, war hingegen deutlich vermindert. Die Differenz der sekretierten IFN-α-Menge nach Stimulation mit DNA zwischen mit SHC002 und MITA #1, #2 bzw. 3 transduzierten 129 WT Makrophagen war signifikant.

Dies konnte als eindeutiger Nachweis dafür gewertet werden, dass durch die zytosolische Erkennung von UV-modifizierter genomischer DNA in murinen myeloiden Immunzellen eine Signalkaskade initiiert wurde, die über MITA zur Produktion von IFN-α führte. Dies sollte auch für die Detektion UV-modifizierter DNA in humanen Monozyten gelten, da sie TLR9 nicht exprimieren.

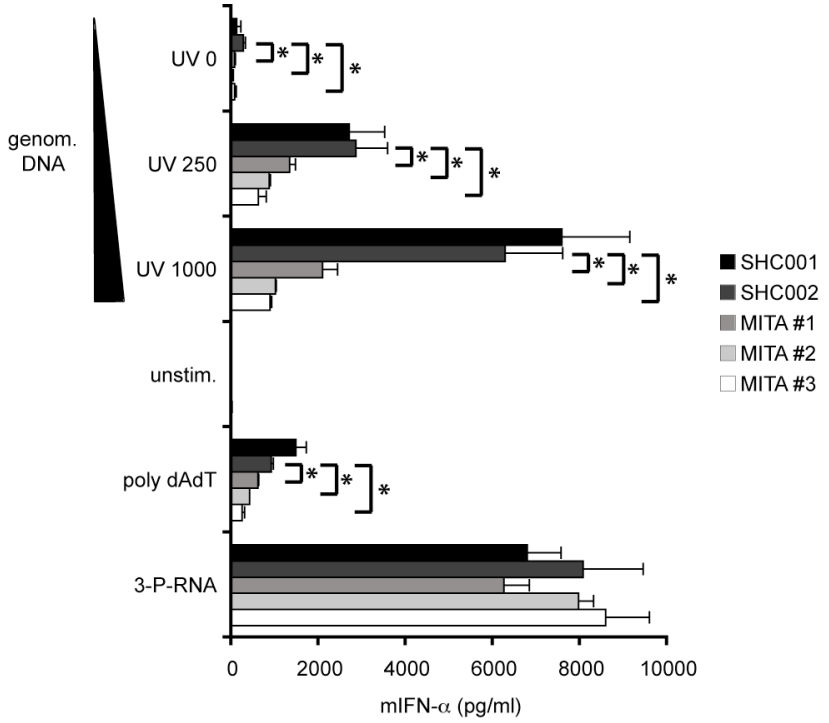


Abbildung 3.16: Bestätigung der MITA-abhängigen IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte genomische DNA mittels shRNA-knockdown.

129 WT Makrophagen wurden mit den lentiviralen shRNA-Vektoren MITA #1, #2 oder #3 transduziert, um die Expression von MITA zu unterbinden. Der leere Vektor SHC001 sowie der Vektor SHC002 mit einer integrierten aber unspezifischen shRNA-Sequenz dienten der Kontrolle. Nach Herstellung der transduzierten Zellen wurden diese mit je 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten oder UV-C-bestrahlten RMA Zellen stimuliert bzw. als Kontrolle mit poly dAdT und 3-P-RNA. Nach 18-24 h wurde die IFN-α-Antwort im ELISA gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=3) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test berechnet (*=$p \leq 0{,}05$).

3.10 Eine direkte Bestrahlung von genomischer DNA mit UV-Licht verstärkt deren stimulatorische Wirkung

Die überraschende Beobachtung, dass die Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht die stimulatorische Wirkung ihrer DNA verstärkte, führte zu der Überlegung, ob auch eine direkte Bestrahlung von genomischer DNA einen vergleichbaren Effekt haben würde. Um dies zu prüfen, wurde DNA aus unbehandelten RMA Zellen mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 25, 50, 100 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt und je 400 ng in murine Wildtyp-mDCs transfiziert, wobei als Transfektionsreagenz TransIT-LT1 verwendet wurde. Als Positivkontrolle dienten mit poly I:C stimulierte mDCs, als Negativkontrolle unstimulierte

mDCs. Die Ergebnisse des ELISA, der 18-24 h nach der Stimulation zur Bestimmung der IFN-α-Sekretion in den Überständen durchgeführt wurde, sind in Abbildung 3.17 A zusammengefasst.

Unbestrahlte genomische DNA (2 µg/ml) induzierte in den mDCs, wie in vorherigen Experimenten beobachtet, nur wenig IFN-α, UV-C-bestrahlte genomische DNA hingegen signifikant mehr. So bewirkte eine Strahlendosis von 10 mJ/cm^2 auf die DNA eine zweifache Steigerung der IFN-α-Induktion. Diese nahm mit steigenden Strahlendosen stetig zu und schien erst bei 250 mJ/cm^2 wieder rückläufig zu werden. Experimente mit humanen Monozyten, die gleichermaßen durchgeführt wurden, lieferten vergleichbare Befunde (Abbildung 3.17 B).

Aus diesen Beobachtungen ließ sich schlussfolgern, dass die stimulatorischen Eigenschaften von zellulärer DNA nicht nur durch eine Bestrahlung der gesamten Zelle sondern auch durch eine direkte Bestrahlung verstärkt werden konnten.

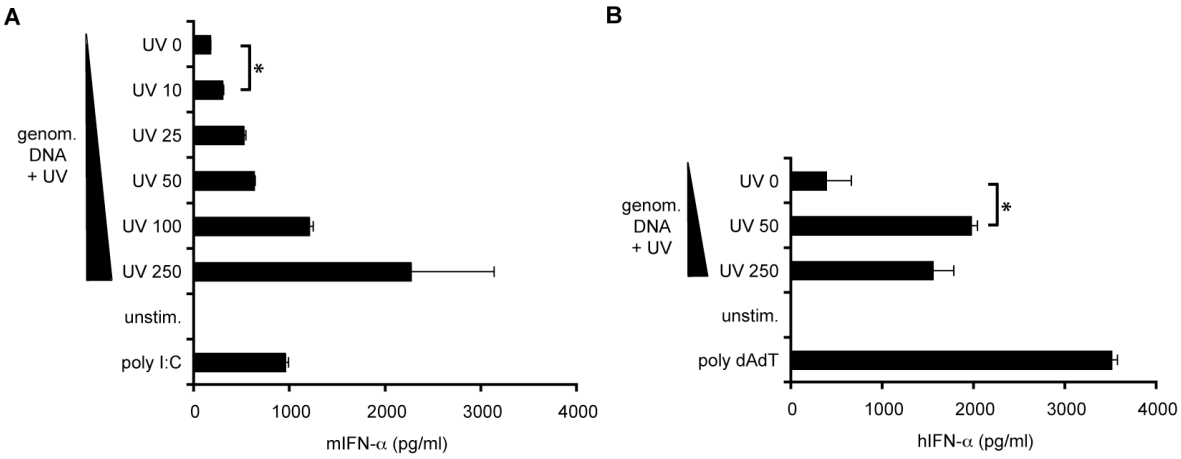


Abbildung 3.17: Verstärkte IFN-α-Induktion in murinen mDCs sowie humanen Monozyten nach Stimulation mit UV-bestrahlter genomischer DNA.

Genomische DNA aus RMA Zellen wurde mit UV-C-Licht in den angegebenen Dosen direkt bestrahlt und je 400 ng in murine Wildtyp-mDCs (A) und je 200 ng in humane Monozyten (B) transfiziert. Als Kontrolle wurden mDCs zusätzlich mit poly I:C (A), Monozyten mit poly dAdT (B) stimuliert. Nach 18-24 h wurde das IFN-α im Überstand mit ELISA gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*=p≤0,05).

Weitere Experimente zeigten, dass auch die direkte Exposition von genomischer DNA gegenüber UV-A- sowie UV-B-Strahlung zu einer Steigerung ihres immunstimulatorischen Potenzials führte, was sich in einer signifikant erhöhten IFN-α-Antwort von transfizierten murinen Wildtyp-mDCs widerspiegelte (Abbildung 3.18). Hierzu waren allerdings vor allem im Fall der UV-A-Strahlung weitaus höhere Energiedosen notwendig als bei der direkten Bestrahlung mit UV-C-Licht.

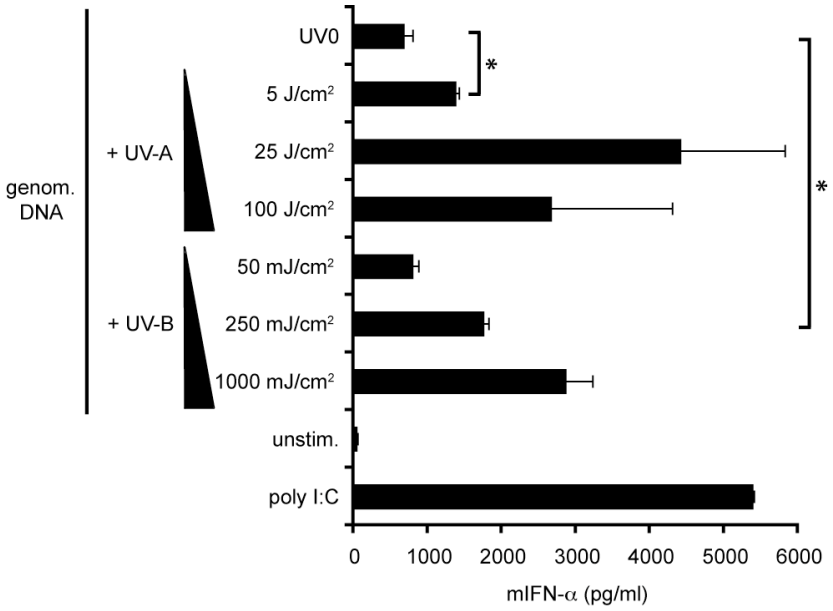


Abbildung 3.18: Steigerung der immunstimulatorischen Aktivität von genomischer DNA durch UV-A- und UV-B-Bestrahlung.

Genomische DNA aus RMA Zellen wurde mit UV-A- bzw. UV-B-Licht in den angegebenen Dosen direkt bestrahlt und murine Wildtyp-mDCs anschließend mit je 400 ng stimuliert. Als Kontrolle wurde poly I:C verwendet. 18-24 h später wurde die IFN-α-Sekretion der mDCs mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*=$p \leq 0{,}05$).

3.11 Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren werden durch UV-Strahlung in ihrer stimulatorischen Aktivität gesteigert

Da UV-Strahlung die Nukleinsäuren innerhalb einer Zelle aber auch in isolierter Form derart modifizieren konnte, dass sie nach zytosolischer Erkennung eine verstärkte Immunantwort induzierten, sollte im nächsten Schritt herausgefunden werden, ob auch andere Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren durch direkte UV-Strahlung in ihrer stimulatorischen Wirkung verstärkt werden können.

Poly I:C und 3-P-RNA, die über die zytosolischen Rezeptorhelikasen MDA-5 bzw. RIG-I detektiert werden, wurden mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 25 und 50 mJ/cm^2 bestrahlt und je 400 ng bzw. 200 ng in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Damit die Nukleinsäuren vorwiegend ins Zytoplasma der Zellen gelangten, wurde poly I:C mit TransIT-LT1 und 3-P-RNA mit Lipofectamine™ 2000 komplexiert. Die IFN-α-, IL-6- und IL-12p40-Produktion der mDCs wurde nach 18-24 h mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.19).

Die zytosolische Erkennung von poly I:C und 3-P-RNA induzierte wie zu erwarten pro-inflammatorische Zytokine wie IFN-α (Abbildung 3.19 A), IL-6 (Abbildung 3.19 B) und IL-12p40 (Abbildung 3.19 C). Interessanterweise wurde die Zytokininduktion durch UV-Bestrahlung von poly I:C und 3-P-RNA signifikant verstärkt, wobei mit steigender Strahlendosis auch die stimulatorische Wirkung der Nukleinsäuren zunahm und mehr IFN-α, IL-6 und IL-12p40 in den Überständen der mDCs messbar waren.

Durch UV-Strahlung konnten also nicht nur zelluläre Nukleinsäuren sondern auch synthetische Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren in ihrer Stimulationsfähigkeit verstärkt werden. Dabei war der zytosolische Rezeptor für die Erkennung seines Liganden auch im UV-bestrahlten Zustand essentiell. Dies konnte mit Hilfe von murinen MDA-5- und RIG-I-defizienten mDCs gezeigt werden (Abbildung 3.20). Während UV-modifiziertes poly I:C in MDA-5 ko-mDCs aufgrund des fehlenden Rezeptors kein IFN-α induzieren konnte, induzierte es in Wildtyp- sowie in RIG-I ko-mDCs verstärkt IFN-α (Abbildung 3.20 A), und auch UV-modifizierte 3-P-RNA, deren Erkennung in RIG-I ko-mDCs ausblieb, löste in Wildtyp- sowie MDA-5 ko-mDCs eine gesteigerte IFN-α-Antwort aus (Abbildung 3.20 B).

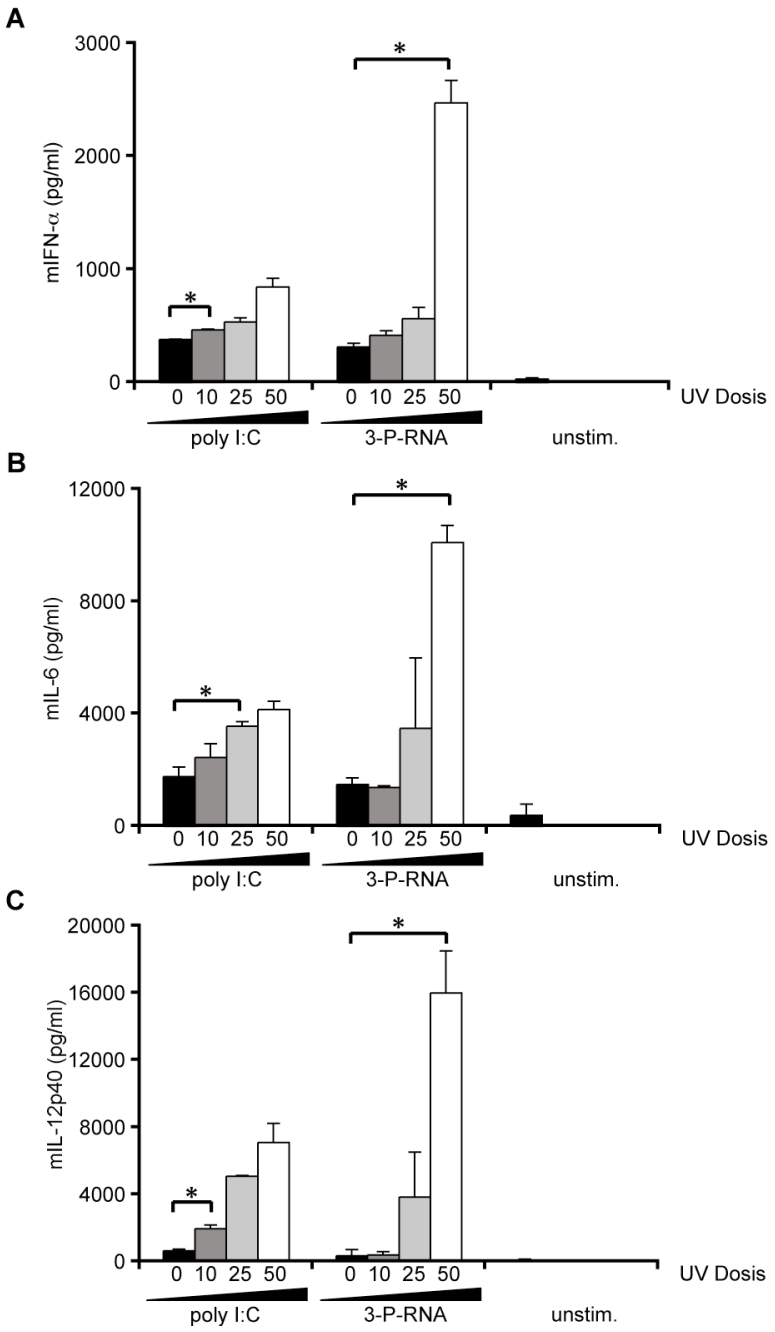


Abbildung 3.19: UV-Bestrahlung von poly I:C und 3-P-RNA führt zu einer gesteigerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in murinen mDCs.

Poly I:C bzw. 3-P-RNA wurde mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 25 und 50 mJ/cm^2 bestrahlt und je 400 ng bzw. 200 ng in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. 18-24 h nach der Stimulation wurde IFN-α (A), IL-6 (B) und IL-12p40 (C) in den Überständen mit ELISA bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Mit dem zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz berechnet (*=p≤0,05).

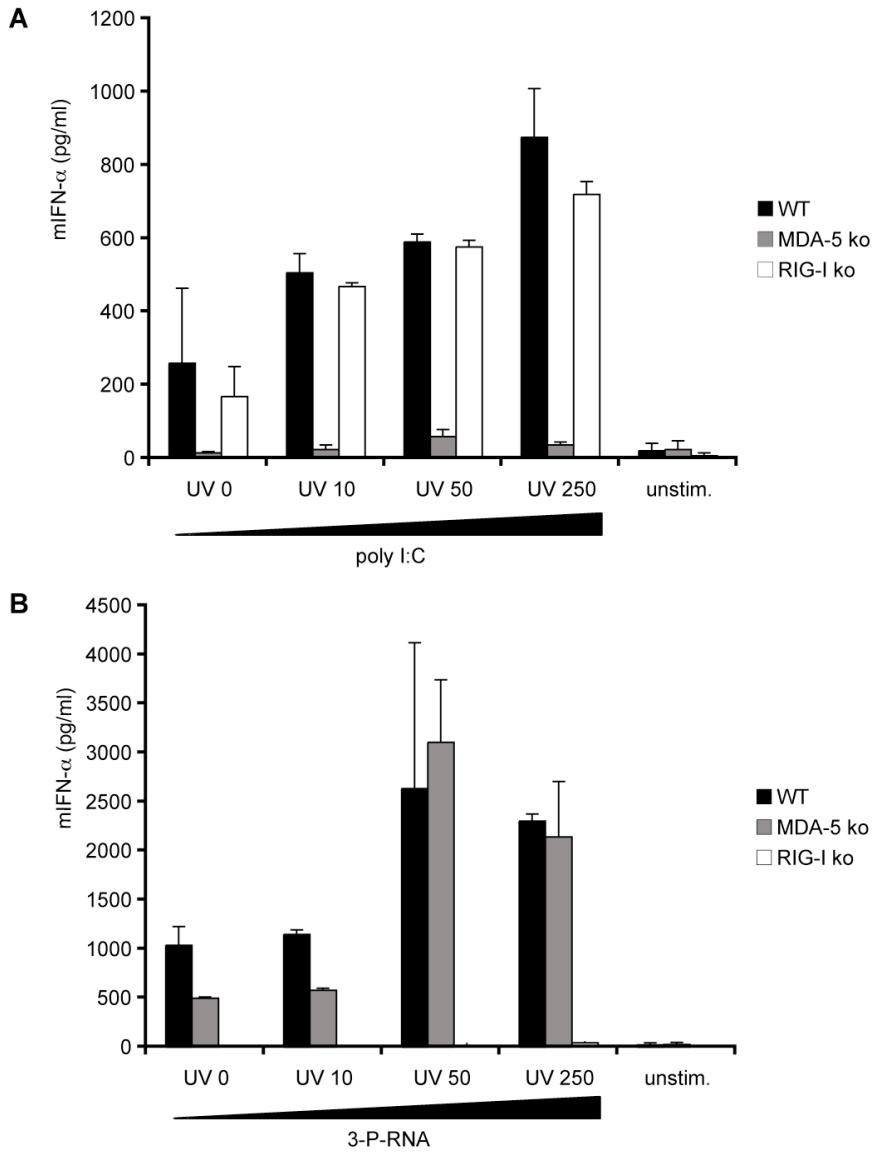


Abbildung 3.20: Erkennung UV-modifizierter Liganden über deren spezifische zytosolische Nukleinsäurerezeptoren.

mDCs wurden aus den Knochenmarkszellen von Wildtyp-, MDA-5-defizienten sowie RIG-I-defizienten Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert. Je 400 ng poly I:C (A) bzw. 200 ng 3-P-RNA (B) wurden nach Bestrahlung mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 50 und 250 mJ/cm^2 in die mDCs transfiziert. 18-24 h später wurden die Überstände mittels ELISA auf IFN-α untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten.

Wie in murinen mDCs so konnte auch in humanen Monozyten nachgewiesen werden, dass Liganden der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren durch UV-Bestrahlung dosisabhängig in ihrer stimulatorischen Wirkung verstärkt werden konnten. Abbildung 3.21 illustriert die ELISA-Ergebnisse zur IFN-α-Anwort in humanen Monozyten nach Stimulation mit UV-bestrahltem poly I:C (Abbildung 3.21 A) bzw. UV-bestrahlter 3-P-RNA (Abbildung 3.21 B). Als Transfektionsreagenzien wurden wie bei den murinen mDCs TransIT-LT1 bzw. Lipofectamine™ 2000 verwendet.

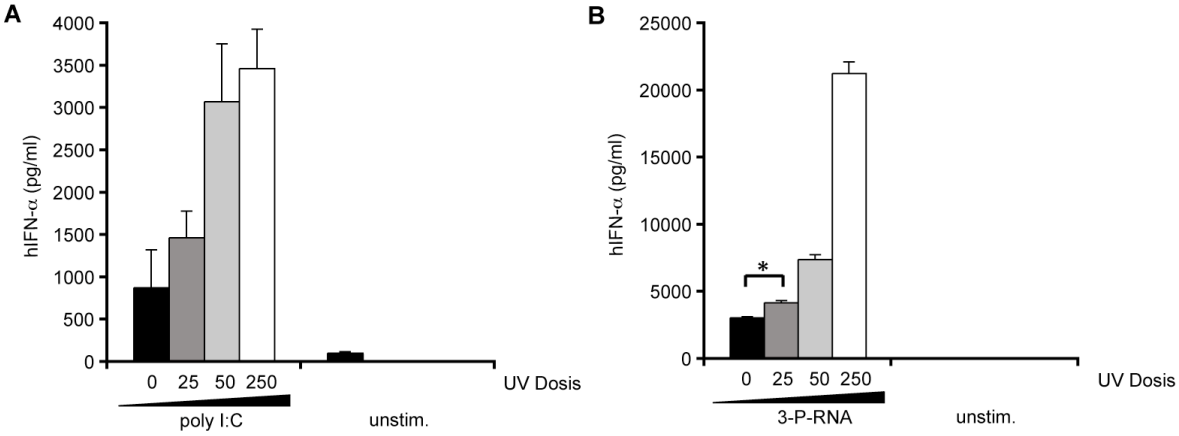


Abbildung 3.21: Verstärkte IFN-α-Sekretion in humanen Monozyten nach Stimulation mit den UV-bestrahlten zytosolischen Liganden poly I:C und 3-P-RNA.

Poly I:C (A) bzw. 3-P-RNA (B) wurde mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 25, 50 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt und je 400 ng bzw. 200 ng in humane Monozyten transfiziert. Mittels ELISA wurde 18-24 h nach der Stimulation IFN-α im Überstand gemessen. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Mit dem zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt (*=p≤0,05).

Die steigernde Wirkung UV-modifizierter 3-P-RNA auf die IFN-α-Induktion konnte außerdem in humanen MoDCs sowie BDCA-1$^+$ DCs beobachtet werden, die aus Blut von gesunden Spendern mittels magnetischer Separation isoliert worden waren (Abbildung 3.22).

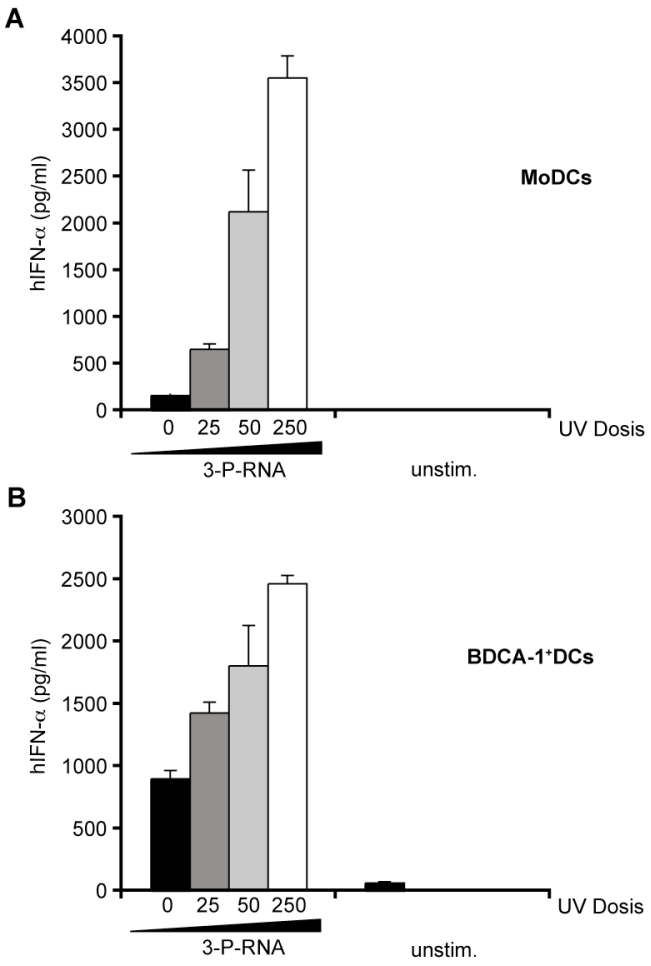


Abbildung 3.22: Gesteigerte IFN-α-Produktion in humanen MoDCs sowie BDCA-1$^+$ DCs infolge Stimulation mit UV-modifizierter 3-P-RNA.

3-P-RNA wurde mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 25, 50 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt und je 200 ng in humane MoDCs (A) bzw. BDCA-1$^+$ DCs (B) transfiziert. 18-24 h später wurde der IFN-α-Gehalt in den Überständen mit ELISA bestimmt. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

3.12 Die Basenzusammensetzung hat keine entscheidende Auswirkung auf die Aktivitätssteigerung von UV-bestrahlten Nukleinsäuren

Es stellte sich die Frage, welche Art von UV-induzierten Modifikationen in den Nukleinsäuren zu der Verstärkung ihrer stimulatorischen Wirkung führte. Es ist bekannt, dass UV-Strahlung zu direkten Veränderungen in der DNA führen kann, indem sie durch Absorption der Strahlungsenergie photochemische Reaktionen zwischen den Basen auslöst, das so genannte „Photocrosslinking“. Auf diese Weise können unter dem direkten Einfluss von UV-Strahlung CPDs (Ley, 1983) und 6-4-PPs (Rosenstein and Mitchell, 1987) in der DNA gebildet werden, wobei CPDs zehnmal häufiger entstehen als 6-4-PPs (Kao et al., 1993). Während bei der Bildung von CPDs die Bindung zwischen zwei benachbarten Pyrimidin-Molekülen an den Positionen 5 und 6 geknüpft wird, entsteht bei den 6-4-PPs eine Verbindung zwischen der C6-Position des 5’-Pyrimidins und der C4-Position des 3’-Pyrimidins (Rosenstein and Mitchell, 1987). Besonders gefährdet für die Bildung solcher Photoprodukte sind so genannte „hot spots“ auf der DNA, wo sich zwei Thymin-Moleküle in direkter Nachbarschaft auf einem DNA-Strang befinden (Brash and Haseltine, 1982).

Es sollte untersucht werden, ob solche Modifikationen die Ursache für die Steigerung der stimulatorischen Aktivität von Nukleinsäuren waren und ob bestimmte Basensequenzen damit korrelierten. Dazu wurden DNA-Oligonukleotide von 54 bp Länge entworfen, deren Einzelstränge sich aus repetitiven Basendupletts oder -tripletts zusammensetzten und die zum Teil solche „hot spots“ beinhalteten. Diese sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Es wurde entweder der „sense“- oder der „antisense“-Strang der DNA-Oligonukleotide mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 50 bzw. 250 mJ/cm^2 bestrahlt und dann mit dem komplementären Gegenstrang hybridisiert. Murine Wildtyp-mDCs wurden mit je 400 ng der DNA-Oligonukleotide stimuliert, wobei TransIT-LT1 als Transfektionsreagenz diente, und 18-24 h inkubiert. Die Messung von IFN-α im Überstand zeigte, dass alle untersuchten DNA-Oligonukleotide im unbestrahlten Zustand wenn überhaupt nur sehr wenig IFN-α induzierten (Abbildung 3.23). Durch UV-Bestrahlung wurde ihre stimulatorische Aktivität jedoch deutlich verstärkt und sie induzierten mit steigender Strahlendosis zunehmend IFN-α. Überraschenderweise galt dies für alle untersuchten DNA-Oligonukleotide. Die Basenzusammensetzung war dabei irrelevant. Folglich war davon auszugehen, dass kein Zusammenhang zwischen der Basenzusammensetzung und dem Grad der Aktivitätssteigerung von UV-bestrahlten Nukleinsäuren bestand. Die

Aktivitätssteigerung konnte somit nicht allein auf direkte DNA-Schäden wie die Ausbildung von CPDs oder 6-4-PPs zurückgehen.

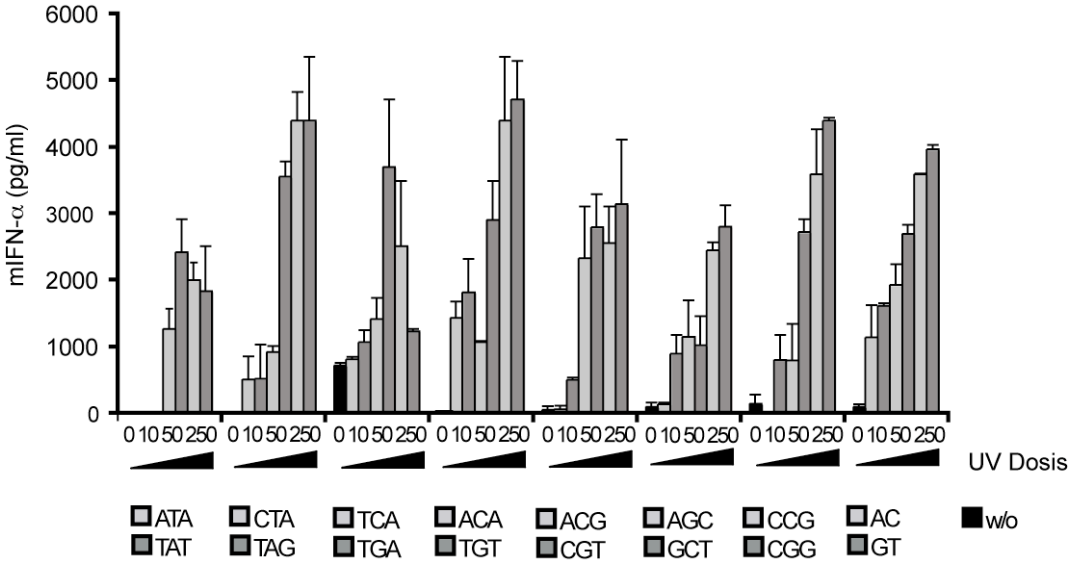


Abbildung 3.23: Irrelevanz der Basenzusammensetzung für die Verstärkung der IFN-α-Induktion nach Stimulation mit UV-modifizierten DNA-Oligonukleotiden.

Der „sense"-Strang oder der „antisense"-Strang von DNA-Oligonukleotiden mit einer Länge von 54 bp und aus den angegebenen repetitiven Basendupletts oder -tripletts bestehend wurde mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 50 bzw. 250 mJ/cm^2 bestrahlt, mit dem komplementären Gegenstrang hybridisiert und je 400 ng in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Nach 18-24 h wurde mittels ELISA IFN-α in den Überständen gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.13 Der UV-Effekt kann durch H_2O_2-Behandlung imitiert werden

Neben der direkten physikalischen Schädigung von DNA durch Absorption von UV-Strahlung läuft ein indirekter Schädigungsmechanismus der DNA über die Generierung von ROS ab. Bei diesem Mechanismus wird die Strahlungsenergie nicht von der DNA sondern zunächst von einem Photosensibilisator-Molekül absorbiert und dann auf molekularen Sauerstoff transferiert, was zur Bildung von radikalischen und nichtradikalischen Sauerstoffmolekülen führt, die entweder selbst eine oxidierende Wirkung besitzen und/oder leicht in Radikale umgewandelt werden, die mit der DNA wechselwirken können. Als Vertreter der ROS treten infolge von UV-Strahlung unter

anderem das Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet -}$), das Hydroperoxyl-Radikal ($HO_2^{\bullet -}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxylradikal ($OH^{\bullet}$) und Lipidperoxidationsprodukte wie das Cholesterinepoxid auf (Dizdaroglu et al., 1993; Epe, 1996; Halliwell and Aruoma, 1991). Von den ROS ist das Hydroxylradikal für den größten Anteil an Schäden verantwortlich, wohingegen Peroxylradikale und Wasserstoffperoxid nicht direkt, sondern über reaktivere Zwischenstufen mit der DNA reagieren. Der Angriff von Hydroxylradikalen kann zu vielfältigen strukturellen Veränderungen führen, darunter Hydroxylierungen, Ringöffnungen, DNA-Strangbrüchen und Fragmentierungen. Ein wichtiges Produkt, das unter dem Einfluss von Hydroxylradikalen gebildet wird, ist das 8-oxo-dG bzw. 8-OH-dG, das durch Oxidation des Guanins in 4-, 5- oder 8-Position des Purinrings gebildet wird (Floyd et al., 1988; Kasai, 1997). Dieses paart sich bei der Replikation mit Cytosin, aber auch häufig mit Adenin, was zu einer mutagenen Transversion von G-C zu A-T in der DNA führt (Grollman and Moriya, 1993; Kasai, 1997; Wood et al., 1990). Solche oxidativen Schäden an Nukleinsäuren entstehen jedoch nicht nur infolge der UV-induzierten Generierung von ROS, sondern können auch durch eine H_2O_2-Behandlung ausgelöst werden. So wurde beschrieben, dass Fibroblasten, Hepatozyten, Lymphozyten und andere Zelltypen *in vitro* gleichermaßen auf UV-Bestrahlung wie auf eine Behandlung mit H_2O_2 reagieren (Herrlich et al., 2008).

Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob der beobachtete UV-Effekt durch H_2O_2-Behandlung der Zellen nachgeahmt werden konnte. Dazu wurden RMA Zellen mit H_2O_2 in Konzentrationen von 0, 0,1 und 1 mM für 10 bzw. 30 min inkubiert. Anschließend wurde die genomische DNA aufgereinigt und je 400 ng in murine Wildtyp-mDCs unter Verwendung von TransIT-LT1 transfiziert. Zur Kontrolle der Funktionalität der mDCs wurde zusätzlich poly I:C transfiziert. 18-24 h danach wurde die IFN-α-Sekretion in den Überständen der mDCs mittels ELISA gemessen (Abbildung 3.24 A).

Es zeigte sich, dass die genomische DNA aus H_2O_2-behandelten Zellen (2 µg/ml) eine stärkere Aktivität im Hinblick auf die Induktion von IFN-α besaß als die genomische DNA aus unbehandelten Zellen, die erwartungsgemäß nur sehr wenig IFN-α induzierte. Um die IFN-α-Induktion signifikant zu verstärken, reichte bereits eine kurze Inkubation der RMA Zellen mit geringen Konzentrationen von H_2O_2 aus. Eine Aktivitätssteigerung von genomischer DNA, wie sie durch UV-Bestrahlung induziert wurde, konnte also auch durch die H_2O_2-Behandlung von Zellen erzielt werden.

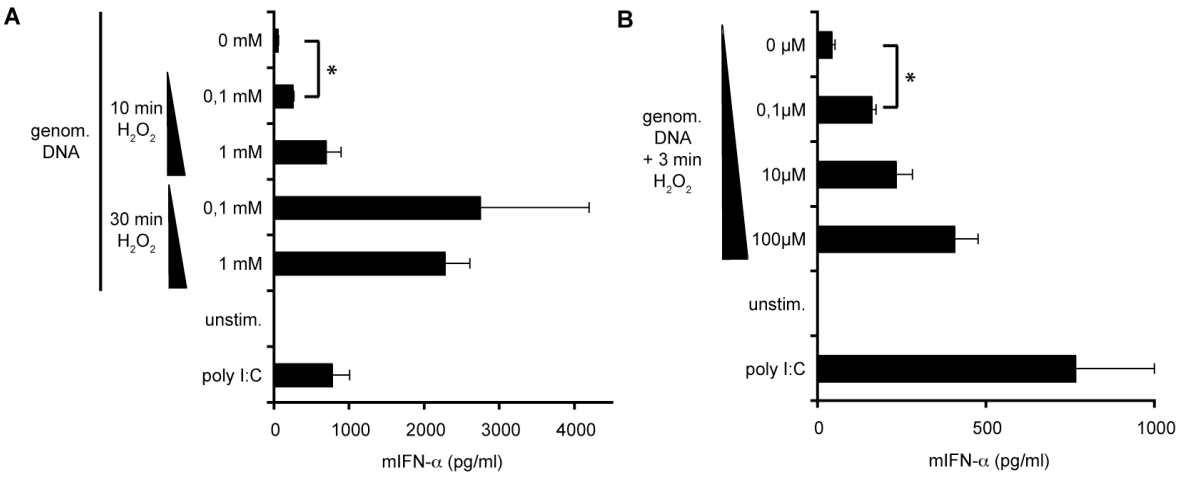


Abbildung 3.24: Verstärkte IFN-α-Induktion in murinen mDCs durch Stimulation mit H_2O_2-modifizierter DNA.

RMA Zellen wurden mit H_2O_2 in Konzentrationen von 0, 0,1 oder 1 mM für 10 bzw. 30 min inkubiert. Anschließend wurde deren genomische DNA isoliert und je 400 ng in murine Wildtyp-mDCs transfiziert (A). Genomische DNA aus RMA Zellen wurde mit H_2O_2 in Dosen von 0, 0,1, 10 oder 100 µM für 3 min behandelt, per Ethanolfällung aufgereinigt und ebenfalls in murine Wildtyp-mDCs transfiziert (B). Als Kontrolle wurden mDCs zusätzlich mit poly I:C stimuliert. 18-24 h nach der Stimulation wurde die IFN-α-Sekretion in den Überständen mittels ELISA detektiert. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Mit dem zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz bestimmt (*=$p \leq 0{,}05$).

Die Beobachtungen, dass die immunstimulatorische Wirkung von genomischer DNA nicht nur durch eine Bestrahlung der gesamten Zelle sondern auch durch direkte Bestrahlung gesteigert werden konnte, führten außerdem zu der Überlegung, ob dies auch durch direkte Behandlung von DNA mit H_2O_2 zu imitieren sei. Die genomische DNA aus RMA Zellen wurde daher für 3 min mit H_2O_2 in Konzentrationen von 0, 0,1, 10 bzw. 100 µM inkubiert und nach ihrer Aufreinigung per Ethanolfällung, wie zuvor beschrieben, in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Die IFN-α-Messung 18-24 h später bestätigte, dass die direkte Behandlung von genomischer DNA mit H_2O_2 ebenfalls ihre stimulatorische Aktivität steigerte und infolgedessen signifikant mehr IFN-α von den mDCs ausgeschüttet wurde (Abbildung 3.24 B).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass der beobachtete UV-Effekt durch H_2O_2-Behandlung imitiert werden konnte und demzufolge vermutlich durch ROS induzierte Modifikationen in der DNA die Aktivitätssteigerung bewirkten.

3.14 Die durch ROS induzierte oxidative Basenmodifikation 8-OH-dG ist in der genomischen DNA UV-bestrahlter Zellen nachweisbar

Unter den zahlreichen Möglichkeiten der DNA-Modifizierung durch ROS wie beispielsweise Basenpaarung, Strangbruch oder Adduktbildung stellt letztere, das heißt die Bildung oxidativer Basenmodifikationen, ein intensiv untersuchtes Gebiet dar. Bislang sind ungefähr 20 oxidative DNA-Addukte strukturell charakterisiert (Henle et al., 1996a; Henle et al., 1996b). Am häufigsten und auch am besten untersucht ist die Guaninimodifikation 8-OH-dG, die durch Oxidation des Guanins in 4-, 5- oder 8-Position des Purinrings entsteht (Floyd et al., 1988; Kasai, 1997) und als charakteristischer Marker für DNA-Oxidation nachgewiesen werden kann.

Aufgrund des Befundes, dass durch ROS induzierte Modifikationen die immunstimulatorischen Eigenschaften von Nukleinsäuren verstärkt werden konnten, stellte sich die Frage, ob möglicherweise 8-OH-dG eine solche Modifikation darstellen könnte. In einem ersten Schritt wurde daher geprüft, inwieweit in der genomischen DNA von Zellen infolge von UV-Bestrahlung 8-OH-dG entsteht. Dazu wurden RMA Zellen mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 250 und 1000 mJ/cm^2 bestrahlt und nach 18 h Inkubation wurde deren genomische DNA isoliert. Nach Hitzedenaturierung wurde die genomische DNA durch Nuclease P1- und Phosphatase-Behandlung enzymatisch in ihre Nukleotide zerlegt und anschließend der Gehalt an 8-OH-dG mit dem 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit photometrisch bestimmt (Abbildung 3.25 A). Da die Absorption umgekehrt proportional zur Menge des freien 8-OH-dG in der analysierten Probe ist, zeigten die geringeren Absorptionsraten der genomischen DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen gegenüber der aus unbestrahlten RMA Zellen das Vorhandensein von 8-OH-dG an.

Zur Kontrolle wurde außerdem die IFN-α-Sekretion in murinen Wildtyp-mDCs nach Stimulation mit der genomischen DNA aus unbestrahlten und bestrahlten RMA Zellen (2 µg/ml) gemessen (Abbildung 3.25 B), welche die signifikante Aktivitätssteigerung UV-modifizierter DNA belegte.

Damit konnte 8-OH-dG als Ursache für die verstärkte stimulatorische Wirkung von DNA infolge von UV-Bestrahlung in Frage kommen.

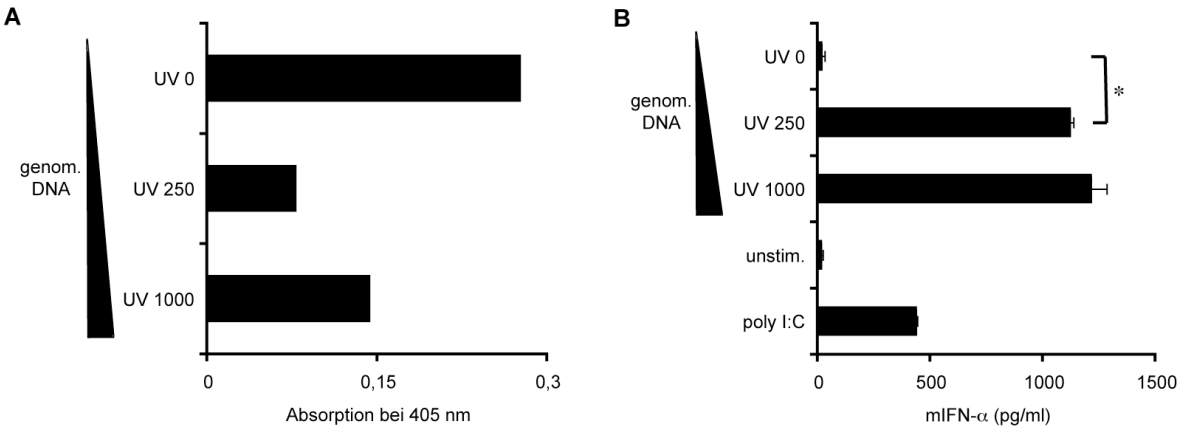


Abbildung 3.25: Nachweis von 8-OH-dG in der genomischen DNA UV-bestrahlter Zellen.
RMA Zellen wurden mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 250 und 1000 mJ/cm^2 bestrahlt und nach 18 h wurde deren genomische DNA aufgereinigt. Nach Nuclease P1- und Phosphatase-Verdau wurde der Gehalt an 8-OH-dG mit dem 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit gemessen (A). Je 400 ng der genomischen DNA wurden außerdem in murine Wildtyp-mDCs transfiziert und die IFN-α-Induktion 18-24 h später mit ELISA bestimmt (B). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (A) bzw. der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses (B) von drei unabhängigen Experimenten. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz berechnet (*=p≤0,05).

3.15 Durch Inkorporation von 8-OH-dG/8-OH-G in Nukleinsäuren kann deren stimulatorische Wirkung gezielt verstärkt werden

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, dass durch den gezielten Einbau von 8-OH-dG bzw. 8-OH-G in Nukleinsäuren deren stimulatorische Aktivität gesteigert werden konnte. Um 8-OH-dG in DNA zu inkorporieren, wurde eine beliebig ausgewählte 1,5 kB lange DNA-Sequenz unter Zugabe von 8-OH-dGTP und unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase per PCR amplifiziert. Der Anteil des 8-OH-dGTP an den dNTPs betrug in den verschiedenen Reaktionsansätzen 0 %, 0,1 % bzw. 10 %. Über eine gelelektrophoretische Größentrennung der DNA erfolgte der Nachweis der Amplifikation. Diese ist in Abbildung 3.26 dargestellt. In allen Reaktionsansätzen umfassten die per PCR generierten DNA-Fragmente 1,5 kB und waren als einzelne klare Bande zu erkennen. Zur schnellen und effizienten Aufreinigung der PCR-Produkte dienten das innuPrep PCR pure Kit der Firma Analytic Jena sowie eine anschließende Ethanolpräzipitation, um die vollständige Entfernung von überschüssigem 8-OH-dGTP zu gewährleisten.

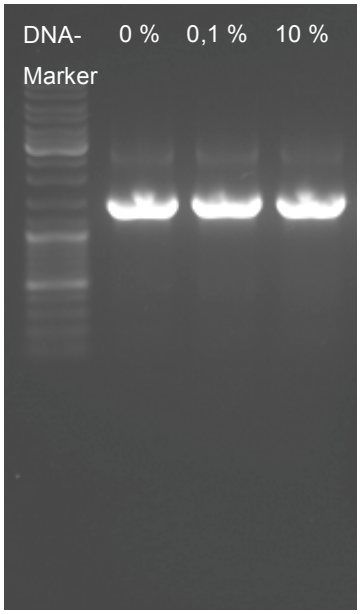


Abbildung 3.26: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit inkorporiertem 8-OH-dGTP. Eine 1,5 kB lange DNA-Sequenz wurde unter Zugabe von 8-OH-dGTP mit der Phusion DNA-Polymerase per PCR amplifiziert, wobei der Anteil des 8-OH-dGTP an den dNTPs 0 %, 0,1 % bzw. 10 % ausmachte. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden 5 µl des PCR-Ansatzes plus 1/6 Volumen Ladepuffer auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen. Der Marker (GeneRuler DNA Ladder Mix) wurde in einem Volumen von 4 µl auf das Gel aufgetragen. Ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Zum Nachweis von effizient inkorporiertem 8-OH-dGTP wurden die PCR-Produkte nach Hitzedenaturierung mit Nuclease P1 und Phosphatase behandelt und dann mit dem 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit auf ihren 8-OH-dG-Gehalt überprüft (Abbildung 3.27 A). Das PCR-Produkt aus Reaktionsansätzen ohne 8-OH-dGTP wies eine höhere Absorptionsrate auf als PCR-Produkte aus Reaktionsansätzen mit zugegebenem 8-OH-dGTP. Außerdem nahm mit Zunahme des 8-OH-dGTP-Anteils in den PCR-Ansätzen die Absorption der generierten PCR-Produkte ab. Dies sprach für einen effizienten, konzentrationsabhängigen Einbau von 8-OH-dGTP. Als Kontrolle mitgeführte PCR-Produkte, deren Reaktionsansatz erst direkt vor der Aufreinigung mit freiem 8-OH-dGTP versehen wurde, besaßen hingegen annähernd die gleichen Absorptionsraten wie PCR-Produkte ohne 8-OH-dGTP-Einbau (Daten nicht aufgeführt).

Um zu prüfen, ob 8-OH-dG eine hinreichende Modifikation zur Aktivitätssteigerung von DNA war, wurden je 400 ng der PCR-Produkte unter Verwendung von TransIT-LT1 in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Zur Kontrolle der Funktionalität der mDCs wurde zusätzlich poly I:C transfiziert. Die Messung von IFN-α in den Überständen 18-24 h später zeigte, dass das PCR-Produkt ohne inkorporiertes 8-OH-dGTP wenig IFN-α induzierte, die IFN-α-Antwort jedoch durch 8-OH-dGTP-Einbau in die DNA signifikant verstärkt

werden konnte (Abbildung 3.27 B). Je mehr 8-OH-dGTP inkorporiert worden war, desto höher war die stimulatorische Aktivität der DNA.

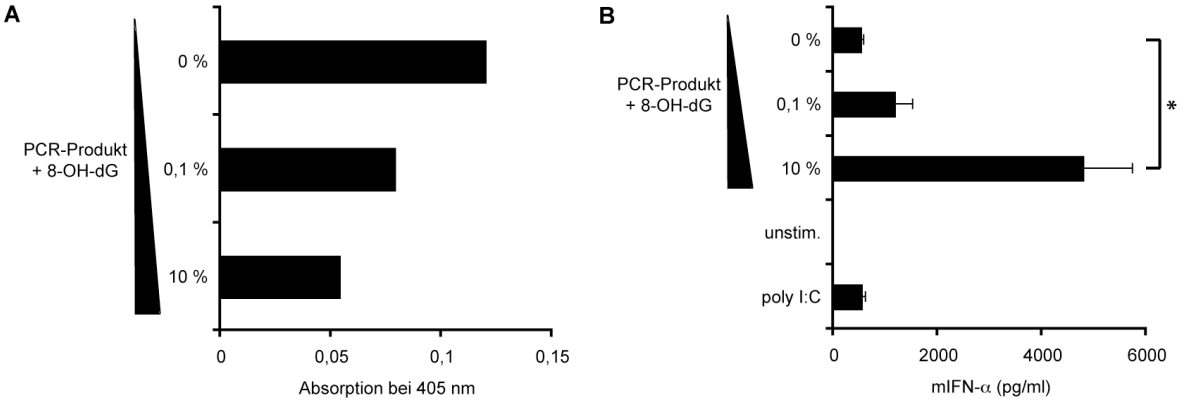


Abbildung 3.27: Verstärkung der stimulatorischen Aktivität von PCR-Produkten durch Einbau von 8-OH-dGTP.

Eine 1,5 kB lange DNA-Sequenz wurde unter Zugabe unterschiedlicher Mengen an 8-OH-dGTP mit der Phusion DNA-Polymerase per PCR amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Der Einbau von 8-OH-dGTP in die PCR-Produkte wurde nach deren enzymatischem Verdau mit dem 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit überprüft (A). Murine Wildtyp-mDCs wurden mit je 400 ng der (un)modifizierten PCR-Produkten bzw. als Kontrolle mit poly I:C stimuliert und nach 18-24 h wurde die IFN-α-Sekretion in den Überständen mit ELISA gemessen (B). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (A) bzw. der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (B). Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz berechnet (*=$p \leq 0{,}05$).

Auch RNA sollte diesbezüglich getestet werden. Mit Hilfe der *in vitro*-Transkription wurde 3-P-RNA unter Beigabe von 8-OH-GTP synthetisiert, wobei der Anteil des 8-OH-GTP an den NTPs 0 %, 0,1 %, 1 % bzw. 10 % betrug. Um Salze und vor allem überschüssige Nukleotide komplett zu entfernen, wurde die synthetisierte 3-P-RNA anschließend über eine Mini Quick Spin-Säule aufgereinigt. Der Gehalt an 8-OH-G wurde nach enzymatischem Verdau der 3-P-RNA mit dem 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit bestimmt (Abbildung 3.28 A). Anhand der niedrigeren Absorptionsraten von 3-P-RNAs, die unter Zugabe von 8-OH-GTP hergestellt worden waren, gegenüber der von unmodifizierter 3-P-RNA, konnte der erfolgreiche Einbau von 8-OH-GTP in die 3-P-RNA nachgewiesen werden. Je mehr 8-OH-GTP der Synthese zugefügt worden war, desto mehr wurde auch in die 3-P-RNA inkorporiert.

Zur Analyse, ob die Guaninmodifikation auch in RNA eine Aktivitätssteigerung bewirkte, wurden je 200 ng der (un)modifizierten 3-P-RNA mit Lipofectamine™ 2000 komplexiert in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Dem IFN-α-ELISA zufolge, der 18-24 h später durchgeführt wurde, induzierte 3-P-RNA mit inkorporiertem 8-OH-GTP signifikant mehr

IFN-α in den mDCs als unmodifizierte 3-P-RNA (Abbildung 3.28 B). Dazu genügten bereits sehr geringe Mengen von 8-OH-GTP.

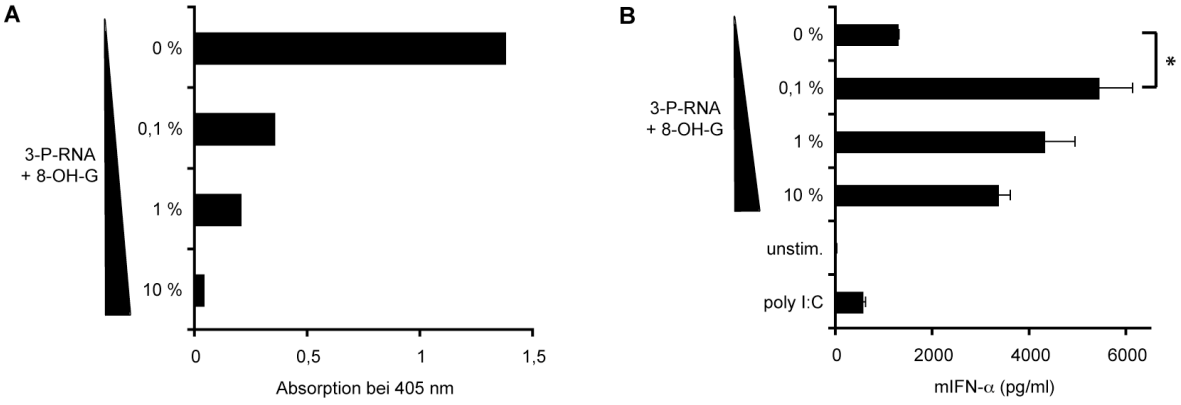


Abbildung 3.28: Steigerung der stimulatorischen Wirkung von 3-P-RNA durch 8-OH-GTP-Einbau. 3-P-RNA wurde unter Zugabe unterschiedlicher Mengen an 8-OH-GTP mittels *in vitro*-Transkription hergestellt und anschließend aufgereinigt. Nach Nuclease P1- und Phosphatase-Behandlung der 3-P-RNA wurde ihr 8-OH-G-Gehalt mit dem 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin EIA Kit bestimmt (A). Murine Wildtyp-mDCs wurden mit je 200 ng der (un)modifizierten 3-P-RNA bzw. als Kontrolle mit poly I:C stimuliert. Nach 18-24 h wurde IFN-α im Überstand mit ELISA gemessen (B). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (A) bzw. der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (B). Mit dem zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz bestimmt (*=p≤0,05).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ließ sich der beobachtete UV-Effekt wie folgt erklären: Durch UV-Strahlung wurden ROS generiert, die durch Oxidation von DNA und RNA die Basenmodifikation 8-OH-dG bzw. 8-OH-G induzierten. Diese und möglicherweise auch andere Modifikationen führten wiederum zu einer Verstärkung der stimulatorischen Wirkung der Nukleinsäuren, die sich in einer gesteigerten IFN-α-Induktion äußerte.

3.16 UV-modifizierte DNA induziert auch *in vivo* erhöhte IFN-α-Titer

Die verstärkte Immunerkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren könnte bei Immunreaktionen in der Haut von großer Wichtigkeit sein. Um die *in vivo*-Relevanz dieses UV-Effektes zu untersuchen, wurden Mausversuche durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente wurden genomische DNA aus RMA Zellen sowie ein 54 bp langes, dsDNA-Oligonukleotid, bestehend aus dem repetitiven Basentriplett CCG bzw. CGG, mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 50 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt. Je 50 µg der genomischen DNA bzw. 20 µg des DNA-Oligonukleotids wurden mit Dotap im Verhältnis 1:2 und in einem Volumen von 600 µl komplexiert und Wildtyp-Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Zur Überprüfung der nicht-stimulatorischen Wirkung von Dotap, wurde Mäusen 20 µg eines schwach immunogenen, dsDNA-Oligonukleotids mit der repetitiven Sequenz ATA bzw. TAT in komplexierter Form verabreicht. Als Positivkontrolle wurde Mäusen 20 µg unkomplexiertes poly I:C i.v. injiziert. Als Negativkontrolle blieben Mäuse unbehandelt. Nach 4 und 6 h wurde den Versuchsmäusen Blut entnommen und das IFN-α im Serum gemessen (Abbildung 3.29). Wildtyp-Mäuse, denen das DNA-Oligonukleotid (ATA+TAT) komplexiert mit Dotap injiziert worden war oder die unbehandelt geblieben waren, produzierten wie erwartet kaum bzw. kein IFN-α. Die Injektion von poly I:C induzierte hingegen substanzielle Mengen von IFN-α (2000 pg/ml). Bei Mäusen, denen genomische DNA verabreicht worden war, war zu beobachten, dass die IFN-α-Konzentration im Serum nach Injektion UV-bestrahlter genomischer DNA signifikant höher war als nach Injektion unbestrahlter genomischer DNA. Mit steigender Strahlendosis war eine Zunahme der IFN-α-Konzentration im Serum festzustellen. Während unbestrahlte genomische DNA maximal 300 pg/ml IFN-α induzierte, induzierte genomische DNA, die mit UV-C-Licht in Dosen von 50 oder 250 mJ/cm^2 bestrahlt worden war, bis zu 1500 bzw. 2200 pg/ml IFN-α, wobei der IFN-α-Spiegel nach 4 und 6 h annähernd konstant blieb. Gleichermaßen war der UV-Effekt im Serum von Mäusen zu beobachten, denen das DNA-Oligonukleotid (CCG+CGG) injiziert worden war. Unbestrahltes DNA-Oligonukleotid induzierte maximal 500 pg/ml IFN-α, mit UV-C-Licht in Dosen von 50 oder 250 mJ/cm^2 bestrahltes DNA-Oligonukleotid mit bis zu 1000 bzw. 2500 pg/ml IFN-α jedoch deutlich mehr. Auch hier unterschieden sich die IFN-α-Konzentrationen in den Seren nach 4 und 6 h kaum.

Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass es sich bei dem UV-Effekt nicht nur um ein *in vitro*-Phänomen handelte, sondern dass er auch *in vivo* eine Rolle spielte.

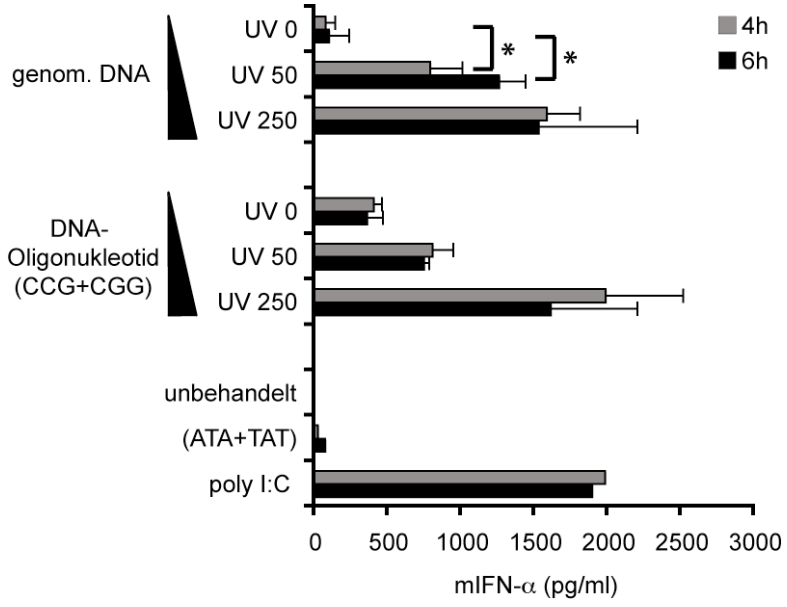


Abbildung 3.29: Steigerung der IFN-α-Produktion in Wildtyp-Mäusen durch i.v. Injektion von UV-modifizierter DNA.

Genomische DNA aus RMA Zellen bzw. ein 54 bp langes, dsDNA-Oligonukleotid, das sich aus dem repetitiven Basentripplet CCG bzw. CGG zusammensetzte, wurden mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 50 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt. Wildtyp-Mäusen wurden jeweils entweder 50 µg genomische DNA oder 20 µg des DNA-Oligonukleotids komplexiert mit Dotap i.v. injiziert. Zur Überprüfung der nicht-stimulatorischen Wirkung von Dotap wurde Mäusen 20 µg des schwach immunogenen dsDNA-Oligonukleotids (ATA+TAT) in komplexierter Form gespritzt und als Positivkontrolle wurde Mäusen 20 µg unkomplexiertes poly I:C gespritzt. Blut von den behandelten und auch von unbehandelten Mäusen wurde 4 und 6 h nach der Injektion entnommen und IFN-α im Serum mit dem murinen IFN-α-ELISA bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2-3) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten. Mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz berechnet (*=p≤0,05).

3.17 An der Erkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren ist möglicherweise ein zweiter, synergistisch wirkender Signalweg beteiligt

Wie UV-modifizierte Nukleinsäuren erkannt wurden und über welchen Mechanismus sie die verstärkte IFN-α-Induktion vermittelten, war noch unklar. Mittels eines Kotransfektionsexperimentes sollte daher herausgefunden werden, ob möglicherweise zwei Signalwege dabei miteinander interagierten und die Erkennung von Nukleinsäure und ROS bedingter, oxidativer Basenmodifikation über zwei unterschiedliche Rezeptoren erfolgte. Dazu wurden poly I:C, poly dAdT und 3-P-RNA jeweils mit dem schwach

immunogenen, dsDNA-Oligonukleotid (ATA+TAT), das zuvor mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 25 und 50 mJ/cm^2 bestrahlt worden war, in murine Wildtyp-mDCs kotransfiziert. Der Transfektionsansatz setzte sich aus 200 ng poly I:C plus 200 ng (un)bestrahltes DNA-Oligonukleotid und TransIT-LT1 bzw. aus 100 ng poly dAdT oder 3-P-RNA plus 100 ng (un)bestrahltes DNA-Oligonukleotid und Lipofectamine™ 2000 zusammen. Als Kontrolle wurden poly I:C, poly dAdT und 3-P-RNA sowie (un)bestrahltes DNA-Oligonukleotid außerdem allein in die mDCs transfiziert. Dabei wurden die gleichen Transfektionsreagenzien verwendet, jedoch die doppelte Stimulimenge. Nach 18-24 h wurden die Überstände der mDCs auf IFN-α untersucht (Abbildung 3.30).

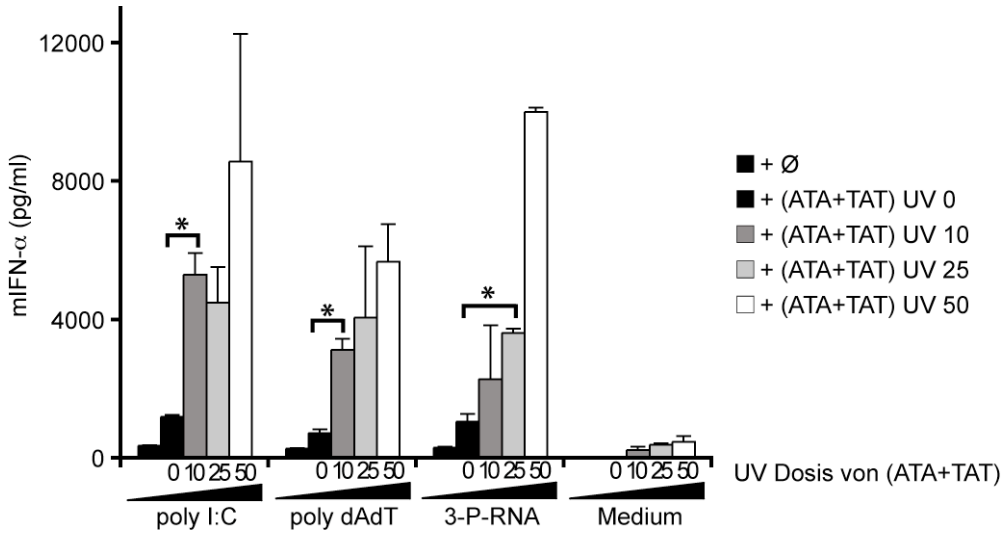


Abbildung 3.30: Gesteigerte IFN-α-Produktion in murinen mDCs durch Kostimulation von zytosolischen Nukleinsäurerezeptorliganden mit UV-bestrahlter nicht-stimulatorischer DNA.
poly I:C, poly dAdT und 3-P-RNA wurden jeweils mit einem schwach immunogenen, 54 bp langen dsDNA-Oligonukleotid, bestehend aus dem repetitiven Basentriplett ATA bzw. TAT, in murine Wildtyp-mDCs kotransfiziert, wobei das DNA-Oligonukleotid zuvor mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 25 und 50 mJ/cm^2 bestrahlt worden war. Als Kontrolle wurden poly I:C, poly dAdT und 3-P-RNA sowie das (un)bestrahlte DNA-Oligonukleotid zusätzlich allein in mDCs transfiziert. 18-24 h später wurde das IFN-α in den Überständen mit ELISA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test bestimmt (*=p≤0,05).

Während das DNA-Oligonukleotid (ATA+TAT) erwartungsgemäß wenig IFN-α induzierte, führte die Stimulation mit poly I:C, poly dAdT und 3-P-RNA zu substanziellen Mengen IFN-α. Diese konnten durch Kotransfektion von (ATA+TAT) leicht gesteigert werden. Eine weitaus höhere Steigerung der IFN-α-Produktion in den mDCs konnte jedoch erreicht werden, wenn das kotransfizierte DNA-Oligonukleotid UV-bestrahlt worden war, wobei mit zunehmender vorher absorbierter Strahlendosis mehr IFN-α ausgeschüttet wurde. Auch

eine Kotransfektion, bei der die zytosolischen Nukleinsäureliganden in Kombination mit Einzelsträngen des unbestrahlten oder bestrahlten DNA-Oligonukleotids (ATA) oder (TAT) verwendet wurden, führte zu vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht aufgeführt). Dies deutete darauf hin, dass möglicherweise zwei synergistisch wirkende Signalwege an der Erkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren beteiligt waren.

Es war allerdings auch vorstellbar, dass das UV-bestrahlte DNA-Oligonukleotid die Aufnahme der kotransfizierten Nukleinsäure in die Zelle und auf diese Weise deren Erkennung beeinflusste. Um dies auszuschließen, wurde der DNA-Einzelstrang (ATA) mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 50 bzw. 250 mJ/cm^2 bestrahlt und zusammen mit einem fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotid per Lipofektion in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotids in die mDCs wurde nach 2, 6 und 18 h durchflusszytometrisch analysiert und war anhand einer FITC-Färbung der transfizierten Zellen nachweisbar. Im Rahmen dieser FACS-Analyse wurden mindestens 50.000 Events gesammelt und die lebenden Zellen im Hinblick auf ihre FITC-Intensität ausgewertet. Die erstellten Histogramme sind in Abbildung 3.31 illustriert. Sie zeigen zu allen gemessenen Zeitpunkten eine verbesserte Aufnahme des fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotids infolge einer Kotransfektion mit (ATA), belegen aber auch, dass das fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonukleotid, unabhängig davon ob der kotransfizierte DNA-Einzelstrang unbestrahlt oder bestrahlt war, gleichermaßen internalisiert wurde.

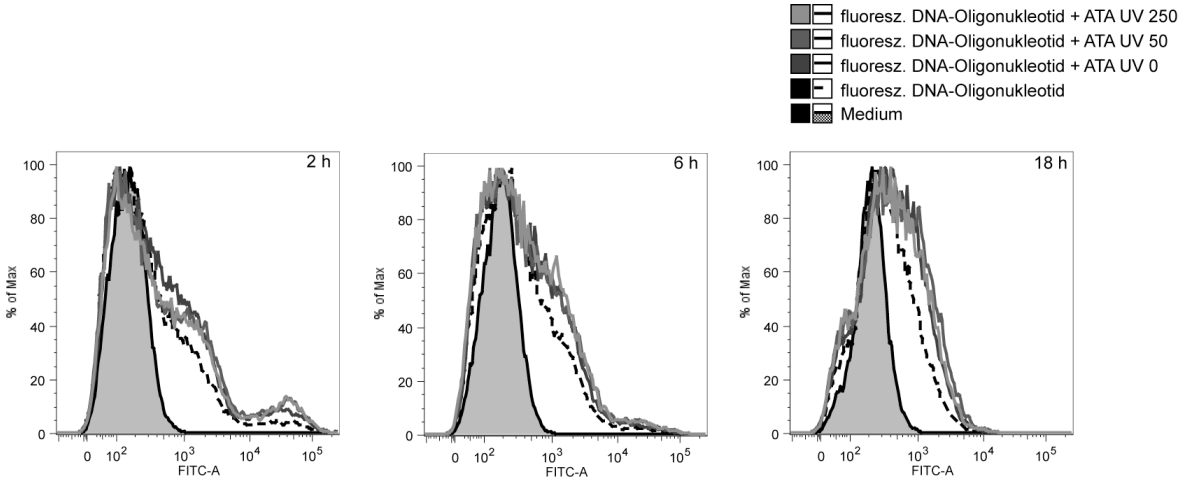


Abbildung 3.31: Das UV-bestrahlte DNA-Oligonukleotid beeinflusst nicht die Aufnahme einer weiteren kotransfizierten Nukleinsäure.

Ein DNA-Einzelstrang von 54 bp Länge und aus dem repetitiven Basentriplett ATA bestehend wurde mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 50 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt und zusammen mit einem FITC-markierten DNA-Oligonukleotid in murine Wildtyp-mDCs transfiziert. Als Kontrolle wurde das fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonukleotid auch alleine transfiziert. Nach 2, 6 und 18 h wurde die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotids in die mDCs anhand der FITC-Färbung mit dem Durchflusszytometer untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

3.18 Das NLRP3-Inflammasom spielt keine Rolle bei der Erkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren

Eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms an der Erkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren war denkbar. Bei dem NLRP3-Inflammasom handelt es sich um einen zytosolischen Proteinkomplex, der durch Bestandteile von Pathogenen, Harnsäurekristalle, aber auch Stress- bzw. Gefahrensignale wie UV-Strahlung stimuliert wird. Wird das NLRP3-Protein aktiviert, wobei dies nicht durch direkte Interaktion mit den Aktivatoren geschieht sondern vermutlich über eine indirekte Signalerkennung, rekrutiert es das Adapterprotein ASC sowie Caspase 1 zur Bildung des NLRP3-Inflammasoms. Dies führt zur Aktivierung von Caspase 1, die wiederum durch Spaltung der inaktiven Vorstufe Pro-IL-1β das pro-inflammatorische Zytokin IL-1β aktiviert. Die Sekretion von aktivem IL-1β löst Entzündungsreaktionen aus (Martinon et al., 2002). Interessanterweise verstärken die meisten identifizierten NLRP3-Aktivatoren die Generierung von ROS (Bryant and Fitzgerald, 2009; Martinon et al., 2002). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass andererseits Antioxidantien die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms inhibieren,

was ein weiteres Indiz für die essentielle Rolle von oxidativem Stress bzw. Redoxsignalen bei der NLRP3-Aktivierung darstellt. In diesem Zusammenhang wurde TXNIP/VDUPI als ein essentielles Protein identifiziert, das infolge von oxidativem Stress NLRP3 aktivieren kann (Zhou et al., 2010). UV-Strahlung induziert ein zelluläres Redoxungleichgewicht, das zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt und sich bei humanen Keratinozyten in der Sekretion von IL-1α und IL-1β äußert (Feldmeyer et al., 2007; Hewinson et al., 2008). Es wurde daher zunächst die IL-1β-Sekretion von murinen Wildtyp-mDCs (Abbildung 3.32 A) sowie murinen 129 WT Makrophagen (Abbildung 3.32 B) nach Stimulation mit genomischer DNA aus RMA Zellen (2 µg/ml) untersucht. Neben erhöhten IFN-α-, IP-10-, IL-6- und IL-12p40-Mengen (Abbildung 3.7, Abbildung 3.9 A und B) induzierte genomische DNA aus UV-C-bestrahlten RMA Zellen auch eine signifikant verstärkte IL-1β-Sekretion gegenüber genomischer DNA aus unbestrahlten RMA Zellen. Die Ausschüttung von IL-1β sprach für eine Inflammasom-Aktivierung.

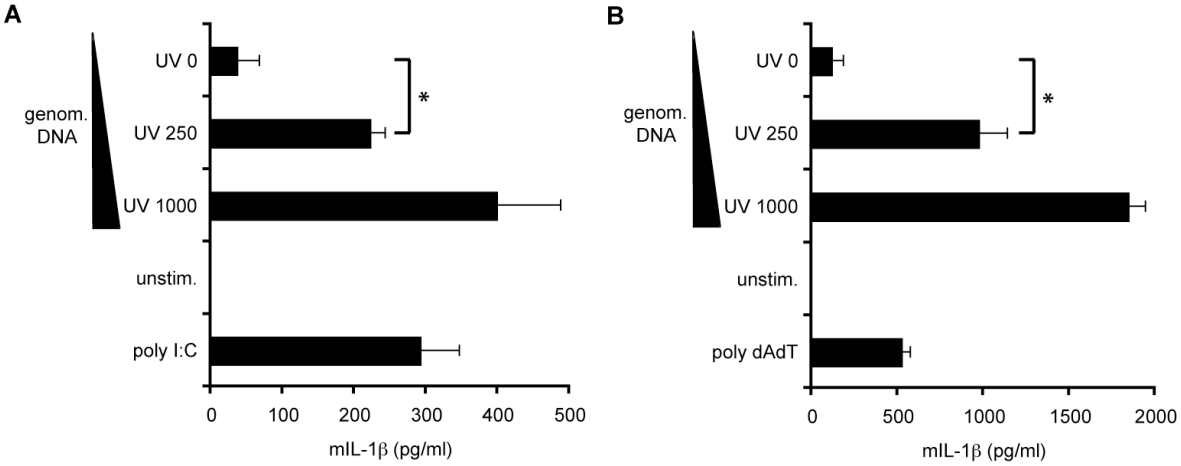


Abbildung 3.32: Verstärkte IL-1β-Sekretion in murinen mDCs sowie 129 WT Makrophagen nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen.
Genomische DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde isoliert und murine Wildtyp-mDCs (A) sowie murine 129 WT Makrophagen (B) mit je 400 ng stimuliert. Als Kontrollstimulus diente poly I:C (A) bzw. poly dAdT (B). 18-24 h nach der Stimulation wurden die Überstände mit ELISA auf IL-1β untersucht. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test ermittelt (*=p≤0,05).

Unklar war jedoch, ob es sich bei dem aktivierten Inflammasom um das NLRP3-Inflammasom handelte oder ob die IL-1β-Sekretion AIM2 bedingt war. AIM2 ist ein zytosolischer DNA-Sensor, der nach Bindung von dsDNA das AIM2-Inflammasom zur Aktivierung von Caspase 1 bildet und ebenfalls zur Sekretion von IL-1β führt, die IFN-α-

Induktion jedoch nicht beeinflusst (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009).

Um zu klären, inwieweit das NLRP3-Inflammasom eine Rolle bei der Erkennung UV-modifizierter Nukleinsäuren und bei der verstärkten IFN-α-Induktion spielte, wurden mDCs aus Knochenmarkszellen von Wildtyp-, ASC-defizienten sowie NLRP3-defizienten Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert. Genomische DNA aus unbestrahlten bzw. UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde in die mDCs transfiziert, wobei je 400 ng genomische DNA mit TransIT-LT1 komplexiert wurden. Poly I:C diente als Stimulationskontrolle. Nach 18-24 h wurde ein ELISA zur Messung des IFN-α-Gehalts in den Überständen durchgeführt (Abbildung 3.33 A).

Weder die ASC- noch die NLRP3-Defizienz hatten einen Einfluss auf die verstärkte IFN-α-Sekretion der mDCs nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen (2 µg/ml). Die IFN-α-Induktion in ASC ko- sowie NLRP3 ko-mDCs unterschied sich generell kaum von der in Wildtyp-mDCs. In den ASC ko-mDCs war lediglich ein etwas niedrigerer IFN-α-Spiegel nach poly I:C-Stimulation festzustellen.

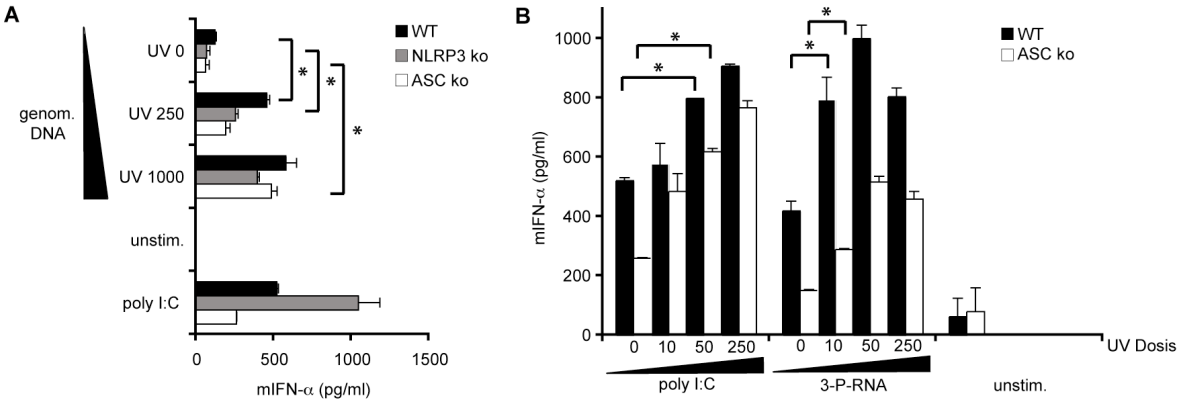


Abbildung 3.33: Unabhängig vom Inflammasom erhöhte IFN-α-Sekretion in murinen mDCs nach Stimulation mit UV-modifizierten Nukleinsäuren.

mDCs wurden aus den Knochenmarkszellen von Wildtyp-, NLRP3-defizienten sowie ASC-defizienten Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert. Genomische DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen wurde isoliert und mDCs mit je 400 ng stimuliert. Als Kontrolle wurde poly I:C verwendet (A). mDCs wurden außerdem mit poly I:C und 3-P-RNA, die mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 50 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt worden waren, stimuliert (B). Nach 18-24 h wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf IFN-α untersucht. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test bestimmt (*=p≤0,05).

Des Weiteren wurden die zytosolischen Nukleinsäurerezeptorliganden poly I:C und 3-P-RNA, die mit UV-C-Licht in Dosen von 0, 10, 50 und 250 mJ/cm^2 bestrahlt worden waren, in ASC ko- sowie Wildtyp-mDCs transfiziert und deren IFN-α-Antwort 18-24 h später analysiert (Abbildung 3.33 B).
Auch hier war die UV-bedingte Steigerung der IFN-α-Sekretion nach zytosolischer Stimulation trotz ASC-Defizienz zu erkennen, obgleich der IFN-α-Spiegel in den ASC ko-mDCs abermals etwas niedriger war als in den Wildtyp-mDCs. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in unterschiedlichen Kulturbedingungen bei der Generierung der mDCs liegen.
Die Ergebnisse sprachen dennoch insgesamt dafür, dass das NLRP3-Inflammasom keine Rolle bei der Induktion einer verstärkten Immunantwort durch UV-modifizierte Nukleinsäuren spielte.

3.19 Screening nach einem den UV-Effekt vermittelnden Signalweg deutet auf eine Rolle von p38 und JNK bei der DNA-Erkennung hin

Es wurde ein weit gefächertes Screening nach einem den UV-Effekt vermittelnden Signalweg durchgeführt. Im Rahmen dessen wurden die Effekte von Inhibitoren unterschiedlichster Signalwege vor allem in murinen Wildtyp-mDCs getestet. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Inhibitoren, deren jeweiliges Zielprotein und den untersuchten Konzentrationsbereich. Bei diesem Screening wurde wie folgt vorgegangen: mDCs wurden mit den jeweiligen Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen für 1 h vorinkubiert und anschließend mit genomischer DNA aus unbestrahlten bzw. UV-C-bestrahten RMA Zellen stimuliert. Als interne Kontrolle wurden die mDCs zusätzlich mit poly I:C stimuliert. Der verwendete Transfektionsansatz setzte sich stets aus 200 ng Nukleinsäure plus TransIT-LT1 zusammen. Nach 18-24 h wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf IFN-α untersucht. Des Weiteren wurde die Viabilität der mDCs mit CellTiter-Blue bestimmt. Es wurde nach einer gezielten Inhibition der amplifizierten IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte DNA gesucht.

Inhibitor von	Substanz	Konzentrationsbereich
ATM	KU-55933	0,01-1 µM
Cdk2 Inhibitor (p21)	Cdk2 Inhibitor II	15-240 nM
DNA-PK	NU7026	2,5-40 µM
JAK3	Janex-1	6,25-100 µM
JNK	SP600125	2,5-40 µM
MAPK (ERK)	UO126	2,5-40 µM
NFAT	Cyclosporin A	0,25-4 µg/ml
NF-kB	BAY11-7082	2,5-40 µM
p38	SB202190	2,5-40 µM
PARP-1	IQD	0,1-1 µM
PI3K	Ly294002 3-Methyladenin Wortmannin	2,5-40 µM 37,5-600 nM 37,5-600 nM
PKC	Gö6850	0,25-4 µM
Stat5	STAT5	6,25-100 µM
Syk	Piceatannol	2,5-40 µM
Vav	6-Thio-GTP	2,5-40 µM

Tabelle 3.1: Getestete Inhibitoren, deren Zielproteine und der untersuchte Konzentrationsbereich.

Das Screening umfasste eine Vielzahl von Inhibitoren, deren Zielproteine eine essentielle Rolle bei der Signaltransduktion, -regulation oder transkriptionellen Aktivierung innehaben. Dazu zählten der Inhibitor der regulatorisch wirkenden Proteinkinase C (PKC), der Tyrosinkinase Syk („spleen tyrosine kinase“), die in der Weiterleitung von Signalen von Zelloberflächenrezeptoren involviert ist, der Vav-Proteine, die als GTP-Austauschfaktoren für Rho GTPasen wirken, sowie der JAK3, welche die Tyrosinaktivität am aktivierten Zytokinrezeptor bereitstellt, phosphoryliert und STATs aktiviert.

Wie in Abbildung 3.34 veranschaulicht, äußerte sich die Vorbehandlung der mDCs mit den Inhibitoren gegen PKC, Syk und JAK3 grundsätzlich in einem mehr oder weniger starken Rückgang der Zellviabilität bei steigenden Inhibitorkonzentrationen (Abbildung 3.34 A, C, E). Dadurch bedingt war eine generelle Reduktion der IFN-α-Sekretion nach Stimulation mit genomischer DNA sowie poly I:C zu verzeichnen (Abbildung 3.34 B, D, F). Der Vav-Inhibitor 6-Thio-GTP hatte in den getesteten Konditionen weder einen Effekt auf die Viabilität der mDCs noch auf deren IFN-α-Produktion (Daten nicht aufgeführt). Das Gleiche galt für den Inhibitor des Cdk2-Inhibitors („cyclin-dependent kinase 2 inhibitor“, p21), der für die Kontrolle des Zellzyklus zuständig ist (Daten nicht aufgeführt).

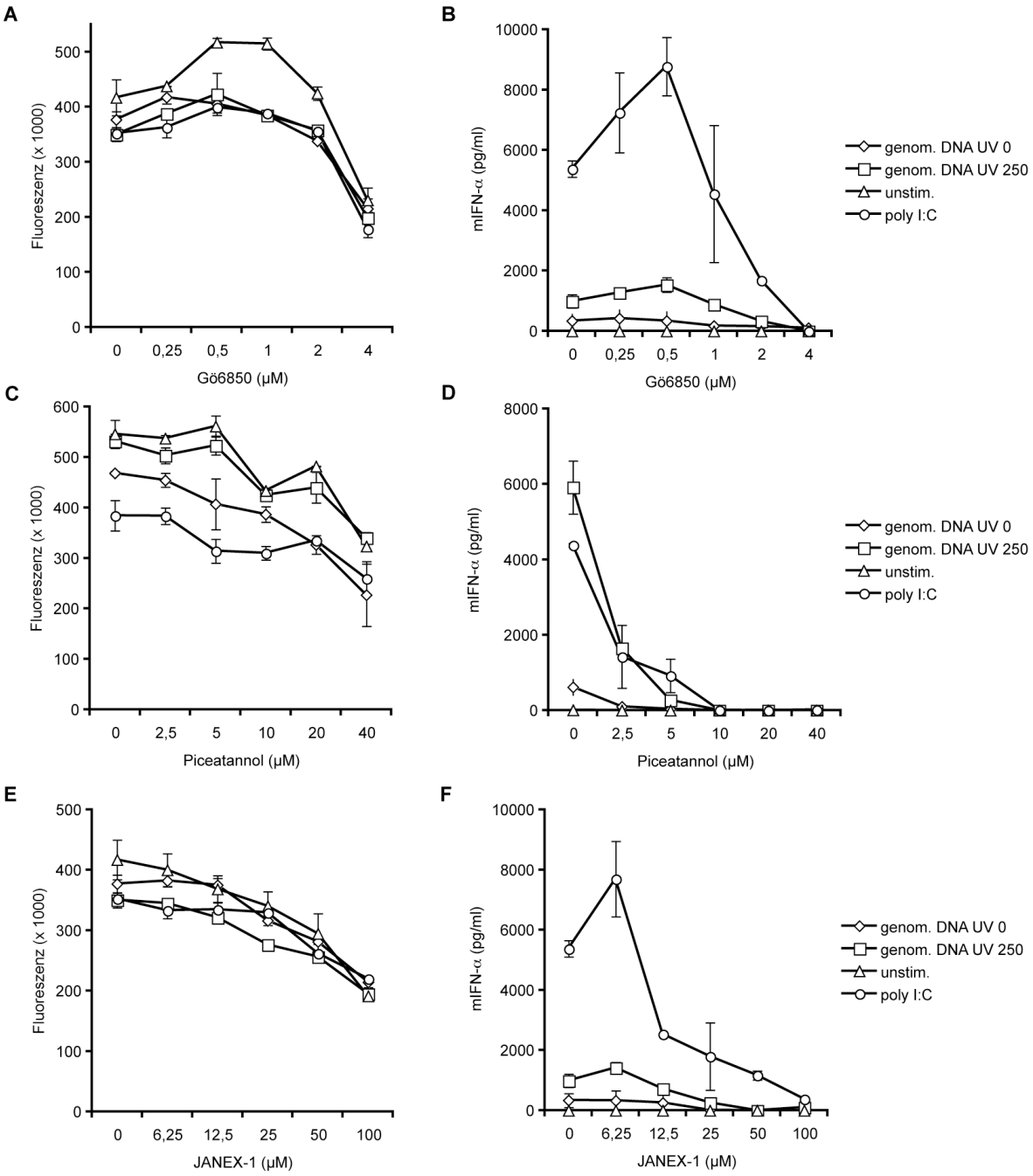


Abbildung 3.34: Die Behandlung von murinen mDCs mit PKC-, Syk- und JAK3-Inhibitoren führt generell zu Zellsterben und reduzierter IFN-α-Sekretion.

Murine Wildtyp-mDCs wurden mit dem PKC-Inhibitor Gö6850 (A, B), dem Syk-Inhibitor Piceatannol (C, D) sowie dem JAK3-Inhibitor Janex-1 (E, F) in den angegebenen Konzentrationen behandelt und nach 1 h mit je 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen bzw. als Kontrolle mit poly I:C stimuliert. 18-24 h nach der Stimulation wurde die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test (A, C, E) und die IFN-α-Sekretion in den Überständen mittels ELISA (B, D, F) bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten.

Neben den Stats, darunter Stat5, wirken auch NFAT („nuclear factor of activated T cells“) und NF-κB als Transkriptionsfaktoren. Die Inhibition von Stat5, NFAT bzw. NF-κB mittels STAT5-Inhibitor, Cyclosporin A bzw. BAY11-7082 führten in unterschiedlicher Intensität zu dosisabhängigem Zellsterben (Abbildung 3.35 A, C, E), was mit einer deutlichen Abnahme der IFN-α-Produktion durch die mDCs einherging (Abbildung 3.35 B, D, E). Eine spezifische Unterdrückung des UV-Effekts war auch hier nicht zu beobachten.

Des Weiteren wurden die Effekte von Inhibitoren des lysosomalen Degradationsmechanismus Autophagie untersucht. Autophagie ist essentiell für das Überleben, die Differenzierung, die Entwicklung und vor allem die Homoöstase von Zellen. Dabei bilden sich intrazelluläre doppelmembranäre Vesikel, so genannte Autophagosomen, die zytoplasmatisches Material einschließen. Dem folgt die Fusion mit einem Lysosom zur Bildung des Autolysosoms, in dem das eingeschlossene Material sowie die innere Membran degradiert werden. Neben TOR gilt die PI3K hVPS34 mit ihren Interaktionspartnern als Schlüsselregulator der Autophagie (Lum et al., 2005).

Der PI3K-Inhibitor Ly294002 induzierte mit steigender Konzentration Zellsterben (Abbildung 3.36 A). Mit dem Rückgang der Zellviabilität korrelierte die gleichmäßige Reduktion des IFN-α-Spiegels nach Stimulation mit genomischer DNA sowie poly I:C (Abbildung 3.36 B). Die ebenfalls Autophagie unterbindenden Substanzen 3-Methyladenin und Wortmannin hatten die gleichen Effekte (Daten nicht aufgeführt). Das hieß, dass auch Autophagie keine Rolle bei der Erkennung und Vermittlung UV-modifizierter Nukleinsäuren spielte.

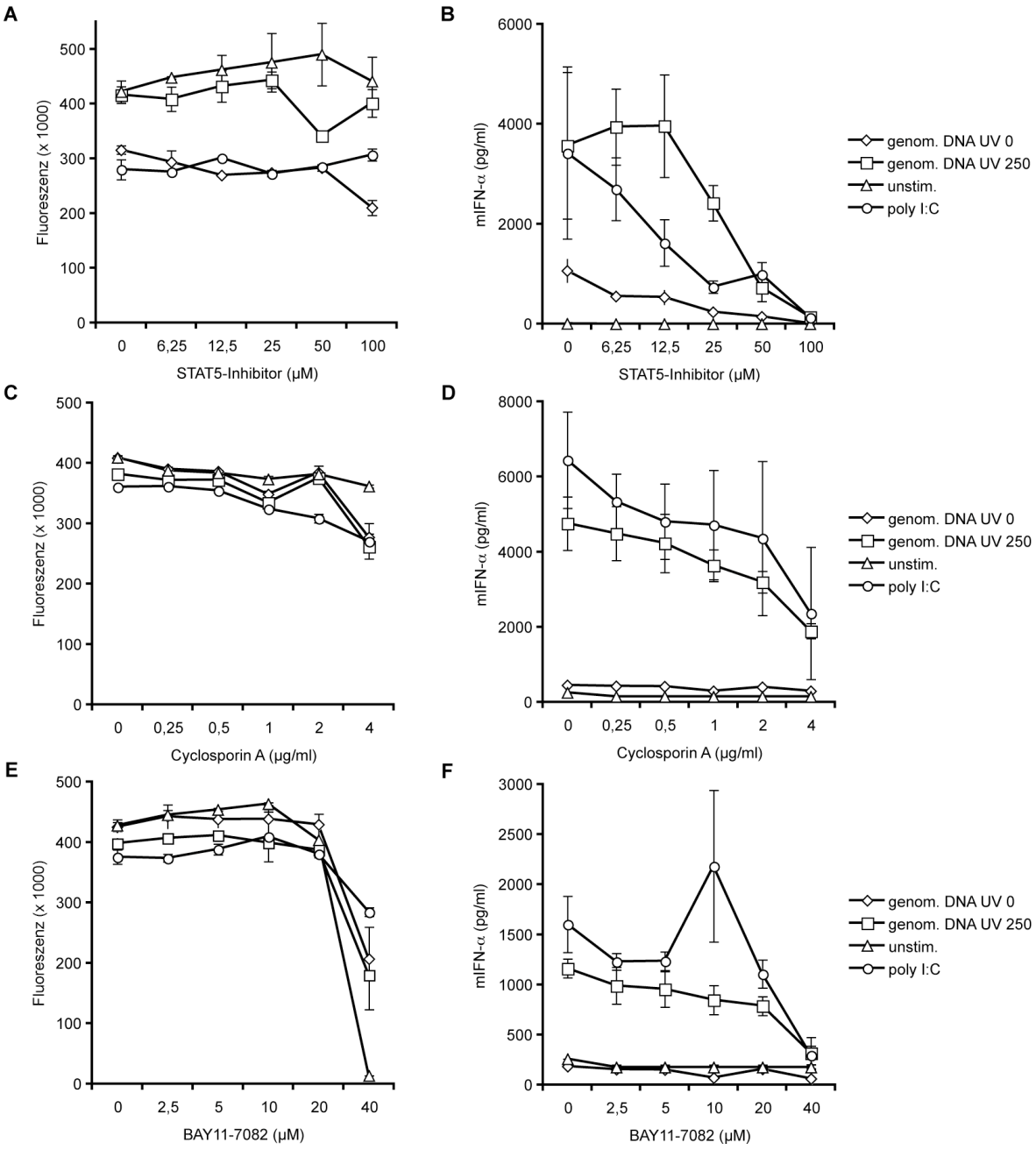


Abbildung 3.35: Die Inhibition der Transkriptionsfaktoren Stat5, NFAT und NF-κB in murinen mDCs bedingt eine allgemeine Reduktion der Zellviabilität sowie der IFN-α-Sekretion.

Murine Wildtyp-mDCs wurden für 1 h mit dem STAT5-Inhibitor (A, B), dem NFAT-Inhibitor Cyclosporin A (C, D) sowie dem NF-κB-Inhibitor BAY11-7082 (E, F) in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Dann wurden die mDCs mit je 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen bzw. als Kontrolle poly I:C stimuliert und für weitere 18-24 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde mit dem CellTiter-Blue-Test (A, C, E) und das IFN-α in den Überständen mit ELISA (B, D, F) detektiert. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten.

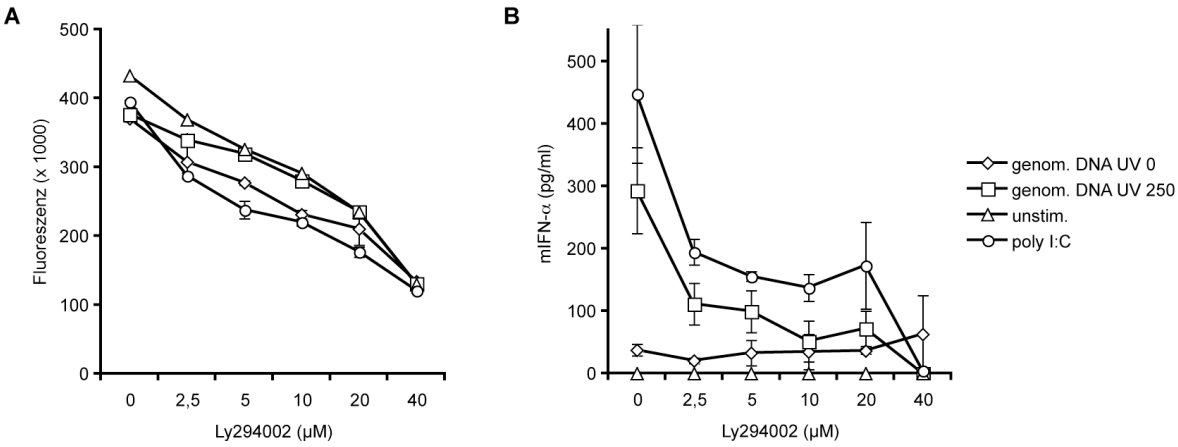


Abbildung 3.36: Die Inhibition der PI3K induziert eine mit dem Zellsterben korrelierende Abnahme der IFN-α-Sekretion in murinen mDCs.

Nach einer einstündigen Vorbehandlung mit dem PI3K-Inhibitor Ly294002 in den angegebenen Konzentrationen wurden murine Wildtyp-mDCs mit je 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten sowie UV-C-bestrahlten RMA Zellen bzw. als Kontrolle mit poly I:C stimuliert. 18-24 h später wurde die Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue-Test (A) und das IFN-α in den Überständen mit ELISA (B) gemessen. Der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Darüber hinaus umfasste das Screening Inhibitoren von Zielproteinen, die an der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, wie die Proteinkinase ATM, die durch Bindung an freie DNA-Enden infolge von DNA-DSBs sowie andere DNA-Reparaturproteine aktiviert wird (O'Connor et al., 2007). Über direkte Phosphorylierung oder indirekt über MAPKs kann sie unter anderem die Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 regulieren und Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose induzieren (Abraham, 2001; Kurz and Lees-Miller, 2004). Die mit ATM interagierende DNA-PK ist im Rahmen des NHEJ direkt an der Reparatur von DNA-DSBs beteiligt (Abraham, 2004; Smith and Jackson, 1999; Smith and Jackson, 2003), während PARP-1 in die Reparatur von SSBs involviert ist und die BER reguliert (O'Connor et al., 2007).

Es zeigte sich, dass die Behandlung der mDCs mit dem ATM-Inhibitor KU-55933 sowie mit dem DNA-PK-Inhibitor NU-7026 eine Reduktion der IFN-α-Sekretion sowohl nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen als auch nach poly I:C Stimulation bewirkte (Abbildung 3.37 B und D). Die Ursache hierfür lag in der sinkenden Anzahl metabolisch aktiver mDCs (Abbildung 3.37 A und C). Der PARP-1-Inhibitor hatte hingegen in den untersuchten Konzentrationen weder einen Einfluss auf die Zellviabilität noch auf die IFN-α-Induktion (Daten nicht aufgeführt).

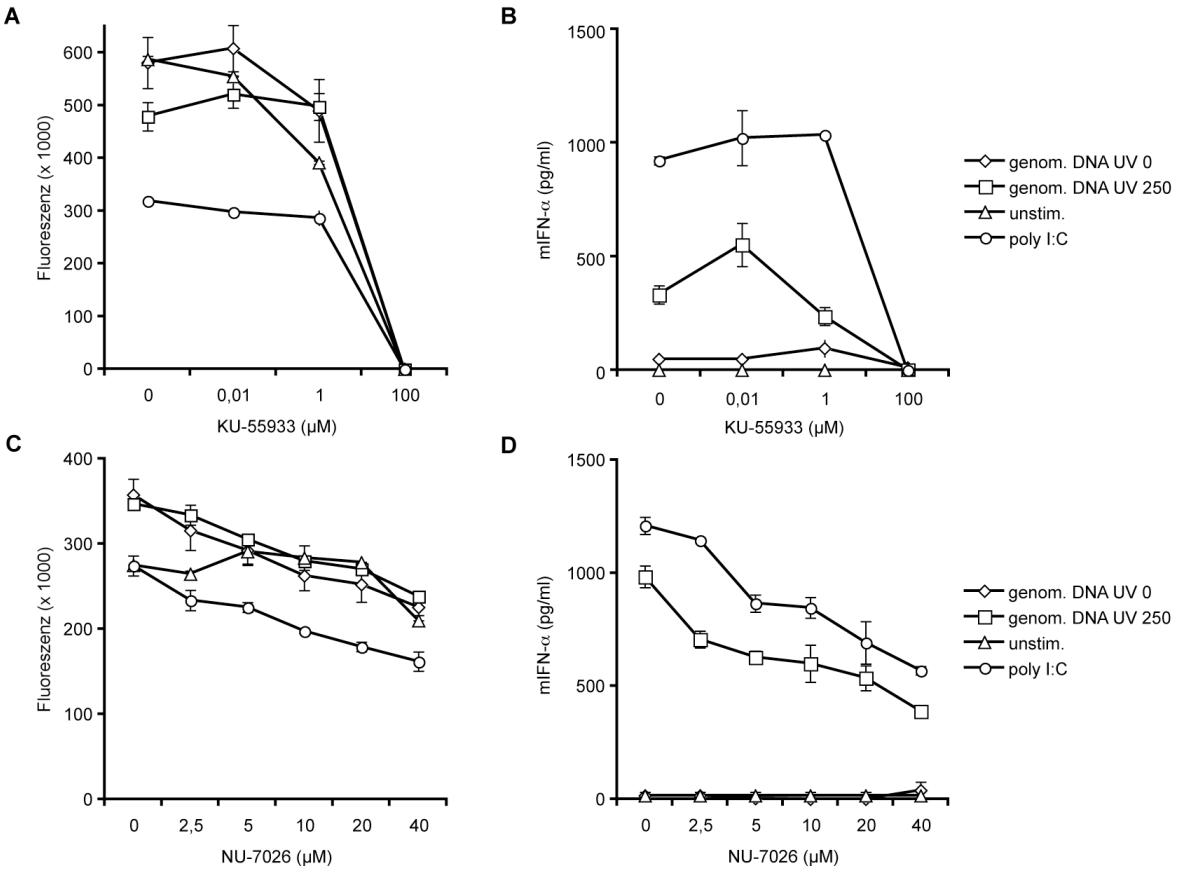


Abbildung 3.37: Die DNA-Reparaturenzyme ATM und DNA-PK sind in murinen mDCs nicht an der IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte Nukleinsäuren beteiligt.

Murine Wildtyp-mDCs wurden mit dem ATM-Inhibitor KU-55933 (A, B) sowie dem DNA-PK-Inhibitor NU-7026 (C, D) in den angegebenen Konzentrationen behandelt und nach 1 h mit je 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen bzw. als Kontrolle mit poly I:C stimuliert. Nach 18-24 h wurde ein CellTiter-Blue Test durchgeführt (A, C) und die IFN-α-Sekretion in den Überständen mit ELISA gemessen (B, D). Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten.

Des Weiteren wurden die Effekte der Inhibitoren der MAPKs ERK, p38 und JNK auf die amplifizierte IFN-α-Induktin durch UV-modifizierte genomische DNA untersucht. Die MAPKs werden normalerweise durch verschiedene Stresssignale wie Zytokine, Hitzeschock, Strahlung oder osmotischen Schock über die MAPK-Signalkaskade aktiviert und haben unter anderem Bedeutung für Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose.

UO126, der Inhibitor von ERK, induzierte dosisabhängig Zellsterben in den mDCs, was mit einer prinzipiell reduzierten IFN-α-Sekretion einherging (Abbildung 3.38 A und B).

Die Behandlung der mDCs mit dem p38-Inhibitor SB202190 löste hingegen keinen Zelltod aus (Abbildung 3.38 C). Interessanterweise war dennoch eine Reduktion der IFN-α-Sekretion nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen sowie nach Stimulation mit poly I:C zu beobachten (Abbildung 3.38 D), wobei auffiel, dass bereits sehr geringe Inhibitorkonzentrationen die IFN-α-Antwort auf UV-modifizierte genomische DNA deutlich abschwächten, während die IFN-α-Antwort auf poly I:C erst bei höheren Konzentrationen langsam abnahm.

Auch nach Behandlung der mDCs mit dem JNK-Inhibitor SP600125, der erst bei höheren Dosen zu einer Abnahme ihrer Viabilität führte (Abbildung 3.38 E), war schon bei geringen Dosen eine drastisch reduzierte IFN-α-Sekretion in den mDC-Überständen nach Stimulation mit UV-modifizierter genomischer DNA festzustellen (Abbildung 3.38 F). Die IFN-α-Antwort auf poly I:C wurde hingegen erst bei höheren Inhibitordosen beeinträchtigt, was wiederum auch auf das vermehrte Zellsterben zurückgeführt werden konnte.

Dies deutete auf eine essentielle Rolle von p38 und JNK bei der Immunerkennung bzw. Signaltransduktion von UV-modifizierter genomischer DNA im Zytosol muriner mDCs hin. Die beiden MAPKs konnten folglich als synergistisch wirkende Signalmoleküle in Frage kommen, welche die IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte Nukleinsäuren amplifizieren.

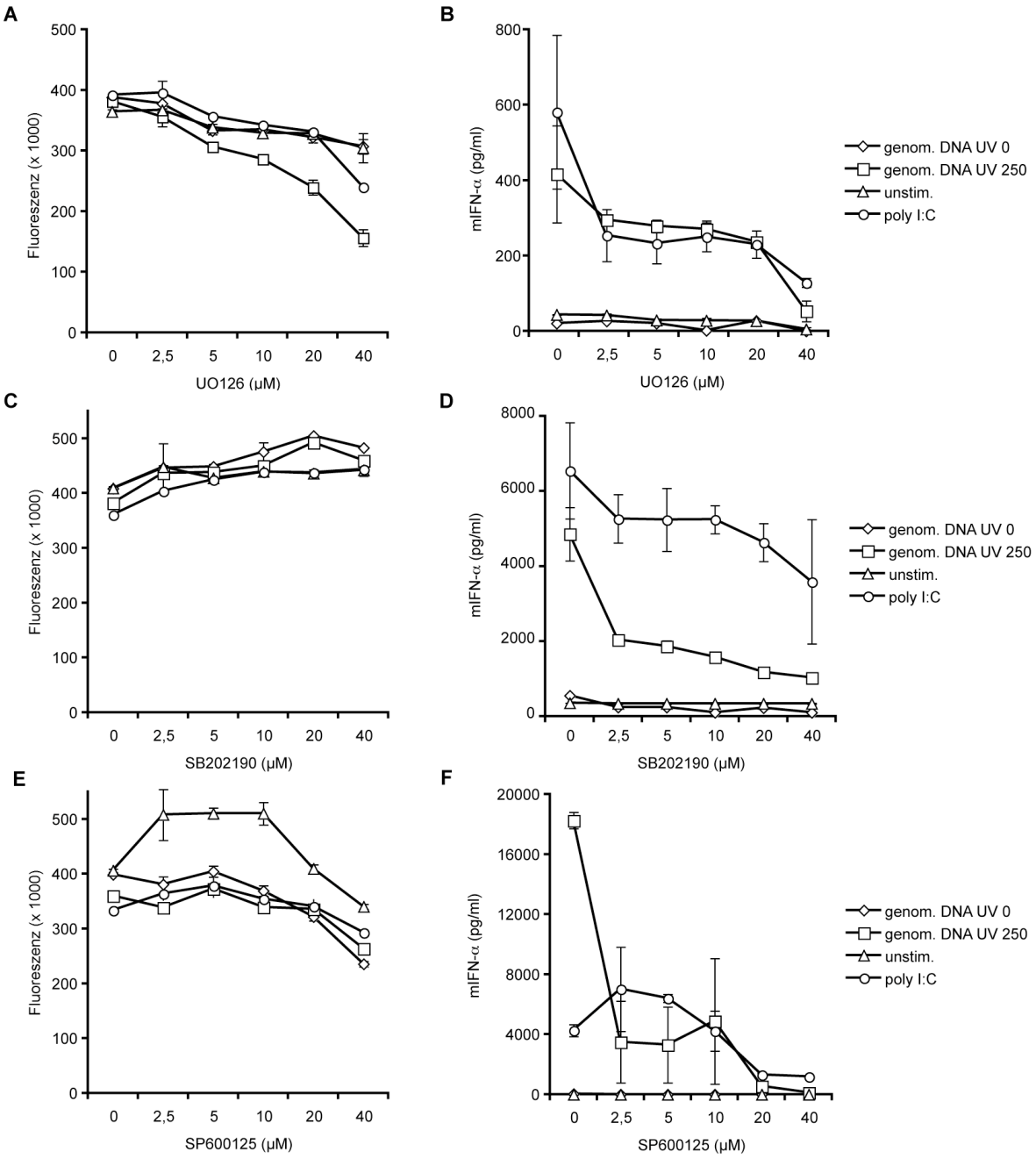


Abbildung 3.38: Die Inhibition der MAPKs p38 und JNK führt zu einer Reduktion der IFN-α-Antwort auf UV-modifizierte genomische DNA in murinen mDCs.

Murine Wildtyp-mDCs wurden mit dem ERK-Inhibitor UO126 (A, B), dem p38-Inhibitor SB202190 (C, D) sowie dem JNK-Inhibitor SP600125 (E, F) in den angegebenen Konzentrationen für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden je 200 ng genomische DNA aus unbestrahlten sowie UV-C-bestrahlten RMA Zellen bzw. als Kontrolle poly I:C in die mDCs transfiziert. 18-24 h danach wurde die Zellviabilität mit CellTiter-Blue (A, C, E) und das IFN-α mit ELISA (B, D, F) detektiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von drei unabhängigen Experimenten.

Experimente mit humanen Monozyten zeigten jedoch, dass zumindest im humanen System genomische DNA generell die MAPK p38 zur Induktion einer IFN-α-Antwort benötigt. Im Rahmen dieser Experimente wurden humane Monozyten aus Blut von gesunden Spendern aufgereinigt und, wie zuvor für die murinen mDCs beschrieben, für 1 h mit dem p38-Inhibitor SB202190 vorinkubiert. Anschließend wurden sie mit je 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten und UV-C-bestrahlten RMA Zellen stimuliert. Als Stimulationskontrollen dienten poly dAdT sowie 3-P-RNA, wobei der Transfektionsansatz durchweg aus 200 ng Nukleinsäure plus Dotap bestand. Mittels ELISA wurden die Überstände 18-24 h später auf IFN-α untersucht (Abbildung 3.39).

Schon in geringen Konzentrationen hemmte SB202190 die IFN-α-Induktion durch genomische DNA sowohl aus unbestrahlten als auch UV-bestrahlten RMA Zellen vollständig. Die IFN-α-Antworten auf poly dAdT sowie 3-P-RNA nahmen dagegen mit steigenden Inhibitorkonzentrationen deutlich langsamer ab. p38 und vermutlich auch JNK waren demnach auch in humanen Monozyten an der Signaltransduktion infolge der zytosolischen Erkennung UV-modifizierter genomischer DNA beteiligt, vermittelten aber anscheinend nicht explizit die UV-bedingte Signalamplifikation .

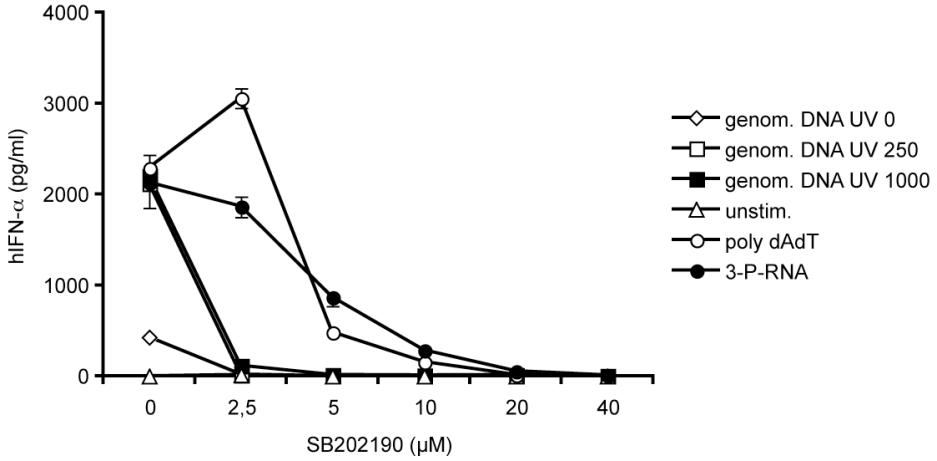


Abbildung 3.39: Die Inhibition der MAPK p38 unterdrückt die IFN-α-Induktion durch genomische DNA in humanen Monozyten vollständig.

Humane Monozyten wurden mit dem p38-Inhibitor SB202190 in den angegebenen Konzentrationen für 1 h vorbehandelt und anschließend mit je 200 ng genomischer DNA aus unbestrahlten sowie UV-C-bestrahlten RMA Zellen bzw. als Kontrolle mit poly dAdT und 3-P-RNA stimuliert. Nach 18-24 h wurde das IFN-α in den Überständen mit ELISA gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM (n=2) eines repräsentativen Ergebnisses von zwei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

4.1 UV-Strahlung induziert dosisabhängig Apoptose und verändert das Zytokinprofil

UV-Strahlen machen zwar nur wenige Prozent der auf der Erde auftreffenden Sonnenstrahlung aus, dennoch haben sie starke biologische Wirkungen vor allem auf die menschliche Haut. Durch Absorption der Strahlungsenergie können insbesondere intrazelluläre Biomoleküle wie Nukleinsäuren oder Proteine geschädigt werden (Maverakis et al., 2010). Um ein gestörtes zelluläres Gleichgewicht nach solch schädigenden Einflüssen wiederherzustellen, existieren viele verschiedene, evolutionär konservierte Mechanismen in der Zelle, wobei apoptotische Abläufe einen großen Stellenwert besitzen. Sie dienen der Homöostase der Haut und im Rahmen einer zellulären Stressantwort der Beseitigung irreparabler und unerkannter Schädigungen an der Erbsubstanz, die andernfalls zu Mutationen und damit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Kanzerogenese sowie von Erbgutveränderungen führen würden (de Gruijl, 1999). So sterben neben den überaus UV-empfindlichen Langerhans Zellen auch die Keratinozyten als so genannte „sunburn cells“ infolge von UV-Exposition der Haut durch Apoptose ab und werden dann phagozytiert (Clydesdale et al., 2001; Kerr et al., 1972; Nickoloff et al., 2002; Olson and Everett, 1975).

Da die Apoptose eine wichtige physiologische Bedeutung besitzt, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss von UV-Strahlung auf die Viabilität von RMA Zellen untersucht. Mit Hilfe zweier Nachweismethoden, dem CellTiter-Blue-Test sowie der Annexin-V-Fluos-Färbung, konnte die dosisabhängige Apoptoseinduktion in RMA Zellen 18 h nach der Exposition gegenüber UV-C-Strahlung belegt werden. Ab einer Strahlendosis von 250 mJ/cm^2 UV-C-Licht war eine signifikante Reduktion lebender Zellen festzustellen. Unter Verwendung der gleichen Strahlendosen konnten auch infolge von UV-B-Exposition ähnliche Apoptoseraten nachgewiesen werden. Die langwelligere und damit energieärmere UV-A-Strahlung hatte hingegen selbst bei hundertfach höheren Strahlendosen nur wenig Einfluss auf die Viabilität der RMA Zellen. Unter den gewählten Konditionen induzierte UV-A-Strahlung folglich deutlich weniger irreperable Schäden in den Zellen als UV-B- und UV-C-Strahlung, so dass der Apoptoseprozess nicht initiiert werden musste. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine längere Exposition der RMA Zellen gegenüber UV-A-Licht zu höheren Apoptoseraten geführt hätte.

In dieser Arbeit konnte außerdem die internukleosomale DNA-Fragmentierung durch Endonukleaseaktivität des DFF, die ein wichtiges charakteristisches Ereignis später Apoptosestadien ist, infolge von UV-C-Exposition in den RMA Zellen nachgewiesen werden. Die hierbei entstehenden DNA-Fragmente umfassen eine definierte Länge von etwa 200 bp und deren Vielfache und können nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel als Leiter sichtbar gemacht werden (Bortner et al., 1995; Wyllie et al., 1980). Anhand einer gelelektrophoretischen Analyse der genomischen DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen konnte gezeigt werden, dass mit einer Strahlendosis von 250 mJ/cm^2 UV-C-Licht und mehr nach 18 h die Ausbildung einer solchen DNA-Leiter induziert werden konnte.

In einer Vielzahl von Zellen konnte bereits belegt werden, dass UV-Strahlung dosisabhängig Apoptose induziert. Dies geschieht über komplexe Prozesse, in denen verschiedene molekulare Signalwege involviert sind: über die Induktion der pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie wie Bax, die Cytochrom c am Mitochondrium freisetzen und so die intrinsische Apoptosekaskade in der Zelle stimulieren (Cohen-Jonathan et al., 1999), über die Generierung von ROS, die mit Lipiden reagieren und so intrazelluläre Membranen inklusive der äußeren Mitochondrienmembran derart schädigen, das ebenfalls Cytochrom c freigesetzt wird (Batista et al., 2009; Kulms and Schwarz, 2002; Roos and Kaina, 2006), oder über eine direkte Aktivierung von Todesrezeptoren wie FAS und TNFR auf der Zelloberfläche, die den extrinsischen Apoptosesignalweg initiieren (Kulms et al., 2002).

Über welchen Signalweg in den UV-bestrahlten RMA Zellen Apoptose induziert wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Frühere Experimente zur Caspase-abhängigen Apoptose sowie zum Autophagie vermittelten Zelltod zeigten allerdings, dass das Sterben UV-C-bestrahlter RMA Zellen sich weder mit dem PI3K-Inhibitor 3-Methyladenin noch mit dem Pancaspase-Inhibitor Q-VD-OPh verhindern ließ. Die strahleninduzierten Schäden waren zu stark und ein Wirken alternativer Modi konnte nicht ausgeschlossen werden.

Die UV-induzierte Apoptose darf aber nicht nur als Schutzmechanismus betrachtet werden, sie stellt gleichzeitig auch eine Möglichkeit dar, nukleäre Antigene freizusetzen, die das Potenzial besitzen autoreaktive Immunantworten zu induzieren oder zu verschärfen (Lleo et al., 2008; Maverakis et al., 2010). Die Apoptose ist daher nicht notwendigerweise ein immunologisch „stiller“ Zelltod. Für Keratinozyten wurde beschrieben, dass sie während der ersten 24 h nach Apoptoseinduktion nur wenig nukleäres Material freisetzen, sondern zunächst selbst ihren Zellinhalt prozessieren, bevor sie von Phagozyten beseitigt werden (van Nieuwenhuijze et al., 2003). Fehler bei der zellulären Prozessierung von Autoantigenen (Napirei et al., 2000), eine vermehrte

Freisetzung nukleärer Antigene (van Nieuwenhuijze et al., 2003) sowie eine ineffiziente Beseitigung apoptotischer Zellen (Botto, 1998) bergen allerdings die Gefahr der Autoimmunität. Eine fehlregulierte Apoptose wird folglich einerseits zwar mit der Pathogenese von komplexen Erkrankungen wie Krebs (Condeelis and Pollard, 2006; Youle and Strasser, 2008), neurodegenerativen (Leuner et al., 2007) und kardiovaskulären Erkrankungen (Choudhury et al., 2005; Hahn et al., 2007) in Verbindung gebracht, andererseits aber auch mit Autoimmunerkrankungen assoziiert (Allina et al., 2006; Allina et al., 2008; Clancy et al., 2006; Lleo et al., 2008; Perniok et al., 1998; Ruiz-Arguelles et al., 2007; Salunga et al., 2007). Beim SLE konnte gezeigt werden, dass Autoantigene gebündelt auf der Oberfläche apoptotischer Zellen vorliegen können (Casciola-Rosen et al., 1994) und auch in apoptotischen Körperchen vorhanden sind (Schiller et al., 2008), während von Cocca und Kollegen die apoptotischen Körperchen selbst als B-Zell-Autoantigene beschrieben wurden (Cocca et al., 2004). Neueren Publikationen zufolge scheinen apoptotische Zellen auch bei der Antigenpräsentation, in der Aktivierung der angeborenen Immunität sowie der Regulierung der Zytokinsekretion von Makrophagen eine essentielle Rolle zu spielen (Lucas et al., 2003; Mandron et al., 2008). Wenn also die geregelte Beseitigung von UV-geschädigten Zellen nicht gelingt, birgt dies die Gefahr Autoimmunität auszulösen.

DNA-geschädigte Keratinozyten gehen infolge von UV-Strahlung nicht nur in Apoptose, sondern sekretieren gleichzeitig pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine. Diese unterstützen die Migration von Leukozyten, darunter auch T-Zellen in die Haut, die dort zur Beseitigung geschädigter Keratinozyten beitragen (Maverakis et al., 2010).

Neben der Induktion von Apoptose führte die UV-Bestrahlung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten RMA Zellen auch zu einem veränderten Zytokinprofil. Es konnte eine wenn auch geringe IL-6-Sekretion in den Überständen UV-C-bestrahlter RMA Zellen nach 18 h im ELISA gemessen werden. Diese nahm ebenfalls in Abhängigkeit von der Strahlungsdosis zu und erreichte ab einer Dosis von 250 mJ/cm^2 UV-C-Licht einen signifikanten Wert. Eine Ausschüttung von TNF-α oder IL-1 konnte in den RMA Zellen vermutlich zelltypbedingt nicht nachgewiesen werden. Solche Veränderungen des Zytokinprofils infolge von UV-Exposition konnten in vielen verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden (Bashir et al., 2009; Clydesdale et al., 2001; Duthie et al., 1999; Kondo et al., 1993; Kulms et al., 2000), wobei die Regulation dieser Zytokine maßgeblich für die UV-Antwort ist.

Die Sekretion von einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6, TNF-α und VEGF in der UV-exponierten Haut wird über die Aktivierung von NF-κB gesteuert (Bender et al., 1998; Maverakis et al., 2010). Wird NF-κB gehemmt, wird die Sekretion dieser Moleküle inhibiert (Abeyama et al., 2000). Laut derzeitigem Stand der Forschung scheint

es verschiedene Wege zur Aktivierung von NF-κB durch UV-Licht zu geben, die möglicherweise vom Zelltyp, Stimulus sowie Art und Dosis der UV-Strahlung abhängen (Bender et al., 1998; Lewis and Spandau, 2007; Li and Karin, 1998). Dass DNA-Schäden an der UV-induzierten NF-κB-Aktivierung direkt beteiligt sind, ist laut Devary und Kollegen unwahrscheinlich (Devary et al., 1993). Walker und Young konnten jedoch zeigen, dass die UV-induzierte TNF-α-Produktion mit dem Maß der DNA-Schäden korreliert (Walker and Young, 2007). So könnte auch die UV-induzierte IL-6-Produktion in den in dieser Arbeit verwendeten RMA Zellen mit einer Zunahme von DNA-Schäden bei steigender Strahlendosis in Wechselwirkung stehen, da bei einer Strahlendosis von 250 mJ/cm^2 UV-C-Licht neben einer signifikant verstärkten IL-6-Sekretion auch eine signifikante Apoptoserate verzeichnet werden konnte.

Dem TNF-α, das infolge von UV-Exposition von den Keratinozyten und Mastzellen in der Haut ausgeschüttet wird (Kock et al., 1990; Kupper et al., 1987; Oxholm et al., 1988; Walsh, 1995), kommt eine wesentliche Bedeutung in UV-induzierten Entzündungsreaktionen und Immunantworten zu (Clydesdale et al., 2001; Duthie et al., 1999). Es induziert eine erhöhte MHC Klasse I-Expression auf Endothelzellen und dermalen Fibroblasten (Collins et al., 1986), die Produktion von IL-1β (Dinarello et al., 1986), eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin (Groves et al., 1995), welche die Migration von Neutrophilen und zur Antigenpräsentation fähigen Makrophagen in die Haut unterstützen (Baadsgaard et al., 1987), sowie die Bildung von „sunburn cells“ (Schwarz et al., 1995). Laut Werth und Kollegen führt ein Polymorphismus des TNF-α-Promoters zu erhöhter UV-Photosensitivität z.B. in den Autoimmunerkrankungen SLE und SCLE (Werth et al., 2000). Auch UV-induziertes IL-1β kann über eine Fehlregulation von NLR-Proteinen mit Autoimmunerkrankungen assoziierbar sein (Jin et al., 2007). Dem IL-6, das in der Abfolge der Entzündungskaskade dem TNF-α untergeordnet ist und nachweislich von UV-bestrahlten RMA Zellen sekretiert wurde, kommt eine Schlüsselrolle gerade in dem Übergang von Mechanismen der angeborenen Immunität hin zu Mechanismen der erworbenen Immunität innerhalb von Entzündungsprozessen zu (Jones, 2005). Neben TNF-α, IL-1 und IL-8 ist IL-6 als entzündungsförderndes Zytokin ebenfalls in der Lage, Lymphozyten zu aktivieren und in die Haut zu rekrutieren (Maverakis et al., 2010). Neben den bislang genannten UV-induzierten Zytokinen wurde in verschiedenen Zelltypen der Epidermis und Dermis auch eine Aufregulation von IL-4, IL-12 und IL-15 infolge von UV-Exposition beobachtet (Bashir et al., 2009; Clydesdale et al., 2001; Duthie et al., 1999).

4.2 UV-bestrahlte, apoptotische Zellen haben eine immunsupprimierende Wirkung auf APCs

Die Entfernung apoptotischer Zellen erfolgt über professionelle Phagozyten wie Makrophagen und immature DCs (Albert et al., 1998) sowie eine Vielzahl anderer Zelltypen z.B. Endothelzellen (Dini et al., 1995), Mesenchymzellen (Wood et al., 2000) oder Kardiozyten (Allina et al., 2006). Dabei umfasst die Phagozytose apoptotischer Zellen vier Schritte: die Freisetzung von „find me"-Signalen, die Expression von „eat me"-Signalen und Erkennung der apoptotischen Zellen, die Reorganisation des Zytoskeletts und Internalisierung sowie die Degradation (Lleo et al., 2008). Der Aufnahme apoptotischer Zellen folgt in der Regel die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine (Fadok et al., 1998; Huynh et al., 2002; Voll et al., 1997). Anhand vielzähliger *in vitro*- und auch *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass nach Phagozytose apoptotischer Zellen die Sekretion von IL-1β, IL-8, GM-CSF und TNF-α in Makrophagen inhibiert ist, während die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF-β und IL-10 zunimmt (Byrne and Reen, 2002; Fadok et al., 1998; Huynh et al., 2002), wohingegen eine ineffiziente Beseitigung apoptotischer Zellen im Rahmen von autoimmunen Prozessen durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist (Gaipl et al., 2007). Auch bei chronischer oder schwach Erythem auslösender UV-Exposition dominieren normalerweise immunsupprimierende Effekte in der Haut (Maverakis et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung UV-bestrahlter Zellen auf APCs *in vitro* untersucht. Dies geschah mittels Kokulturen von RMA Zellen mit murinen Wildtyp-mDCs. Murine Wildtyp-mDCs sind als *in vitro* generierte, professionelle APCs in der Lage, apoptotische Zellen bzw. apoptotisches Material effizient zu phagozytieren (Albert et al., 1998; Lauber et al., 2004). Die Aufnahme von UV-C-bestrahlten Zellen durch mDCs konnte bereits in früheren *in vitro*-Experimenten mit Hilfe von PKH26-Färbungen nachgewiesen werden. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse des Zytokinmusters von Kokulturen UV-bestrahlter RMA Zellen mit mDCs zeigte sich, dass RMA Zellen, die mit UV-C-Licht in Dosen von 250 oder 1000 mJ/cm^2 bestrahlt worden waren, nicht immunogener waren als unbehandelte RMA Zellen. Stattdessen war im Vergleich zu diesen eine deutliche Reduktion der IL-6- und der IL-12p40-Sekretion in den Überständen nachweisbar. Zudem waren weder IL-12p70 noch IFN-α im ELISA messbar. UV-bestrahlte RMA Zellen besaßen demnach erwartungsgemäß eher eine immunsupprimierende Wirkung.

Janssen und Kollegen konnten allerdings zeigen, dass ein durch UV-Strahlung ausgelöster Zelltod auch ein starkes TLR-unabhängiges Signal aussenden kann, das zur

Induktion von Typ I-IFN sowie zum „Priming“ von T-Zellen führt, die spezifisch für das Antigen in den sterbenden Zellen sind (Janssen et al., 2006). Die Zellen, die solches durch Zelltod generiertes Material erkennen können, gehören laut Janssen und Kollegen zu einer Subpopulation der Flt3-L DCs. Sie sind immature lymphoide $B220^-PDCA^-CD8^-$ DCs, die infolge der Stimulation zu maturen lymphoiden $B220^-PDCA^-CD8^+$ DCs ausreifen. Unklar ist allerdings, wodurch und wie in diesen Zellen IFN-α/β induziert wird. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass apoptotisches Material UV-bestrahlter Zellen möglicherweise Nukleinsäuren und andere nicht weiter definierte Liganden enthalten könnte, die IFN-α/β induzieren können (Baccala et al., 2007). Die Kokultivierung von GM-CSF generierten mDCs mit UV-bestrahlten und daher zu einem Großteil apoptotischen RMA Zellen im Rahmen dieser Arbeit konnte dies jedoch nicht nachstellen.

Zum Vergleich wurde in dieser Arbeit außerdem das Zytokinprofil in Kokulturen nach Elektroporation der RMA Zellen mit immunstimulatorischen Nukleinsäuren untersucht. So induziert poly I:C, das als synthetisches Surrogat viraler dsRNA gilt, infolge seiner Erkennung über TLR3 (Alexopoulou et al., 2001) als auch über MDA-5 Typ I-IFN und andere pro-inflammatorische Zytokine. Die poly I:C initiierte Signalkaskade wirkt über das mitochondrial-verankerte IPS-1, welches mit FADD interagieren kann, so dass auch hier eine direkte Verbindung zu Mechanismen der Apoptoseinduktion besteht (Pichlmair and Reis e Sousa, 2007). Darüber hinaus kann die nachgeschaltete Aktivierung von IRF3 pro-apoptotische und anti-tumorale Effekte vermitteln (Goubau et al., 2009). Bereits im Vorfeld dieser Arbeit konnte eine poly I:C-vermittelte Apoptose in RMA Zellen und weiteren Zelllinien festgestellt werden. Diese war Caspase abhängig. Des Weiteren konnte anhand durchflusszytometrischer Analysen die effiziente Phagozytose dieser Zellen durch murine Wildtyp-mDCs nachgewiesen werden sowie eine damit einhergehende hoch regulierte Expression von MHC II und weiteren ko-stimulatorischen Molekülen wie CD69 und CD86 auf der Oberfläche der mDCs. Diese Aktivierung ermöglicht den DCs die Reifung zu kompletten APCs, damit diese eine Antigen-spezifische Effektorantwort initiieren können (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Reis e Sousa, 2004). Die Aufregulation ko-stimulatorischer Rezeptoren in Kokultur mit poly I:C behandelten RMA Zellen war sicher auf das IFN-α der RMA Zellen zurückzuführen, da IFN-α die Expression ko-stimulatorischer Moleküle induzieren kann (Blanco et al., 2001). Die IFN-α-Antwort der RMA Zellen nach Elektroporation mit poly I:C war kein spezielles Phänomen dieser Zelllinie sondern universell in allen murinen Zelllinien nach Stimulation mit zytosolischen Nukleinsäureliganden zu beobachten, wie weiterführende, jedoch in dieser Arbeit nicht aufgeführte Experimente zeigten. Es sei angemerkt, dass dies einen wesentlichen Unterschied zu humanen Zelllinien darstellte, die infolge von zytosolischer Stimulation

IFN-β aber kein IFN-α sekretierten. Wie in dieser Arbeit außerdem veranschaulicht werden konnte, besaßen poly I:C elektroporierte RMA Zellen im Gegensatz zu UV-bestrahlten RMA Zellen anscheinend eine immunaktivierende Wirkung auf die APCs. Sie lösten eine gesteigerte IL-6- und IL-12p40-Produktion in den mDCs aus, allerdings kein IL-12p70. IL-12p70 besteht aus den zwei Untereinheiten p35 und p40. Die Hauptquelle von IL-12 bilden aktivierte mononukleäre Phagozyten und DCs (Trinchieri, 2004). Die p40 Untereinheiten können Homodimere (IL-12p80) bilden, welche IL-12p70 durch Bindung an den IL-12-Rezeptor antagonisieren. So supprimiert IL-12p80 die IFN-γ-Produktion von IL-12 aktivierten T-Zellen und schränkt die adaptive Immunantwort ein. IL-12p40 ist teilweise homolog zur extrazellulären Domäne des IL-6-Rezeptors und könnte somit eventuell IL-6 extrazellulär abfangen und dessen Wirkung hemmen bzw. verringern. Eine adaptive Immunantwort würde dann ausbleiben. Frleta und Kollegen untersuchten ebenfalls den Einfluss poly I:C beladener apoptotischer Zellen auf die Kreuzpräsentation humaner DCs und konnten zeigen, dass poly I:C beladene Zellen nicht vom MHC I-Komplex präsentiert werden können (Frleta et al., 2009). Eine $CD8^+$ T-Zellantwort konnte nicht initiiert werden, wenn poly I:C in den apoptotischen Zellen vorlag. Der immunogene Charakter von Nukleinsäure stimulierten Zellen ist also nicht eindeutig geklärt, im Rahmen dieser Arbeit wurde dennoch deutlich, dass UV-bestrahlte Zellen gegenüber Nukleinsäure stimulierten Zellen eine konträre Wirkung auf das Zytokinmilieu ausüben.

4.3 UV-Strahlung induziert immunogene RNA-Spezies in apoptotischen Zellen

Bei der Untersuchung, inwiefern Nukleinsäuren stimulierter oder UV-bestrahlter Zellen einen immunogenen Charakter besaßen und eine Immunaktivierung bzw. -suppression vermittelten, zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass erstaunlicherweise RNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen in der Lage war, IFN-α in murinen Wildtyp-mDCs zu induzieren. Diese Beobachtung ließ sich auch mit RNA UV-bestrahlter L929 Zellen machen. Die Stimulation von Zellen mit poly I:C und anderen Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren erzeugte hingegen keine immunogenen RNA-Spezies. Zudem war dieser Effekt nur unter der Verwendung des Transfektionsreagenzes TransIT-LT1 zu beobachten. In der Literatur fanden sich keine Angaben zu einem ähnlichen UV-induzierten Phänomen. Ob diese RNA-Spezies mit anderen Nukleinsäuren oder größeren Proteinen vernetzt vorlagen und über welchen Rezeptor sie IFN-α induzierten, wurde hier

nicht näher untersucht. Bowie und Fitzgerald beschrieben, dass die Aufnahme von RNA-beinhaltendem apoptotischem Material durch DCs oder Makrophagen mit einer Aktivierung von RIG-I einhergeht, die zur IFN-α-Sekretion führt (Bowie and Fitzgerald, 2007). RNA-Transkripte im Nucleus und einige RNA-Spezies wie beispielsweise 7SL RNA im Zytosol eukaryotischer Zellen verfügen nämlich über Triphosphate an ihrem 5'-Ende, die spezifisch von RIG-I detektiert werden können (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Weitergehende molekularbiologische Experimente wären nötig, um die strukturellen Merkmale der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Nukleinsäure genau zu entschlüsseln und den immunstimulatorischen Effekt zu erklären. So könnte z.B. ein RNase H-Verdau DNA-RNA-Hybride, die durch UV-Strahlung entstehen, als Stimuli bestätigen bzw. ausschließen.

4.4 UV-Strahlung steigert das immunstimulatorische Potenzial genomischer DNA, was sich in einer verstärkten Immunantwort muriner und humaner myeloider Immunzellen widerspiegelt

Neben der Induktion immunogener RNA-Spezies durch UV-Strahlung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die genomische DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen das angeborene Immunsystem aktivieren konnte und die Produktion und Sekretion von IFN-α und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12p40 und IP-10 in murinen Wildtyp-mDCs induzierte. Obgleich die Transfektion von genomischer DNA generell zu einer Aktivierung der mDCs führte, so war die durch genomische DNA UV-exponierter RMA Zellen ausgelöste Zytokinantwort um ein Vielfaches stärker. Dies war anhand signifikant erhöhter IFN-α-, IL-6-, IL-12p40- und IP-10 Mengen in den Überständen der mDCs messbar. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass mit steigender Strahlendosis, die zuvor auf die RMA Zellen eingewirkt hatte, das immunstimulatorische Potenzial der genomischen DNA und folglich auch die Zytokinantwort der mDCs darauf zunahmen.

Bei der verstärkten Immunerkennung UV-geschädigter Nukleinsäuren handelte es sich nicht um einen zelltypspezifischen Effekt von mDCs, sondern dies konnte auch in 129 WT Makrophagen sowie in Zellen der murinen Keratinozytenzelllinie SP1 festgestellt werden. Dass es sich bei der isolierten und den UV-Effekt vermittelnden Nukleinsäure tatsächlich um DNA handelte, konnte durch enzymatische Behandlung mit DNase I bestätigt werden.

Im Gegensatz zu UV-bestrahlten RMA Zellen, die in Kokultur mit mDCs kein IFN-α sowie weniger IL-6 und IL-12p40 als unbehandelte RMA Zellen induzierten und sich immunsuppressiv verhielten, verstärkten UV-bestrahlte zelleigene Nukleinsäuren die Immunaktivierung. Dieses Phänomen war bisher noch nicht beschrieben worden. Möglicherweise sind für diese Diskrepanz die Beschaffenheit und/oder die Lokalisation des phagozytierten Materials UV-bestrahlter Zellen von Bedeutung. Endosomal lokalisiertes Material UV-bestrahlter Zellen war nicht immunstimulatorisch, wohingegen die Lokalisation von RNA und DNA im Zytosol von murinen Wildtyp-mDCs IFN-α induzierte, was gegen eine Beteiligung endosomaler Rezeptoren sprechen würde.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zum immunstimulatorischen Potenzial von Vertebraten-DNA. Während bakterielle und virale DNA, die reich an CpG-Motiven sind, oder kurze synthetische Oligonukleotide mit CpG-Motiven Zellen des angeborenen Immunsystems wie DCs über TLR9 aktivieren (Krieg, 2002; Wagner, 1999), ist Vertebraten-DNA laut Literatur unter normalen Umständen auch in hohen Konzentrationen unwirksam, obwohl sie ebenfalls nicht-methylierte CpG-Motive beinhaltet (Stacey et al., 1993; Wagner, 1999). Das Fehlen immunstimulatorischen Potenzials wurde mit CpG-Suppression (Bird, 1993), CpG-Methylierung (Ramsahoye et al., 1996) und/oder inhibitorischen Sequenzen (Krieg et al., 1998a; Shirota et al., 2004) erklärt. So ist im Vertebraten-Genom beispielsweise das Cytosin in CpG-Motiven zu 70-80 % methyliert (Bird, 2002), und es ist bekannt, dass Methylierung zu einer reduzierten immunstimulatorischen Wirkung von CpG-haltigen ODNs führt (Krieg, 1995; Krieg et al., 1995; Sparwasser et al., 1997) bzw. eine Behandlung bakterieller DNA mit CpG-Methylase diese immunstimulatorisch unwirksam macht (Krieg, 1995; Krieg et al., 1995; Stacey et al., 1996). Chen und Kollegen zeigten, dass eine Koinkubation bakterieller DNA mit gleicher Menge Vertebraten-DNA zu einer Aufhebung der Wirksamkeit bakterieller DNA führt, was auf die Anwesenheit inhibitorischer Sequenzen hinweist (Chen et al., 2001). Als verantwortlich für diese inhibitorischen Effekte erwiesen sich CpG-Dinukleotide, die im Basenkontext eines vorangehenden Cytosins und eines nachfolgenden Guanins standen, sowie Phosphorothioat-ODNs mit zwei bis drei Guanin-Substitutionen innerhalb des zentralen CpG-Sequenzmotivs (Lenert et al., 2001). Diese neutralisierenden Motive wirken als spezifische Antagonisten der stimulatorischen Effekte von wirksamen CpG-Motiven (Krieg et al., 1998a).

Auf der anderen Seite ist in der Literatur beschrieben, dass auch eine Inkubation mit Vertebraten-DNA unter bestimmten Bedingungen immunstimulatorisch wirksam sein kann, wie sich auch in der vorliegenden Arbeit beobachten ließ. Vor allem im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und dem Zusammenbruch angeborener Toleranz gegenüber Selbst-DNA scheint dies *in vivo* der Fall zu sein. Von Ishii und Kollegen wurde in diesem

Zusammenhang beschrieben, dass genomische DNA, die von sterbenden Zellen freigesetzt wird, die Reifung von APCs induzieren kann (Ishii et al., 2001). Ferner wurde publiziert, dass nach Internalisierung von Chromatin-IgG Immunkomplexen (ICs) über B-Zell-Rezeptoren oder FcγRIII-Rezeptoren von DCs, Vertebraten-DNA immunstimulatorisch aktiv wird, wobei im Fall von DCs sowohl TLR9-abhängige als auch TLR9-unabhängige Signalwege daran beteiligt zu sein scheinen (Boule et al., 2004). Darüber hinaus konnten Vallin und Kollegen zeigen, dass Seren von SLE-Patienten, die ICs aus autologer DNA und anti-DNA-AKs beinhalten, effizient PDCs aktivieren, Typ I-IFN zu produzieren (Vallin et al., 1999). Die Frage, ob die Wirksamkeit von Vertebraten-DNA auf die wenig enthaltenen CpG-Motive oder auf non-CpG-Sequenzen zurückzuführen ist, die unter diesen Bedingungen wirksam werden, wurde von Yasuda und Kollegen durch die Beobachtung beantwortet, dass eine verstärkte endosomale Translokation von non-CpG-ODNs durch Komplexierung an Dotap zu immunstimulatorischen Effekten in murinen und humanen PDCs führte (Yasuda et al., 2006; Yasuda et al., 2005b). Die Aktivierung von Flt3-L DCs äußerte sich in einer Aufregulation von CD40 und CD69 auf ihrer Zelloberfläche sowie in der Produktion von IFN-α und IL-6. Außerdem konnte in Ligand-Bindungsstudien bei hohen Konzentrationen von non-CpG-ODNs, das heißt bei einem 2-3,5-fachen Überschuss, die Bindung an den für CpG-vermittelte Immunstimulation verantwortlichen Rezeptor TLR9 nachgewiesen werden (Yasuda et al., 2006). Laut Yasuda und Kollegen ist Vertebraten-DNA nach Translokation ins Endosom jedoch auch in der Lage zusätzlich TLR9-unabhängig murine DCs sowie Makrophagen zu aktivieren (Yasuda et al., 2005a; Yasuda et al., 2005b). Studien von Viglianti und Kollegen, die anti-Hapten/haptenierte DNA-Immunkomplexe verglichen, demonstrierten jedoch, dass DNA-Fragmente von *E. coli* dennoch effizientere TLR-Liganden darstellten als DNA-Fragmente von Säugetier-DNA (Viglianti et al., 2003). Bestimmte Formen von Vertebraten-DNA oder -RNA scheinen also möglicherweise bessere TLR-Liganden zu sein als andere (Busconi et al., 2006). Im Gegensatz zu Yasuda und Kollegen, die die Immunantwort von Flt3-L-Kulturen, also Mischpopulationen aus murinen mDCs sowie PDCs, infolge der Transfektion von Vertebraten-DNA komplexiert an Dotap analysierten, untersuchten Martin und Elkon die Effekte intrazellulärer Vertebraten-DNA auf immature mDCs, die unter Zugabe von GM-CSF generiert wurden. Sie konnten zeigen, dass intrazelluläre Vertebraten-DNA nach Transfektion mit FuGene6 mDCs aktiviert, was sich in einer Aufregulation von CD40 und CD86 auf ihrer Oberfläche sowie einer TLR9- und MyD88-unabhängigen Produktion signifikanter Mengen Typ I-IFN äußerte (Martin and Elkon, 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der immunaktivierenden Wirkung von genomischer DNA auf murinen mDCs decken sich mit den Beobachtungen von Martin und Elkon. Mit den Befunden von Martin und Elkon deckt sich der Nachweis der

IFN-α-Induktion nach Stimulation mit genomischer DNA, obgleich die DNA, die aus unbehandelten RMA Zellen aufgereinigt worden war, hier relativ wenig IFN-α in den mDCs induzierte. Eine Sekretion von IL-6 und IL-12 hatten Martin und Elkon ebenso wie Ishii, Zhu und Kollegen jedoch nicht messen können (Ishii et al., 2001; Martin and Elkon, 2006; Zhu et al., 2003), eine Induktion von IP-10, die ebenfalls in dieser Arbeit detektiert werden konnte, hatten sie nicht untersucht. Die Unterschiede in der IFN-α-, IL-6- und IL-12-Induktion durch unbehandelte, genomische DNA könnten auf die unterschiedlichen Transfektionsreagenzien, die Beschaffenheit der genomischen DNA oder die stimulierten Zellen zurückzuführen sein.

Martin und Elkon hatten betont, dass zur IFN-α-Induktion durch dsDNA unbedingt ein nicht-physiologisches Transfektionsreagenz wie FuGene6 benötigt wird, um die intrazelluläre Aufnahme zu verstärken und Degradationsprozesse zu reduzieren (Diebold et al., 2004; Martin and Elkon, 2006). Die IFN-α-Antwort von mDCs auf transfizierte DNA auf einem anderen Weg z.B. über apoptotische Körperchen, nekrotische Zelltrümmer oder anti-Nukleosom-Immunkomplexe zu induzieren, gelang ihnen nicht. Auch von Decker und Kollegen wurde beschrieben, dass Nukleosomen zwar eine MyD88-unabhängige DC-Maturation sowie die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen induzieren können, aber kein Typ I-IFN (Decker et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls deutlich, dass genomische DNA aus unbehandelten RMA Zellen ohne Komplexierung an TransIT-LT1 nicht in der Lage war, in den mDCs IFN-α zu induzieren. Erstaunlicherweise löste jedoch die bloße Zugabe von unkomplexierter genomischer DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen in den Überstand eine dosisabhängige IFN-α-Produktion in den mDCs aus. Dazu waren allerdings DNA-Konzentrationen über 1 µg nötig und die dadurch induzierte IFN-α-Antwort fiel deutlich schwächer aus als nach Transfektion mit TransIT-LT1. Dieser Befund könnte auf mehrere Weisen erklärt werden: eine bessere intrazelluläre Aufnahme von genomischer DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen gegenüber genomischer DNA aus unbehandelten Zellen, verminderte Degradationsprozesse aufgrund der durch UV-Strahlung veränderten DNA-Beschaffenheit oder eine verbesserte Immunerkennung. Über welchen Mechanismus unkomplexierte genomische DNA aus UV-bestrahlten Zellen diese geringe Mengen IFN-α induzierte, wurde nicht weiter untersucht, geht man jedoch davon aus, dass dies ebenso wie im Falle einer Transfektion auf einer verstärkten zytosolischen Immunerkennung basiert, könnte man spekulieren, dass ausreichende Mengen UV-modifizierter genomischer DNA *in vivo* ausreichen würden, um myeloide Immunzellen über zytosolische Rezeptoren zu aktivieren.

Dass Vertebraten-DNA auch in humanen Zellen nach verstärkter endosomaler

Translokation immunstimulatorisch aktiv wird und in der Lage ist, Typ I-IFN zu induzieren, hatten Yasuda und Kollegen für humane PDCs veranschaulicht (Yasuda et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei gleicher methodischer Vorgehensweise genomische DNA komplexiert an Dotap auch in humanen Monozyten IFN-α induzierte. Darüber hinaus war in den humanen Monozyten ebenso wie in den untersuchten murinen Primärzellen bzw. Zelllinien das UV-Phänomen zu beobachten. Genomische DNA aus UV-bestrahlten Zellen besaß ein größeres immunstimulatorisches Potenzial als genomische DNA aus unbestrahlten Zellen, was sich in einer verstärkten IFN-α-Antwort stimulierter Monozyten widerspiegelte. Dabei war es unerheblich, ob die genomische DNA aus murinen RMA Zellen oder humanen A549 Zellen aufgereinigt worden war. Ishii und Kollegen, die die Expression von Ifnb, Cxcl10 (IP-10) und Ccl2 (JE oder MCP-1) nach Stimulation mit genomischer DNA auf mRNA-Niveau untersuchten, beobachteten ebenfalls, dass die genomische DNA aus verschiedenen Spezies eine ähnliche stimulatorische Fähigkeit auf murine embryonale Fibroblasten besaß (Ishii et al., 2006).

Weil humane Monozyten TLR9 nicht exprimieren, sprach dies trotz Verwendung von Dotap ebenfalls eindeutig gegen eine Beteiligung des TLR9 bei der Erkennung un- bzw. UV-modifizierter genomischer DNA in myeloiden Zellen, sondern für einen zytosolischen Erkennungsmechanismus. Die aus Zellen isolierte genomische DNA beinhaltete also nicht nur wie in der Literatur beschrieben Sequenzen, die als „schwache“ Liganden für TLR9 fungieren (Yasuda et al., 2005b), sondern auch Erkennungsmotive für einen oder mehrere zytosolische DNA-Rezeptoren. Weil DNA unter normalen Umständen nicht im Zytosol von Zellen vorkommt, müssen diese Motive sicherlich nicht sehr spezifisch sein, sondern alleine die Anwesenheit von DNA im Zytosol könnte der Zelle bereits ein Signal geben. Den Beobachtungen dieser Arbeit zufolge könnten sich die Erkennungsmotive in der genomischen DNA unbestrahlter RMA Zellen jedoch von denen in der genomischen DNA UV-bestrahlter RMA Zellen unterscheiden.

4.5 UV-modifizierte genomische DNA wird zytosolisch erkannt

Anhand verschiedener Experimente konnte eine TLR9-unabhängige, zytosolische Immunerkennung UV-modifizierter genomischer DNA belegt werden. So sezernierten murine TLR9-defiziente mDCs nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen die gleichen IFN-α-Mengen wie Wildtyp-mDCs. Experimente mit Chloroquin, das die Ansäuerung von Endosomen und dadurch die Erkennung von Nukleinsäuren über endosomale Rezeptoren verhindert (Lee et al., 2003), untermauerten diesen Befund, da genomische DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen in murinen Wildtyp-mDCs IFN-α induzierte, unabhängig davon ob diese mit Chloroquin vorinkubiert worden waren oder nicht. Martin und Elkon hatten die TLR-unabhängige Erkennung von Vertebraten-DNA im Allgemeinen beobachtet (Martin and Elkon, 2006). Es muss angemerkt werden, dass die Vorbehandlung der mDCs mit Chloroquin deren IFN-α-Antwort auf immunstimulatorische Nukleinsäuren generell abschwächte. Vermutlich hing dies mit Einflüssen des Chloroquins auf die Viabilität der mDCs oder die Transfektionseffizienz zusammen.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte, allerdings hier nicht gezeigte Experimente mit murinen MDA-5- bzw. RIG-I-defizienten mDCs bestätigten, dass auch eine Beteiligung der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren MDA-5 und RIG-I bei der Signaltransduktion definitiv ausgeschlossen werden konnte, sondern dass genomische DNA UV-bestrahlter RMA Zellen über einen zytosolischen DNA-Sensor detektiert werden musste.

Laut derzeitig publiziertem Kenntnisstand gibt es neben den vielen verschiedenen DNA-Liganden, die eine Zelle zur Sekretion von IFN-α veranlassen, vermutlich jedoch nicht nur einen einzigen Rezeptor, der für die Erkennung von zytosolischer DNA und das dadurch induzierte IFN-α zuständig ist. Es wäre durchaus vorstellbar, dass mehrere zytosolische Rezeptoren existieren, die unterschiedliche DNA-Muster erkennen und auch in verschiedenen Zelltypen exprimiert sein könnten. So wurde 2007 zwar ein DNA-Rezeptor namens DAI (ZBP1) identifiziert, der für die IFN-α-Produktion zuständig zu sein schien (Takaoka et al., 2007). Es zeigte sich jedoch, dass DAI-defiziente Mäuse nicht den erwünschten Phänotyp besaßen und dass die Detektion von poly dAdT nicht von DAI abhängig war (Ishii et al., 2008). Inzwischen wurde publiziert, dass AT-reiche DNA (poly dAdT) im Zytosol bestimmter Zelltypen z.B. HEK Zellen nach Bindung an RNA-Polymerase III in 3-P-RNA konvertiert wird und über den RIG-I-Signalweg IFN-α induziert (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009). Ebenfalls 2009 identifizierten Ishikawa und Kollegen das Protein STING bzw. MITA als Regulator der IFN-α-Induktion, die durch

intrazelluläre DNA-Spezies ohne CpG-Motive z.B. B-Form DNA ausgelöst wird (Ishikawa et al., 2009). Ishii und Kollegen, die ebenfalls zeigen konnten, dass B-Form DNA, aber nicht Z-Form DNA, murine und humane Stromazellen sowie DCs zur Produktion von Typ I-IFN und anderer Chemokine veranlasst, fanden heraus, dass B-Form DNA IRF3 sowie den Ifnb Promoter via TBK1 und IKKi aktiviert, wohingegen NF-κB unabhängig davon aktiviert wird. In beide Signalwege war das Adaptermolekül IPS-1 involviert, aber nicht TLR9 oder die Helikase RIG-I (Ishii et al., 2006).

Bei der aus RMA Zellen aufgereinigten genomischen DNA handelte es sich um B-Form DNA (Watson and Crick, 1953), was die Vermutung nahe legte, dass MITA auch eine Rolle in der durch UV-modifizierte genomische DNA initiierten Signalkaskade spielen könnte. Im Rahmen von „shRNA-knockdown"-Experimenten wurden daher drei verschiedene lentivirale shRNA-Konstrukte hergestellt und in 129 WT Makrophagen transduziert, um die Proteinexpression von MITA zu unterbinden. In allen drei transduzierten Zelllinien war der „knockdown" von MITA erfolgreich, was anhand von Kontrollstimulationen mit poly dAdT und 3-P-RNA deutlich wurde. Transfiziertes poly dAdT, das in 129 WT Makrophagen auch über einen noch nicht identifizierten zytosolischen DNA-Sensor detektiert wird, induzierte in diesen drei Zelllinien kaum IFN-α wohl aber in den mit Kontrollvektoren transduzierten Zelllinien. Die IFN-α-Antwort auf den RIG-I-Liganden wurde hingegen durch den „knockdown" von MITA nicht beeinflusst. Mit Hilfe der drei transduzierten Zelllinien konnte eindeutig belegt werden, dass die genomische DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen über zytosolische Erkennungsmechanismen unter Beteiligung von MITA IFN-α induzierte. Ein spezifischer DNA-Rezeptor konnte bisher allerdings nicht identifiziert werden.

Zusätzlich zur zytosolischen Erkennung von DNA, die IFN-α in Zellen induziert, wurde zeitgleich von vier unabhängigen Gruppen AIM2 als Rezeptor identifiziert, der nach zytosolischer DNA-Erkennung das Inflammasom aktiviert (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009). AIM2 bindet demnach dsDNA, bildet zusammen mit ASC ein Caspase 1-aktivierendes Inflammasom und induziert so die Spaltung und Sekretion von IL-1β (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2010; Hornung et al., 2009; Rathinam et al., 2010; Roberts et al., 2009). Allerdings wird die Typ I-IFN Produktion dadurch nicht beeinträchtigt. Folglich hatte weder die Defizienz von ASC noch die von NLRP3 in mDCs einen Einfluss auf die IFN-α-Antwort, die durch genomische DNA aus unbehandelten bzw. UV-bestrahlten RMA Zellen induziert wurde. Die verstärkte Erkennung UV-bestrahlter DNA war sowohl in ASC- als auch in NLRP3-defizienten mDCs gleichermaßen zu erkennen wie in Wildtyp-mDCs. Jedoch konnte gezeigt werden, dass

auch die genomische DNA aus RMA Zellen nach Transfektion in murine Wildtyp-mDCs sowie 129 WT Makrophagen IL-1β induzierte, wobei die genomische DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen eine stärkere IL-1β-Sekretion auslöste als die genomische DNA aus unbestrahlten RMA Zellen.

2010 wurde IFI16 (Trapani et al., 1992) bzw. sein murines Ortholog p204 von Unterholzner und Kollegen als weiterer intrazellulärer DNA-Sensor beschrieben (Unterholzner et al., 2010). IFI16 gehört zusammen mit MNDA („myeloid nuclear differentiation antigen“) (Burrus et al., 1992; Duhl et al., 1989), IFIX („interferon-inducible protein X“) und AIM2 (DeYoung et al., 1997) zu einer Gruppe IFN-induzierbarer Gene, deren Genprodukte der HIN-200 („hematopoetic interferon-inducible protein with 200 amino acid repeat“)-Genfamilie im Menschen bzw. IFI-200-Genfamilie in der Maus angehören (Kimkong et al., 2010; Landolfo et al., 1998; Ludlow et al., 2005), wobei IFI-200 die Mausorthologen p202 (Choubey et al., 1989), p203 (Gribaudo et al., 1997), p204 (Choubey et al., 1989) und D3 (Tannenbaum et al., 1993) umfasst. Diese HIN-200 Proteine haben allgemeine strukturelle und biochemische Eigenschaften, darunter eine 200 Aminosäure umfassende repetitive Sequenz mit allerdings noch unbekannter Funktion, die im Fall von IFI16 jedoch ein Motiv zur direkten Bindung an p53 enthält, sowie die Fähigkeit dsDNA zu binden (Choubey and Lengyel, 1995; Dawson and Trapani, 1996; Johnstone and Trapani, 1999; Landolfo et al., 1998). Laut Unterholzner und Kollegen bindet IFI16 direkt an IFN-β-induzierende virale DNA-Motive, infolgedessen wird MITA rekrutiert und über die Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF-κB wird die Produktion von IFN-β veranlasst (Unterholzner et al., 2010). Unterholzner und Kollegen konnten allerdings nicht zeigen, welche Eigenschaften virale dsDNA zur Interaktion mit IFI16 besitzen muss und wie IFI16 stimuliert wird, um MITA zu rekrutieren.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit Hilfe von verschiedenen shRNA-Konstrukten die Expression von p204 in murinen 129 WT Makrophagen inhibiert, um herauszufinden, inwieweit p204 möglicherweise an der Erkennung UV-modifizierter genomischer DNA beteiligt war. Allerdings war die IFN-α-Antwort in den transduzierten Zelllinien durch den „knockdown“ von p204 nicht beeinträchtigt. Ein unvollständiger „knockdown“ konnte bis dato nicht ausgeschlossen werden, da auch die von Unterholzner und Kollegen in ihrer Publikation verwendete HSV-Sequenz in den „p204-knockdown“-Zelllinien gleichermaßen IFN-α induzierte wie in den mit Kontrollvektoren transduzierten Zelllinien. Mit Hilfe einer Real-Time-quantitativen-PCR könnte nun geklärt werden, ob die für p204 kodierende mRNA durch die shRNA-Konstrukte überhaupt degradiert wurde. Auch eine Überprüfung der shRNA im Western Blot wäre möglich. Diese Experimente sind aufgrund ihrer bislang unvollständigen Validierung in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

Eine Beteiligung von p204 bzw. IFI16 an der verstärkten Immunerkennung UV-modifizierter genomischer DNA wäre grundsätzlich vorstellbar, zumal einige Hinweise darauf hindeuten, dass HIN-200-Proteine mit abnormalen Entzündungsreaktionen und einem Verlust von Selbsttoleranz gegenüber dsDNA, wie er bei SLE-Patienten beobachtet wird, assoziierbar sein könnten, z.B. eine Genkartierung von einem Lupus-Mausmodell (Choubey and Panchanathan, 2008; Rozzo et al., 2001), die Aufregulation aller vier Gene in Patienten mit SLE (Kimkong et al., 2009), die Rolle von IFI16 als Autoantigen in SLE-Patienten (Mondini et al., 2007; Seelig et al., 1994), die Fähigkeit von IFI16 im Rahmen der DNA-Reparatur ssDNA zu binden (Yan et al., 2008) sowie die Entdeckung von AIM2 als intrazellulärer DNA-Sensor, der Entzündung und Apoptose induziert (Fernandes-Alnemri et al., 2009). SLE-Patienten weisen sowohl IFI16-spezifische AKs als auch eine erhöhte IFI16-Expression auf (Choubey and Panchanathan, 2008; Kimkong et al., 2009; Mondini et al., 2007), wobei sich die Expression von IFI16 interessanterweise nicht nur auf Zellen des Immunsystems beschränkt sondern auch Endothelzellen und geschichtete Plattenepithelien wie die Haut miteinschließt (Mondini et al., 2007). Zudem ist über IFI16 und die murinen Ifi202b und Ifi204 bekannt, dass sie vermutlich über Modulation der transkriptionellen Aktivierung von p53 den weiteren Verlauf des Zellzyklus unterbinden können und dass sie sowohl an der Modulation der Zelldifferenzierung als auch am Zellüberleben beteiligt sind (Johnstone et al., 2000). Molekulare Studien an IFI16-überexprimierenden primären Endothelzellen demonstrierten zudem, dass IFI16 möglicherweise im Rahmen früher Entzündungsreaktionen bei der Modulation der Endothelzellfunktion eine Rolle spielen könnte, z.B. bei der Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und E-Selectin, der Produktion der Chemokine IL-8 und MCP-1 („monocyte chemotactic protein 1“), dem Zellwachstum und der Apoptose (Mondini et al., 2007). Darüber hinaus publizierten Mondini und Kollegen, dass die Expression der HIN-200-Gene bzw. von IFI16 durch pro-inflammatorische Zytokine wie IFN-α, -β und -γ, IL-1β und TNF-α induziert werden kann, aber auch durch andere Agenzien (Mondini et al., 2007). So konnte IFI16 in HL-60 Zellen beispielsweise durch Dimethylsulfooxid, Retinsäure sowie 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 induziert werden (Dawson and Trapani, 1995), in HUVECs („human umbilical vein endothelial cells“) durch oxidativen Stress (Gugliesi et al., 2005). Mondini und Kollegen zeigten, dass H_2O_2 eine schnelle Akkumulation von IFI16 bewirkte, IFI16 also möglicherweise in die Antwort von Endothelzellen auf oxidativen Stress involviert ist. Die Regulation der IFI16-Akkumulation durch H_2O_2 schien das Ergebnis der Redoxaktivität von IFI16 zu sein, da auch andere Agenzien, die intrazellular ROS generieren, eine Zunahme von IFI16 induzierten (Mondini et al., 2007). Demnach gilt dies vermutlich auch für UV-Exposition. Diese Befunde zusammen mit der Beobachtung, dass IFI16 die Expression pro-inflammatorischer

Moleküle triggert, legen nahe, dass IFI16 eine essentielle Bedeutung gerade bei den initialen Schritten von Entzündungsreaktionen z.B. im SLE zukommen könnte.

4.6 Eine direkte Bestrahlung von genomischer DNA und anderen Liganden zytosolischer Nukleinsäure-Rezeptoren führt zu einer verstärkten Immunerkennung *in vitro* und *in vivo*

Ein wesentlicher Anteil der vorliegenden Arbeit bestand darin herauszufinden, warum genomische aus UV-bestrahlten Zellen eine stärkere Immunantwort hervorrief als genomische DNA aus unbestrahlten Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür hätten Veränderungen an der DNA sein können, die durch die UV-Strahlung initiierten apoptotische Prozesse innerhalb der Zelle induziert werden. So wird in der Literatur vielfach neben der Fehlregulation der Apoptose (Gaipl et al., 2006; Kalden, 1997; Ma et al., 2005) speziell die Immunigität von DNA aus apoptotischen Zellen in Zusammenhang mit der Pathogenese von SLE gebracht (Nagata, 2005; Okabe et al., 2005). Sano und Kollegen beobachteten, dass DNA, die aus serologischen DNA-anti-DNA-Autoantikörperkomplexen von SLE-Patienten aufgereinigt wurde, eine Länge umfasste, die in etwa der durch Apoptose gespaltenen Chromatins entsprach (Sano et al., 1989). Laut Kawane und Kollgen deutet die Produktion von IFN-β in DNase II-defizienten Mäusen darauf hin, dass endogene DNA, die der apoptotischen DNA-Fragmentierung entgeht, das Immunsystem aktivieren kann (Kawane et al., 2003). Ob einzelne DNA-Fragmente, die infolge UV-induzierter Apoptose in den RMA Zellen entstehen, immunstimulatorisch aktiv sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht eindeutig geklärt werden. Während die genomische DNA aus UV-bestrahlten RMA Zellen nach Transfektion in murine Wildtyp-mDCs IFN-α induzierte, gelang es nicht eine immunstimulatorische Wirkung einzelner DNA-Fragmente von 200 bp Länge oder deren Vielfache nach Gelextraktion nachzuweisen.

Bezüglich der Immunogenität apoptotischer DNA publizierten Wen und Kollegen, dass apoptotische DNA, die aus UV-bestrahlten Milzzellen aufgereinigt worden war, nach subkutaner Injektion eine SLE-ähnliche Autoimmunerkrankung in Mäusen induzierte, die DNA unbehandelter oder nekrotischer Milzzellen hingegen nicht (Wen et al., 2007). Diese war gekennzeichnet durch die Induktion von anti-dsDNA AKs, Glomerulonephritis sowie Proteinuria. Sie zeigten, dass die Hypomethylierung apoptotischer DNA die

Immunogenität mitbeeinflusste. Dass SLE-ähnliche Autoimmunität durch hypomethylierte CpG-Motive induziert werden kann und solche Motive auch im Serum von SLE-Patienten nachzuweisen sind, wurde bereits von Nakao (Nakao, 2001) sowie Gilkeson und Kollegen beschrieben (Gilkeson et al., 1993). Darüber hinaus wurde publiziert, dass SLE-Lymphozyten, vor allem T-Zellen, Hypomethylierung aufweisen sowie eine reduzierte Expression der DNA-Methyltransferase 1-mRNA (Deng et al., 2001; Richardson et al., 1990; Richardson et al., 1992), und dass eine Behandlung mit demethylierenden Agenzien wie 5-Azacytidin, Procainamid und Hydralazin SLE-ähnliche Autoimmunität induzieren kann (Le Goff and Saraux, 1999; Richardson, 1986; Yung et al., 1995). Unklar ist in diesem Zusammenhang allerdings, inwieweit neben der TLR-vermittelten auch die zytosolische Erkennung apoptotischer DNA eine Rolle bei der Manifestation des SLE spielt. Ein Indiz dafür ist sicherlich, dass TLR9$^{-/-}$ Fas-defiziente Mäuse eine systemische Autoimmunerkrankung entwickeln, obgleich sie keine anti-dsDNA AKs bilden können (Christensen et al., 2005; Wu and Peng, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass genomische DNA, die aus unbehandelten RMA Zellen aufgereinigt wurde, auch durch direkte UV-Exposition in ihren immunstimulatorischen Eigenschaften verstärkt werden konnte. Durch Transfektion UV-bestrahlter genomischer DNA konnte signifikant mehr IFN-α in murinen Wildtyp-mDCs sowie humanen Monozyten induziert werden als durch Transfektion unbestrahlter genomischer DNA. Dies bedeutete, dass die UV-Strahlung selbst Modifikationen an der DNA induzierte, die unabhängig vom Stoffwechsel einer Zelle und daran beteiligter Proteine gebildet wurden. Aufgrund dieses Befundes konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass die UV-induzierte Apoptose in den RMA Zellen ursächlich für die Steigerung der immunstimulatorischen Aktivität zellulärer Nukleinsäuren war. Stattdessen war die Apoptose vielmehr als Folge von einer Vielzahl von Schädigungen insbesondere an Proteinen und Nukleinsäuren anzusehen, die durch UV-Bestrahlung induziert wurden. Auf diese Weise ist möglicherweise auch zu erklären, warum die UV-Exposition von Zellen immunogene RNA-Spezies erzeugte, die Stimulation von Zellen mit Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren hingegen nicht, obwohl sie ebenfalls Apoptose induzierten.

Neben genomischer DNA ließen sich, wie die vorliegende Arbeit zeigte, auch andere Liganden zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren durch direkte UV-Bestrahlung in ihren immunstimulatorischen Fähigkeiten verstärken. So induzierten poly I:C und 3-P-RNA, die über die zytosolischen Helikasen MDA-5 bzw. RIG-I detektiert werden, in murinen Wildtyp-mDCs infolge von UV-Exposition deutlich mehr IFN-α, IL-6 und IL-12p40. Dabei war der zytosolische Rezeptor für die Erkennung seines Liganden auch im UV-bestrahlten Zustand essentiell, was anhand von murinen MDA-5- bzw. RIG-I-defizienten mDCs belegt

werden konnte. Eine verstärkte IFN-α-Sekretion nach Stimulation mit UV-bestrahlten zytosolischen Liganden konnte zudem in humanen Monozyten, MoDCs sowie BDCA-1$^+$ DCs beobachtet werden. Ob Liganden von TLRs ebenfalls durch UV-Exposition in ihrer Aktivität gesteigert werden können, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, obgleich es interessant zu sehen gewesen wäre, ob das UV-Phänomen an eine zytosolische Nukleinsäureerkennung geknüpft war. In der Literatur waren zu dieser Wirkung des UV-Lichts keine Angaben zu finden.

Im Rahmen von Mausexperimenten konnte in dieser Arbeit zudem gezeigt werden, dass die UV-induzierte Verstärkung des immunstimulatorischen Potenzials von DNA auch *in vivo* nachzuvollziehen war. So war in den Seren von Wildtyp-Mäusen nach i.v. Injektion UV-bestrahlter genomischer DNA signifikant mehr IFN-α nachweisbar als nach Gabe unmodifizierter genomischer DNA. Auch an einem synthetischen DNA-Oligonukleotid konnte der UV-Effekt *in vivo* nachvollzogen werden. Dieser Befund unterstützte die Hypothese, dass die UV-induzierte Verstärkung der Immunstimulation bei Immunreaktionen in der Haut von großer Bedeutung sein könnte.

Die *in vivo*-Relevanz dieses UV-Effektes wurde außerdem durch die Beobachtung bekräftigt, dass nicht nur eine direkte Bestrahlung von genomischer DNA mit UV-C-Licht eine signifikante Steigerung ihres immunstimulatorischen Potenzials bewirkte, sondern auch eine direkte Bestrahlung mit UV-A- bzw. UV-B-Licht dazu führte, dass diese eine stärkere IFN-α-Antwort in APCs induzierte. Dabei waren allerdings im Falle der UV-A-Strahlung hundertfach höhere Strahlendosen nötig.

4.7 Durch UV-Strahlung generierte ROS induzieren Modifikationen, die das immunstimulatorische Potenzial von Nukleinsäuren steigern

Dass durch direkte Absorption der Strahlungsenergie ausgelöste, photochemische Reaktionen in den DNA-Basen allein zu einer UV-induzierten Steigerung der stimulatorischen Aktivität führten, konnte mit Hilfe von synthetischen DNA-Oligonukleotiden ausgeschlossen werden. Unabhängig von ihrer Basenzusammensetzung und davon, ob sie so genannte „hot spots“ enthielten, wurden die DNA-Oligonukleotide infolge der UV-Bestrahlung von einem der beiden DNA-Einzelstränge immunstimulatorisch aktiver. „Hot spots“ gelten als besonders gefährdet für Modifikationen, die im Rahmen des „Photocrosslinkings“ in der DNA induziert werden, da

sich zwei Thymin-Moleküle in direkter Nachbarschaft auf einem DNA-Strang befinden (Brash and Haseltine, 1982). Es bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Grad der Aktivitätssteigerung UV-bestrahlter Nukleinsäuren und der Möglichkeit zur Bildung von Photoprodukten wie CPDs (Ley and Gali, 1983) oder 6-4-PPs (Rosenstein and Mitchell, 1987).

In der vorliegenden Arbeit konnte veranschaulicht werden, dass anstelle direkter physiologischer Schädigungen an den Nukleinsäuren durch ROS induzierte Modifikationen das immunstimulatorische Potenzial von Nukleinsäuren verstärken konnten. Bei der Generierung von ROS handelt es sich um einen indirekten Schädigungsmechanismus der DNA, bei dem die Strahlungsenergie nicht von der DNA selbst, sondern zunächst von einem Photosensibilisator-Molekül absorbiert und dann auf molekularen Sauerstoff übertragen wird, was wiederum zur Bildung einer Vielzahl radikalischer und nichtradikalischer Sauerstoffmoleküle führt (Batista et al., 2009), z.B. Superoxidradikalanionen ($O_2^{\bullet -}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxylradikalen ($HO_2^{\bullet -}$), Hydroxylradikalen ($OH^{\bullet}$), hypochlorige Säure (HOCl), Ozon (O_3), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$). Diese ROS verfügen entweder selbst über eine oxidierende Wirkung oder werden in reaktive Radikale konvertiert, welche die DNA angreifen können. So führen ROS zum einen zu strukturellen Veränderungen in der DNA wie Basenpaarmutationen, Rearrangements, Deletionen, Insertionen und Sequenzamplifikationen (Wiseman and Halliwell, 1996), zum anderen haben sie auch Einfluss auf zytoplasmatische und nukleäre Signaltransduktionskaskaden (Burdon et al., 1995; Schreck et al., 1992) sowie auf die Modulation stressinduzierter Proteine und Gene, welche die Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose beeinflussen (Burdon et al., 1995; Cerutti, 1994; Sarafian and Bredesen, 1994; Schreck et al., 1992).

Dass der oxidative Status von genomischer DNA deren immunstimulatorische Wirkung beeinflusste, wurde im Rahmen dieser Arbeit daran deutlich, dass der beobachtete UV-Effekt durch eine H_2O_2-Behandlung imitiert werden konnte. So sekretierten murine Wildtyp-mDCs nach Stimulation mit genomischer DNA aus H_2O_2-behandelten RMA Zellen bzw. mit genomischer DNA, die direkt mit H_2O_2 inkubiert worden war, signifikant mehr IFN-α als nach Stimulation mit unmodifizierter genomischer DNA. Dies deckte sich mit den Beobachtungen zur Immunogenität von genomischer DNA, die aus UV-bestrahlten RMA Zellen aufgereinigt worden war, bzw. von direkt UV-bestrahlter genomischer DNA. Von Herrlich und Kollegen wurde bereits beschrieben, dass Fibroblasten, Hepatozyten, Lymphozyten und andere Zelltypen *in vitro* gleichermaßen auf UV-Bestrahlung wie auf eine Behandlung mit H_2O_2 reagieren (Herrlich et al., 2008). Dass die Wirkung von UV-Strahlung auch hier durch H_2O_2-Behandlung nachgeahmt werden konnte, lag vermutlich daran, dass unter beiden Konditionen Hydroxylradikale entstanden, welche für die

wesentlichen Modifikationen an der genomischen DNA verantwortlich waren. H_2O_2, das als ROS infolge von UV-Strahlung generiert wird, kann ebenso wie von außen zugegebenes H_2O_2 aufgrund seiner chemischen Stabilität über große Strecken diffundieren und sowohl Zell- als auch Organellenmembranen überwinden (Wiseman and Halliwell, 1996). Es kann jedoch nicht direkt mit der DNA reagieren (Dizdaroglu et al., 1993; Halliwell and Aruoma, 1991), sondern seine Hauptreaktivität geht auf die Bildung von sehr kurzlebigen und deshalb sehr reaktiven Hydroxylradikalen ($OH^{\bullet}$) zurück (Halliwell and Aruoma, 1991). Diese entstehen unter anderem katalysiert durch Fe^{2+} oder Cu^{+} durch die so genannte Fenton-Reaktion bzw. Haber-Weiss-Reaktion (Gutteridge et al., 1998; Imlay et al., 1988; Nascimento and Meneghini, 1995; Picardo et al., 1985; Trenam et al., 1992). ROS entstehen im menschlichen Körper nicht nur infolge exogener Ursachen wie UV-Strahlung oder chemischer Agenzien wie H_2O_2 sondern auch im normalen aeroben Zellstoffwechsel durch Enzyme, z.B. in den Elektronentransportketten in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum (Ambrosio et al., 1993; Guidot et al., 1993), sowie durch die katalytische Wirkung der Transitionsmetalle Eisen und Kupfer auf Sauerstoff (Halliwell, 1994). Ebenso bilden ROS einen essentiellen Teil der Immunabwehr, dennoch gilt die freie Zirkulation von ROS mit Zugang zu den Organen und Geweben auch als ursächlich für die Entstehung von zahlreichen Erkrankungen wie z.B. Krebs (Ames, 1989; Cerutti, 1994; Feig et al., 1994; Ohshima and Bartsch, 1994; Routledge et al., 1994; Totter, 1980), was vor allem auf Angriffe der ROS an Nukeobasen zurückzuführen ist, die zu mutagenen Basenläsionen führen können.

4.8 Die oxidative Basenmodifikation 8-OH-dG/8-OH-G in Nukleinsäuren ist für eine verstärkte Immunerkennung hinreichend

Das häufigste und am besten untersuchte Produkt, das unter dem Einfluss von ROS wie den Hydroxylradikalen entsteht, ist die oxidative Guaninmodifikation 8-OH-dG (Floyd et al., 1988; Kasai, 1997). Ihr Anteil an der Gesamtheit der auftretenden oxidativen Basenmodifikationen wird auf ca. 5 % geschätzt (Beckman and Ames, 1997; Dizdaroglu, 1992). Die 8-OH-dG-Modifikation wird deshalb als Marker für die Messung der oxidativen Schädigung von DNA verwendet.

Durch einen kompetitiven 8-OH-dG-ELISA nach enzymatischer Hydrolyse der DNA konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass in der genomischen DNA

von RMA Zellen durch Bestrahlung mit UV-C-Licht in Dosen von 250 und 1000 mJ/cm^2 die Bildung von 8-OH-dG induziert werden konnte bzw. dass die genomische DNA UV-exponierter RMA Zellen mehr 8-OH-dG enthielt als die unbehandelter RMA Zellen. 8-OH-dG kam damit als potentielle Basenmodifikation zur Steigerung des immunstimulatorischen Potenzials UV-geschädigter Nukleinsäuren in Frage.

Der Nachweis von 8-OH-dG in der genomischen DNA UV-exponierter RMA Zellen wies zudem darauf hin, dass die in der Zelle vorhandenen Reparatursysteme nicht ausreichten, um diese infolge der UV-Strahlung ausgelösten DNA-Läsionen vollständig zu reparieren. Solche Schäden werden normalerweise im Rahmen der BER aus der DNA entfernt, indem zunächst eine Glykosylase eine apurine Stelle in der DNA durch Ausschneiden der Base erzeugt, diese anschließend durch eine Endonuklease entfernt und die entstehende Lücke durch die DNA-Polymerase geschlossen wird. Die Formamidopyrimidinglykosylase (FGP-Protein) aus *E. coli* besitzt sowohl eine Glykosylase- als auch eine Endonukleaseaktivität für die Reparatur von 8-OH-dG-Läsionen (Boiteux et al., 1992; Tchou and Grollman, 1993). Im Menschen sind Enzyme mit vergleichbarer Funktion nachgewiesen. Das humane Analog des Enzyms Oxoguaninglykosylase-1 (hOGG-1) entfernt mit Cytosin gepaartes 8-Oxoguanin (Aburatani et al., 1997; Arai et al., 1997; Lu et al., 1997; Rosenquist et al., 1997). Das Enzym hOGG-2 entfernt hingegen 8-Oxoguanin, das während der DNA-Replikation gegenüber Adenin in die DNA inkorporiert wurde (Hazra et al., 1998). Während hOGG-1 für die globale Reparatur im nicht-replizierenden Genom zuständig ist, ist hOGG-2 vermutlich nur während der DNA-Replikation aktiv (Hazra et al., 2001). Bevor hOGG-2 8-OH-dG entfernt, löst das Enzym hMyH jedoch erst mit 8-OH-dG fehlgepaartes Adenin oder Guanin heraus (Holmes et al., 1990; McGoldrick et al., 1995; Zhang et al., 1998). Überdies ist für die Reparatur oxidativer Modifikationen die NER als Zusatz- bzw. Reservesystem bekannt (Dianov et al., 1998; Huang et al., 1994). Obgleich es wegen der fehlenden Spezifität der DNA-Bindungseinheiten gegenüber kleinen DNA-Läsionen nur aufgrund unspezifischer Bindungen zur NER dieser Läsionen kommt, ist die Beteiligung der NER auch an der Reparatur von 8-OH-dG und ihre biologische Bedeutung nicht zu unterschätzen. Reardon und Kollegen konnten zeigen, dass die Entfernung von 8-OH-dG aus der DNA durch die NER mit ca. 1,5-facher Geschwindigkeit gegenüber der Entfernung von Cyclobutan-Thymindindimeren, einer großen DNA-Läsion, die als Referenz verwendet wird, geschieht (Reardon et al., 1997).

Um zu beweisen, dass das in der genomischen DNA UV-bestrahlter RMA Zellen vermehrt nachgewiesene 8-OH-dG eine hinreichende Modifikation war, um das immunstimulatorische Potenzial von Nukleinsäuren zu verstärken, wurde 8-OH-dGTP bzw. 8-OH-GTP experimentell in DNA und RNA inkorporiert. Dazu wurde eine beliebige 1,5 kb lange DNA-Sequenz unter Zugabe von unterschiedlichen Mengen an 8-OH-dGTP-

Nukleotiden per PCR amplifiziert bzw. 3-P-RNA über *in vitro*-Transkription in Anwesenheit von 8-OH-GTP synthetisiert. Der erfolgreiche Einbau dieser Modifikation, der mittels ELISA bestätigt werden konnte, führte zu einer signifikanten Steigerung der immunstimulatorischen Wirkung der PCR-Produkte sowie der 3-P-RNA. So induzierten PCR-Produkte und 3-P-RNA mit inkorporiertem 8-OH-dGTP bzw. 8-OH-GTP signifikant mehr IFN-α in murinen Wildtyp-mDCs als im unmodifizierten Zustand. Auffallend war, dass bereits ganz geringe Mengen an 8-OH-GTP genügten, um das immunstimulatorische Potenzial von 3-P-RNA signifikant zu verstärken, während zu den PCR-Ansätzen mehr 8-OH-dGTP zugesetzt werden musste. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass bei den beiden Syntheseverfahren die Guaninmodifikation enzymatisch unterschiedlich effizient eingebaut wurde.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass neben der Sequenz und dem Gehalt an methylierten Cytosinen auch oxidative Modifikationen wie das 8-oxo-dG die Fähigkeit von Vertebraten-DNA erhöhen, TLR9 zu aktivieren (Busconi et al., 2006; Collins et al., 2004). Busconi und Kollegen konnten darüber hinaus zeigen, dass ORNs, die im unmodifizierten Zustand nicht-immunstimulatorisch waren (Heil et al., 2004), nach Inkorporation eines 8-oxo-G ebenfalls TLR9-abhängig erkannt wurden und Zytokine induzierten. Sie schlossen daraus, dass oxidativ geschädigtes Guanin generell ein Ligand für TLR9 ist (Busconi et al., 2006). Ihre Beobachtung, dass der Einbau dieser oxidativen Basenmodifikation das immunstimulatorische Potenzial von Nukleinsäuren verstärkt, deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Allerdings fiel dieser Effekt vor allem bei der zytosolischen Erkennung von Nukleinsäuren ins Gewicht, und die Beteiligung von PDCs, welche TLR9 zur Typ I-IFN-Antwort beitragen können, konnte ausgeschlossen werden. Ebenso konnte auch in TLR9-defizienten mDCs die gesteigerte Immunaktivierung durch UV-modifizierte DNA beobachtet werden, und auch in humanen Monozyten, die TLR9 nicht exprimieren, wurde der UV-Effekt beobachtet.

4.9 Die Stress-aktivierten Proteinkinasen p38 und JNK sind an der IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte genomische DNA beteiligt

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass 8-OH-dG bzw. 8-OH-G die Struktur von Nukleinsäuren derart veränderte, dass ihre Bindungseigenschaften an ihren spezifischen Rezeptor verbessert wurden und sie infolge dessen immunstimulatorischer waren. Ein Kotransfektionsexperiment, das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, sprach allerdings gegen diese Hypothese. Es zeigte sich, dass die Kotransfektion eines UV-bestrahlten aber relativ inerten DNA-Oligonukleotids in Kombination mit einem zytosolischen Stimulus wie poly I:C, poly dAdT oder 3-P-RNA zu einer signifikanten Steigerung der IFN-α-Antwort muriner Wildtyp-mDCs führte, wobei mit steigender Strahlendosis mehr IFN-α sezerniert wurde. Dass das UV-bestrahlte DNA-Oligonukleotid nicht die Aufnahme der kotransfizierten Nukleinsäure beeinflusste und es deshalb zu einer verstärkten IFN-α-Induktion kam, konnte mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotids ausgeschlossen werden. Dieser Befund deutete darauf hin, dass vermutlich zwei Signalwege bei dem beobachteten UV-Effekt miteinander interagierten und die Erkennung von Nukleinsäure und ROS bedingter, oxidativer Basenmodifikation möglicherweise über zwei unterschiedliche Rezeptoren erfolgte.

Im Rahmen eines weit gefächerten Screenings wurden die Effekte von Inhibitoren unterschiedlichster Signalwege auf die verstärkte IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte genomische DNA in murinen Wildtyp-mDCs untersucht. Es wurde nach einer gezielten Inhibition der UV-bedingten Signalamplifikation gesucht, um aufzuklären, welche Proteine an dem synergistisch wirkenden Signalweg beteiligt sein könnten. Dieses Screening umfasste eine Vielzahl von Inhibitoren, deren Zielproteine eine essentielle Rolle bei der Signaltransduktion, -regulation oder transkriptionellen Aktivierung innehaben: Inhibitoren gegen PKC (Gö6850), Syk (Piceatannol), Vav (6-Thio-GTP), JAK3 (Janex-1), Cdk2-Inhibitor (Cdk2-Inhibitor II), Stat5 (STAT5-Inhibitor), NFAT (Cyclosporin A) und NF-κB (BAY11-7082). Darüber hinaus wurden auch die Inhibitoren des Autophagie-Prozesses Ly294002, 3-Methyladenin und Wortmannin getestet. Die meisten dieser Inhibitoren hatten einen Einfluss auf die Viabilität der mDCs und führten infolgedessen zu einer generellen Reduktion der IFN-α-Antwort unabhängig von der transfizierten immunstimulatorischen Nukleinsäure.

Da UV-geschädigte Nukleinsäuren außer von einem spezifischen Rezeptor auch von Reparaturproteinen erkannt werden könnten, wurde ferner untersucht, ob diese

möglicherweise auch die IFN-α-Induktion beeinflussten. Doch weder eine Inhibition der an der Reparatur von DSBs beteiligten Proteinkinasen ATM und DNA-PK mittels KU-55933 bzw. NU-7026 noch die Inhibition der durch SSBs induzierten und BER regulierenden PARP-1 mit Hilfe von IQD hatten Auswirkungen auf die UV-bedingte Signalamplifikation.
Einzig unter der Verwendung der Inhibitoren gegen die MAPKs p38 (SB202190) und JNK (SP600125) zeigte sich, dass die IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte genomische DNA bereits bei sehr geringen Inhibitorkonzentrationen deutlich abnahm, während die IFN-α-Antwort auf poly I:C erst bei höheren Konzentrationen beeinträchtigt wurde. Die reduzierte IFN-α-Sekretion der mDCs war nicht auf eine Abnahme der Zellviabilität zurückzuführen. Folglich blockierte die gezielte Inhibition der MAPKs p38 und JNK die IFN-α-induzierende Signalkaskade, die durch die zytosolische Erkennung UV-modifizierter DNA eingeleitet wurde. Damit konnten die beiden MAPKs auch als mögliche synergistisch wirkende Signalmoleküle in Frage kommen, welche die IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte Nukleinsäuren amplifizierten. Die Inhibition der MAPK ERK mittels UO126 führte dagegen dosisabhängig zum Sterben der mDCs und einer damit einhergehenden Reduktion der IFN-α-Antwort.
Es ist bekannt, dass die SAPKs p38 und JNK insbesondere auf äußere Stressfaktoren wie UV-Strahlung, osmotischen Schock oder oxidativen Stress reagieren, aber auch auf inflammatorische Zytokine (Kyriakis and Avruch, 2001; Pearson et al., 2001). Die SAPKs werden vor allem im Zytoplasma aktiviert, wobei die Aktivierung über eine dreistufige Aktivierungskaskade erfolgt, und translozieren dann in den Nucleus, um Transkriptionsfaktoren wie AP-1 zu aktivieren, welche die Expression verschiedener Gene kontrollieren. Auf diese Weise induzieren sie Apoptose, Inflammation und Zelldifferenzierung. Von Raman und Kollegen wurde publiziert, dass nach UV-induzierten DSBs die Kinase TAO über ATM aktiviert wird und TAO daraufhin die Aktivierung von p38 über die MAPKKs MKK3/6 vermittelt (Raman et al., 2007). Auch eine Stimulation von ASK1 durch oxidativen Stress z.B. ROS führt laut Nagai und Kollegen zur Aktivierung von p38 und JNK, durch die nachfolgend Apoptose ausgelöst wird (Nagai et al., 2007). Zudem können pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 eine Phosphorylierung von p38 und JNK bewirken und dadurch eine inflammatorische Antwort auslösen (Coulthard et al., 2009; Kumar et al., 2003). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass p38 im Gegensatz zu JNK und ERK auch eine wichtige Rolle im IFN-Signalweg spielt (Platanias, 2003). So aktivieren IFN-α und IFN-β p38 in vielen verschiedenen Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Goh et al., 1999; Mayer et al., 2001; Platanias, 2003; Uddin et al., 2000), wobei diese Aktivierung auf der Ebene des Typ I-IFN-Rezeptors durch eine vorgeschaltete Aktivierung der Tyrosinkinasen Tyk2 und/oder Jak1 erfolgt (Mayer et al.,

2001) und über die kleine GTPase Rac1 vermittelt wird (Uddin et al., 2000). Die Aktivierung des Rac1/p38-Signalwegs wird zum einen mit der Regulation der IFN-abhängigen Gentranskription in Zusammenhang gebracht (Goh et al., 1999; Uddin et al., 2000; Uddin et al., 1999), zum anderen mit der Regulation der Typ I-IFN-abhängigen Induktion der Proteinexpression über post-transkriptionale Mechanismen (Doualla-Bell and Koromilas, 2001). Die Fähigkeit von p38, die IFN-abhängige Gentranskription zu regulieren, lässt vermuten, dass dieser Signalweg entweder die Aktivierung IFN-regulierter Stats moduliert oder aber über andere Effektormoleküle die Transkription von ISGs induziert (Li et al., 2004). Den Beobachtungen dieser Arbeit zufolge aktivierte anscheinend auch UV-modifizierte genomische DNA nach Translokation ins Zytosol muriner Wildtyp-mDCs die SAPKs p38 und JNK, welche die IFN-α-Sekretion wesentlich beeinflussten.

Anders als in murinen Wildtyp-mDCs zeigte sich in humanen Monozyten jedoch, dass unter Verwendung des p38-Inhibitors SB202190 die IFN-α-Induktion durch genomische DNA generell unterdrückt werden konnte, unabhängig davon ob die genomische DNA aus unbestrahlten oder UV-bestrahlten RMA Zellen isoliert worden war. Dazu reichten bereits geringe Konzentrationen des Inhibitors. Die IFN-α-Antwort auf transfiziertes poly dAdT sowie 3-P-RNA nahm hingegen erst mit steigender Inhibitorkonzentration langsam ab. Demnach würden p38 und möglicherweise auch JNK nicht explizit den UV-Effekt vermitteln sondern prinzipiell eine Rolle bei den zytosolischen Erkennungsmechanismen von genomischer DNA und/oder bei den dadurch induzierten Signaltransduktionswegen spielen. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die genomische DNA auch während ihrer Isolation aus den RMA Zellen durch Nutzung von Chloroform-Isoamylalkohol aufgrund reaktiver Abbauprodukte oxidativ geschädigt wurde. Dies würde wiederum bedeuten, dass p38 und JNK möglicherweise doch explizit die IFN-α-Antwort auf UV- bzw. oxidativ geschädigte genomische DNA wesentlich beeinflussen könnten. Zur Stützung dieser Hypothese wären jedoch weitere Experimente beispielsweise mit den entsprechenden „knockout“- oder „knockdown“-Zellen nötig. Auch ein Western Blot könnte evt. Aufschluss darüber geben, ob p38 und JNK gezielt oxidativ geschädigte Nukleinsäuren binden.

4.10 In myeloiden Immunzellen könnte die verstärkte Immunerkennung UV-geschädigter Nukleinsäuren anhand oxidativer Modifikationen zur Phototoxizität beim SLE führen

Die Bedeutung des durch ROS beeinflussten, oxidativen Status von Nukleinsäuren für die Induktion von Immunantworten, die in dieser Arbeit herausgearbeitet wurde, wird in der Literatur vielfach mit der Entstehung von Erkrankungen assoziiert. Interessanterweise finden sich in diesem Zusammenhang viele Publikationen über mitochondriale DNA (Harman, 1992; Shigenaga et al., 1994). In mitochondrialer DNA können unter normalen Umständen weitaus mehr oxidative Basenschädigungen in Form von 8-OH-dG nachgewiesen werden als in nukleärer DNA (Agarwal and Sohal, 1994; Richter, 1992; Shigenaga et al., 1994), was sowohl auf die räumliche Nähe der mitochondrialen DNA zu den während des Elektronentransports generierten ROS, auf ein Fehlen schützender Histonproteine als auch auf ineffiziente mitochondriale DNA-Reparaturmechanismen zurückzuführen ist (Wiseman and Halliwell, 1996). Collins und Kollegen publizierten, dass mitochondriale DNA aufgrund unmethylierter CpG-Sequenzen sowie ihres oxidativen Status eine pro-inflammatorische Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* besitzt und nach intraarticulärer Injektion Arthritis in Mäusen induzierte (Collins et al., 2004). Dabei spielten Monozyten und Makrophagen eine essentielle Rolle. Aber auch oxidativ geschädigte DNA konnte unabhängig von CpG-Motiven Arthritis auslösen, unmodifizierte nukleäre DNA hingegen nicht. Mit Hilfe von DNA-Oligonukleotiden konnten sie zeigen, dass die Induktion von Arthritis auf 8-OH-dG-Modifikationen beruhte. Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass in der Gelenksflüssigeit von Arthritis-Patienten signifikant größere Mengen extrazellulärer, mitochondrialer DNA sowie oxidierter DNA vorlagen als in Kontrollpatienten. Auch bei Patienten, die an der Alzheimer oder vaskulärer Demenz erkrankt waren, konnten sie intrathekal mehr oxidierte DNA nachweisen als bei gesunden Kontrollen. Oxidativ geschädigte mitochondriale DNA bzw. eine Zunahme der 8-OH-dG-Modifikation wurde schon früher in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Mecocci et al., 1994) und Artheriosklerose gebracht (Corral-Debrinski et al., 1992), wobei kontrovers diskutiert wurde, ob diese Zunahme auf eine vermehrte oxidative Schädigung zurückging und/oder eine verminderte Reparaturaktivität (Halliwell and Aruoma, 1991). Bashir und Kollegen zeigten ebenfalls, dass die genomische DNA aus Lymphozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis, SLE, Vaskulitis sowie der Behcet's Erkrankung mehr 8-OH-dG aufwies als die gesunder

Kontrollen (Bashir et al., 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die immunogene Wirkung von Mitochondrien, die entweder aus UV-bestrahlten RMA Zellen isoliert oder direkt mit UV-Licht bestrahlt worden waren, untersucht. Unter den getesteten Konditionen konnte jedoch keine IFN-α-Antwort in Wildtyp-mDCs durch eine Stimulation mit Mitochondrien induziert werden, weshalb diese Versuche hier nicht aufgeführt sind.

Auf der Grundlage der angeführten Publikationen sowie den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte man dennoch vermuten, dass in einem Mausmodell zum SLE beispielsweise dem MRL/lpr-Modell, bei dem die Autoimmunität wesentlich durch eine Mutation im Fas-Rezeptor-Gen lpr zurückzuführen ist, auch UV-modifizierte genomische DNA SLE stärker induzieren müsste als unmodifizierte genomische DNA. Erste Befunde deuteten zumindest darauf hin, dass MRL/lpr-Mäuse ebenso wie Wildtyp-Mäuse nach einmaliger i.v. Injektion UV-bestrahlter genomischer DNA signifikant mehr IFN-α produzierten als nach Gabe unmodifizierter genomischer DNA. Allerdings wurde von Schwarting und Kollegen beschrieben, dass eine IFN-β-Behandlung die serologische und histologische Manifestation der Erkrankung in MRL-Fas^{lpr}-Mäusen reduziert (Schwarting et al., 2005).

Mit der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen möglichen Mechanismus aufzuzeigen, wie UV-Strahlung zur Induktion von Lupus-Schüben führen könnte. Die genauen Gründe, warum bei vielen LE-Patienten durch Sonnen- bzw. UV-Exposition neben Entzündungsreaktionen in den inneren Organen im Falle einer systemischen Manifestation insbesondere die für alle LE-Subtypen charakteristischen Hautläsionen provoziert werden, waren bislang völlig unklar.

Diesem Mechanismus zufolge kommt es in der Haut von LE-Patienten, die unter erhöhter Photosensitivität leiden, infolge von UV-Exposition neben vermehrter Apoptose in Keratinozyten und anderen Zelltypen der Haut auch zu übermäßigen Schädigungen zellulärer Nukleinsäuren in Form von oxidativen Basenmodifikationen wie 8-OH-dG/8-OH-G. Werden diese UV-geschädigten Nukleinsäuren unzureichend von DNasen abgebaut und gelangen in das Zytosol myeloider Immunzellen oder Keratinozyten, werden sie von dortigen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt. Es ist denkbar, dass auch der Rezeptor selbst infolge der UV-Exposition hochreguliert wird, wodurch die Detektion oxidierter Nukleinsäuren zusätzlich gesteigert wird. So wird, möglicherweise über die SAPKs p38 und JNK, eine verstärkte pro-inflammatorische Immunantwort ausgelöst, die neben der Sekretion von IP10, IL-6 und IL-12p40 insbesondere durch große Mengen Typ I-IFN charakterisiert ist.

Dieser Mechanismus einer verstärkten Immunerkennung UV-geschädigter Nukleinsäuren wäre eine Erweiterung des von Baccala und Kollegen beschriebenen Modells, dem

zufolge systemische Autoimmunität wie beim SLE in zwei fundamentalen Phasen induziert wird, die sich zwar im Bezug auf die APC-Aktivierung unterscheiden, sich aber beide um die Produktion des krankheitsfördernden Schlüsselzytokins Typ I-IFN drehen (Baccala et al., 2007). Nach diesem Modell werden in einer initialen TLR-unabhängigen Phase zunächst apoptotisches Zellmaterial sowie damit assoziierte Nukleinsäuren von speziellen DCs aufgenommen, wobei diese Phase bereits durch die Ausschüttung von Typ I-IFN gekennzeichnet ist (Baccala et al., 2007). Wie vor allem RNA, DNA, Makromoleküle, die diese Nukleinsäuren beinhalten, oder gar noch undefiniertes, apoptotisches Zellmaterial TLR-unabhängig IFN-α/β in DCs induzieren können, ist noch wenig bekannt (Baccala et al., 2007). Mit dem Befund der vorliegenden Arbeit, dass durch UV-Strahlung oxidativ geschädigte Nukleinsäuren in der Haut TLR-unabhängig IFN-α/β induzieren könnten und so zur Initiation der Pathogenese lokaler oder systemischer Autoimmunität beitragen könnten, wäre diese Wissenslücke zum Teil geschlossen. Unter dem Einfluss des sekretierten IFN-α/β würden dann myeloide und lymphoide DCs MHC und andere ko-stimulatorische Moleküle wie CD40, CD80, CD86 auf ihrer Oberfläche hochregulieren und zu effizienten Selbst-Antigen präsentierenden Zellen differenzieren, die autoreaktive T-Helfer-Zellen aktivieren können (Baccala et al., 2007). Des Weiteren fördern die DCs die Maturation von $CD8^+$ Effektor-T-Zellen, welche Zielzellen abtöten sowie Nukleosomen und weitere Lupus-Autoantigene generieren (Banchereau and Pascual, 2006). Infolge der Zytokinausschüttung, insbesondere von BAFF (Blys) und APRIL, durch die IFN-α/β-aktivierten DCs proliferieren auch autoreaktive B-Zellen und differenzieren zu Plasmazellen (Baccala et al., 2007). Durch die Bildung von Nukleinsäure beinhaltenden Immunkomplexen wird dann die Amplifikationsphase induziert. (Baccala et al., 2007). In dieser Phase werden nukleäre Autoantigene, Chromatin oder dessen Bestandteile komplexiert an Autoantikörper über FcγRIIa aufgenommen. Diese induzieren zum einen in PDCs die Produktion von IFN-α/β über die endosomalen TLR7/8 und TLR9 (Barrat et al., 2005; Boule et al., 2004; Marshak-Rothstein, 2006; Martin and Elkon, 2005; Ronnblom et al., 2006; Savarese et al., 2006; Vollmer et al., 2005; Wagner, 2006), zum anderen fördern diese Komplexe die TLR-abhängige Aktivierung von B-Zellen, die Antigenrezeptoren (BCR) tragen, welche spezifisch für Autoantigenepitope oder den Fc-Teil des Autoantikörpers im Immunkomplex sind (Marshak-Rothstein, 2006). Die Aktivierung von BCR und TLR7/9 führt zu einer effizienten B-Zell-Proliferation, wobei die aktivierten B-Zellen auch Peptide endozytierter Makromoleküle T-Helfer-Zellen präsentieren können (Baccala et al., 2007). Im Gegensatz zur initialen Phase ist diese zweite Phase also durch eine TLR-abhängige Induktion von IFN-α/β in PDCs und DCs sowie durch eine erhöhte B-Zell-Proliferation und AK-Produktion gekennzeichnet (Baccala

et al., 2007). Durch Wechselwirkung mit Typ I-IFN wird zudem vermutlich Typ II-IFN induziert (IFN-γ). Das Zusammenspiel all dieser Effekte führt letztlich zur Aufrechterhaltung des Autoimmunprozesses und erhöht die Pathogenität, wobei der hier vorgestellte Mechanismus der verstärkten Immunerkennung UV-geschädigter Nukleinsäuren und TLR-unabhängigen Induktion von IFN-α/β vor allem in der Initiationsphase von zentraler Bedeutung sein könnte.

Ein größeres Verständnis der Pathogenese des LE eröffnet gleichzeitig auch neue Möglichkeiten zur Therapie dieser Autoimmunerkrankung. IFN-α/β und/oder IFN-γ mit AKs oder rekombinanten Rezeptoren zu blockieren oder der Einsatz von DNA-Sequenzen und anderer Mittel, die eine Aktivierung von TLRs inhibieren (Barrat et al., 2005; Dong et al., 2005; Rezaei, 2006), stellen sicherlich vielversprechende Therapiemöglichkeiten dar (Baccala et al., 2007), andererseits schon in die Initiationsphase der Erkrankung eingreifen zu können und dabei weder TLRs noch IFN-α/β in ihrer nützlichen Funktion einschränken zu müssen, wäre eine völlig neue und sicherlich auch vorteilhafte Strategie. Es müsste gelingen, gezielt UV-geschädigte Nukleinsäuren zu entfernen bzw. deren Erkennung zu unterbinden, um so die initiale Produktion von IFN-α/β auszuschalten. Die genaue Entschlüsselung des Erkennungsmechanismus oxidierter genomischer DNA wäre daher ein neuer Ansatzpunkt für eine erfolgreiche Therapie des SLE.

5 Anhang

5.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

ODN	DNA-Sequenz
ACG	ACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACGACG
AGC	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
CCG	CCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCG
CGG	CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGT	CGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGT
GCT	CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AC	ACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
GT	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
ATA	ATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA
TAT	ATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATT
CTA	CTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTA
TCA	TCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATCA
ACA	ACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
TAG	TAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAG
TGA	TGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGA
TGT	TGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGT
CpG 1826	TCCATGACGTTCCTGACGTT
Fluoreszenz-markiertes ODN	FAM-CAATGGTCCTGCTGGAGTTC

ORN	RNA-Sequenz
IVT2	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCG

5.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(d)NTPs	(Desoxy)nukleosidtriphosphate
°C	Grad Celsius
3-P-RNA	5’-Triphosphat RNA
6-4-PP	Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukt
8-OH-(d)G	8-Hydroxy-(2-desoxy)guanosin
8-OH-(d)GTP	8-Hydroxy-(2-desoxy-)guanosintriphosphat

8-oxo-dG	8-Oxo-2'-desoxyguanosin
AChE	Acetylcholinesterase
ADAR	RNA-specific adenosine deaminase
AIM2	absent in melanoma 2
AK	Antikörper
ALE	Akuter LE
Ana	antinukleäre Antikörper
AP-1	activator protein 1
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APE1	apurinic/apyrimidinic-endonuclease 1
AP-Stelle	apurine/apyrimidine Stelle
ARA	American Rheumatism Association
ASC	apoptosis-associated speck-like protein
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase
ATF2	activating transcription factor 2
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM and Rad3 related
BAFF	B cell activating factor of the TNF family
Bax	bcl-2-associated x protein
BDCA	blood dendritic cell antigen
BER	Basen-Exzisionsreparatur
Blys	B lymphocyte stimulator
bp	Basenpaar
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CARD	caspase recruitment domain
CARDif	CARD adaptor inducing IFN-β
CBP	CREB-binding protein
CCLE	Chronischer CLE
CD	Cluster of Differentiation
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2 inhibitor
CDLE	Chronisch diskoider CLE
CHK	checkpoint kinase
ChLE	Chilblain LE
CLE	Kutaner LE
cm	Zentimeter
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CSA/B	Cockaine Syndrome complementation group A/B
CTD	C-terminale Domäne
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DC	dendritische Zelle
DDB1/2	damaged DNA binding 1/2
DFF	DNA fragmentation factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNase	Desoxyribonuclease
ds	Doppelstrang-, doppelsträngig
DSB	double strand break
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
ERK	extracellullar signal-related kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	FAS-associated death domain
FALS	forward angle light scatter
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FSC	forward scatter
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G(M)-CSF	Granulozyten-(Makrophagen-)Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HIN-200	hematopoetic interferon-inducible protein with 200 amino acid repeat
HLA	human leukocyte antigen
hOGG-1/2	Oxoguaninglykosylase-1/2
HRP	horse radish peroxidase
HSV	Herpes-simplex-Virus
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells
IκB	inhibitor of NF-κB
i.v.	intravenös
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
ICAM	inter-cellular adhesion molecule 1
ICLE	Intermittierender CLE
ICs	Chromatin-IgG-Immunkomplexe
IFI16	interferon-inducible protein 16
IFIX	interferon-inducible protein X
IFN	Interferon
IFNAR	Typ I-Interferon-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IPS-1	IFN-β promoter stimulator 1
IRAK	interleukine-1 receptor associated kinase
IRF	interferon regulatory factor
ISG	IFN-stimulated gene
ISGF	IFN-stimulated gene factor
ISRE	IFN-stimulated response element
J/cm^2	Joule pro Quadratzentimeter
JAK	Janus Kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
kB	Kilobasenpaar

kDA	Kilodalton
ko	knockout
l	Liter
LE	Lupus erythematodes
LEP	LE profundus
LET	LE tumidus
LGP2	laboratory of genetics and physiology 2
LLR	C-Typ Lektin-like Rezeptor
LRR	leucin rich repeats
M	molar
MACS	magnetic cell sorting
Mal	MyD88 adaptor like
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAVS	mitochondrial antiviral signalling protein
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MDA-5	melanoma differentiation associated gene 5
mDC	myeloide dendritische Zelle
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MITA	mediator of IRF3 activation
mJ/cm^2	Millijoule pro Quadratzentimeter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MNDA	myeloid nuclear differentiation antigen
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunden
mTOR	mammalian target of rapamycin
Mx	myxovirus resistance GTPase
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid
NAK	NF-κB-activating kinase
NAP1	NAK-associated protein 1
NEMO	NF-κB essential modulator
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NFAT	nuclear factor of activated T cells
ng	Nanogramm
NHEJ	nichthomologes Endjoining
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NLR	Nod-like Rezeptor
NLRP3	NOD-like receptor family, pryin domain containing 3
nm	Nanometer

nM	nanomolar
nt	Nukleotid
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
ORN	Oligoribonukleotid
p38	p38 mitogen-activated protein-kinase
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PAR	Poly (ADP-Ribose)
PARG	Poly (ADP-Ribose)-glykohydrolase
PARP-1	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle
PCNA	proliferating cellular nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PDC	plasmazytoide dendritische Zelle
pg	Picogramm
PI3K	phosphatidylinositol-3-OH kinase
PIKK	phosphatidylinositol 3-kinase related kinase
PKC	Proteinkinase C
PKR	dsRNA-dependent protein kinase
pmol	Picomol
Pol	Polymerase
poly A	polyadenylic acid potassium salt
poly dAdT	polydeoxyadenylic-polydeoxythymidilic acid sodium salt
poly I:C	polyinosinic-polycytidilic acid
PRD	positive regulatory domain
PRR	pattern recognition receptor
RD	Repressor-Domäne
RFC	replication factor C
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RIP1	receptor interacting protein 1
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC-loading complex
RLR	Rig-like Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RPA	replication protein A
rRNP	ribosomal ribonucleoprotein
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SARM	sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein
SCLE	Subakuter CLE
SEM	standard error of mean
shRNA	short hairpin RNA

siRNA	small interfering RNA
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
ss	Einzelstrang-, einzelsträngig
SSB	single strand break
SSC	sideward scatter
Stat	signal transducer and activator of transcription
STING	stimulator of interferon genes
Syk	spleen tyrosine kinase
TAB	TAK1 bindendes Protein
TAK1	transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1
TANK	TRAF-family member associated NF-κB activator
TAO	thousand and one amino acid
TBK1	TANK binding kinase 1
TGF-β	transforming growth factor-β
T_H1	T-Helfer-Zelle Typ 1
TICAM1/2	TIR domain containing adaptor molecule 1/2
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor Homologie
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAF	TNF-receptor associated-factor
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR domain containing adaptor protein inducing IFN-β
TRIM	tripartite motif protein
Tyk2	Tyrosin Kinase 2
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VISA	virus-induced signalling adaptor
WALS	wide angle light scatter
XPC	xeroderma pigmentosum complementation group C
XRCC	X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells
ZBP1	Z-DNA binding protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

5.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: TLR-unabhängige Signalwege der IFN-α/β-Induktion. 19
Abbildung 1.2: Eindringvermögen von UV-A-, UV-B- und UV-C-Strahlung in die menschliche Haut. 27
Abbildung 1.3: Struktur UV-modifizierter DNA-Läsionen modifiziert nach (Li et al., 2006). 30
Abbildung 1.4: Struktur des 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosins (8-OH-dG). 32
Abbildung 2.1: Template für die T7-RNA-Polymerase-Reaktion zur Herstellung von 3-P-RNA. 83
Abbildung 2.2: Der lentivirale Plasmidvektor pLKO.1-puro und seine Elemente. 90
Abbildung 3.1: Dosisabhängige Induktion von Apoptose durch UV-Strahlung. 95
Abbildung 3.2: Elekrophoretische Auftrennung isolierter DNA aus normalen Zellen (hochmolekulare DNA) und aus UV-bestrahlten Zellen (DNA-Leiter). 96
Abbildung 3.3: Dosisabhängige Induktion von IL-6 durch UV-Strahlung. 97
Abbildung 3.4: UV-bestrahlte Zellen induzieren weniger und mit poly I:C elektroporierte Zellen induzieren mehr IL-6 und IL-12p40 in Kokultur mit murinen mDCs. 99
Abbildung 3.5: UV-Strahlung induziert immunogene RNA-Spezies, eine Stimulation mit poly I:C nicht. 101
Abbildung 3.6: RNA UV-bestrahlter L929 Zellen induziert IFN-α in murinen mDCs. 102
Abbildung 3.7: Erhöhte Induktion von IFN-α sowie anderen pro-inflammatorischen Zytokinen in murinen mDCs nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen. 103
Abbildung 3.8: DNA aus UV-bestrahlten Zellen induziert geringe Mengen IFN-α nach Zugabe in den Überstand von murinen mDCs. 104
Abbildung 3.9: Verstärkte IFN-α- und IP-10-Induktion in murinen 129 WT Makrophagen sowie SP1 Keratinozyten nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen. 105
Abbildung 3.10: Erhöhte IFN-α-Sekretion in humanen Monozyten nach Stimulation mit UV-modifizierter DNA. 107
Abbildung 3.11: Genomische DNA aus UV-B- sowie UV-C-bestrahlten Zellen weist eine deutlich verstärkte immunstimulatorische Aktivität auf. 108
Abbildung 3.12: Einfluss von UV-A-, UV-B- und UV-C-Strahlung auf die Zellviabilität. 109
Abbildung 3.13: Verlust der stimulatorischen Aktivität von UV-modifizierter DNA durch DNase I-Behandlung. 110
Abbildung 3.14: TLR9-unabhängige Erkennung von UV-modifizierter DNA induziert verstärkte IFN-α-Antwort in murinen mDCs. 112
Abbildung 3.15: Endosomal-unabhängige Erkennung von UV-modifizierter DNA induziert erhöhte IFN-α-Sekretion in murinen mDCs. 113
Abbildung 3.16: Bestätigung der MITA-abhängigen IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte genomische DNA mittels shRNA-knockdown. 115
Abbildung 3.17: Verstärkte IFN-α-Induktion in murinen mDCs sowie humanen Monozyten nach Stimulation mit UV-bestrahlter genomischer DNA. 116
Abbildung 3.18: Steigerung der immunstimulatorischen Aktivität von genomischer DNA durch UV-A- und UV-B-Bestrahlung. 117
Abbildung 3.19: UV-Bestrahlung von poly I:C und 3-P-RNA führt zu einer gesteigerten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in murinen mDCs. 119
Abbildung 3.20: Erkennung UV-modifizierter Liganden über deren spezifische zytosolische Nukleinsäurerezeptoren. 120

Abbildung 3.21: Verstärkte IFN-α-Sekretion in humanen Monozyten nach Stimulation mit den UV-bestrahlten zytosolischen Liganden poly I:C und 3-P-RNA. 121
Abbildung 3.22: Gesteigerte IFN-α-Produktion in humanen MoDCs sowie BDCA-1$^+$ DCs infolge Stimulation mit UV-modifizierter 3-P-RNA. 122
Abbildung 3.23: Irrelevanz der Basenzusammensetzung für die Verstärkung der IFN-α-Induktion nach Stimulation mit UV-modifizierten DNA-Oligonukleotiden. 124
Abbildung 3.24: Verstärkte IFN-α-Induktion in murinen mDCs durch Stimulation mit H_2O_2-modifizierter DNA. 126
Abbildung 3.25: Nachweis von 8-OH-dG in der genomischen DNA UV-bestrahlter Zellen. 128
Abbildung 3.26: Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mit inkorporiertem 8-OH-dGTP. 129
Abbildung 3.27: Verstärkung der stimulatorischen Aktivität von PCR-Produkten durch Einbau von 8-OH-dGTP. 130
Abbildung 3.28: Steigerung der stimulatorischen Wirkung von 3-P-RNA durch 8-OH-GTP-Einbau. 131
Abbildung 3.29: Steigerung der IFN-α-Produktion in Wildtyp-Mäusen durch i.v. Injektion von UV-modifizierter DNA. 133
Abbildung 3.30: Gesteigerte IFN-α-Produktion in murinen mDCs durch Kostimulation von zytosolischen Nukleinsäurerezeptorliganden mit UV-bestrahlter nicht-stimulatorischer DNA. 134
Abbildung 3.31: Das UV-bestrahlte DNA-Oligonukleotid beeinflusst nicht die Aufnahme einer weiteren kotransfizierten Nukleinsäure. 136
Abbildung 3.32: Verstärkte IL-1β-Sekretion in murinen mDCs sowie 129 WT Makrophagen nach Stimulation mit genomischer DNA aus UV-bestrahlten Zellen. 137
Abbildung 3.33: Unabhängig vom Inflammasom erhöhte IFN-α-Sekretion in murinen mDCs nach Stimulation mit UV-modifizierten Nukleinsäuren. 138
Abbildung 3.34: Die Behandlung von murinen mDCs mit PKC-, Syk- und JAK3-Inhibitoren führt generell zu Zellsterben und reduzierter IFN-α-Sekretion. 141
Abbildung 3.35: Die Inhibition der Transkriptionsfaktoren Stat5, NFAT und NF-κB in murinen mDCs bedingt eine allgemeine Reduktion der Zellviabilität sowie der IFN-α-Sekretion. 143
Abbildung 3.36: Die Inhibition der PI3K induziert eine mit dem Zellsterben korrelierende Abnahme der IFN-α-Sekretion in murinen mDCs. 144
Abbildung 3.37: Die DNA-Reparaturenzyme ATM und DNA-PK sind in murinen mDCs nicht an der IFN-α-Induktion durch UV-modifizierte Nukleinsäuren beteiligt. 145
Abbildung 3.38: Die Inhibition der MAPKs p38 und JNK führt zu einer Reduktion der IFN-α-Antwort auf UV-modifizierte genomische DNA in murinen mDCs. 147
Abbildung 3.39: Die Inhibition der MAPK p38 unterdrückt die IFN-α-Induktion durch genomische DNA in humanen Monozyten vollständig. 148

5.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: TLR1-11 und Beispiele für ihre Liganden. 14
Tabelle 1.2: Klassifikation des kutanen Lupus erythematosus (CLE) modifiziert nach (Kuhn and Ruzicka, 2004) mit Kurzbeschreibung der CLE-Varianten nach (Wenzel et al., 2003)..... 43
Tabelle 1.3: Übersicht über die häufigsten klinischen Symptome beim SLE nach (Tan et al., 1982). 44
Tabelle 1.4: Charakteristische Autoantikörper beim SLE nach (Tan, 1989; Tan et al., 1982). 45
Tabelle 3.1: Getestete Inhibitoren, deren Zielproteine und der untersuchte Konzentrationsbereich. 140

5.5 Literaturverzeichnis

1 Aberer, W., Schuler, G., Stingl, G., Honigsmann, H., and Wolff, K. (1981). Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. **J Invest Dermatol** *76*, 202-210.

2 Abeyama, K., Eng, W., Jester, J.V., Vink, A.A., Edelbaum, D., Cockerell, C.J., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. (2000). A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. **J Clin Invest** *105*, 1751-1759.

3 Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K.A., and Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. **Nat Immunol** *10*, 1065-1072.

4 Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev** *15*, 2177-2196.

5 Abraham, R.T. (2004). PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. **DNA Repair (Amst)** *3*, 883-887.

6 Aburatani, H., Hippo, Y., Ishida, T., Takashima, R., Matsuba, C., Kodama, T., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K., and Asano, M. (1997). Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. **Cancer Res** *57*, 2151-2156.

7 Adhikari, A., Xu, M., and Chen, Z.J. (2007). Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. **Oncogene** *26*, 3214-3226.

8 Agarwal, S., and Sohal, R.S. (1994). DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. **Proc Natl Acad Sci U S A** *91*, 12332-12335.

9 Aharon-Maor, A., and Shoenfeld, Y. (1998). [The role of ultraviolet light, and sun and fluorescent light, in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus]. **Harefuah** *135*, 295-299.

10 Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. **Cell** *124*, 783-801.

11 Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. **J Exp Med** *188*, 1359-1368.

12 Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature** *413*, 732-738.

13 Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. **Science** *285*, 736-739.

14 Allina, J., Hu, B., Sullivan, D.M., Fiel, M.I., Thung, S.N., Bronk, S.F., Huebert, R.C., van de Water, J., LaRusso, N.F., Gershwin, M.E.*, et al.* (2006). T cell targeting and phagocytosis of apoptotic biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis. **J Autoimmun** *27*, 232-241.

15 Allina, J., Stanca, C.M., Garber, J., Hu, B., Sautes-Fridman, C., Bach, N., and Odin, J.A. (2008). Anti-CD16 autoantibodies and delayed phagocytosis of apoptotic cells in primary biliary cirrhosis. **J Autoimmun** *30*, 238-245.

16 Ambrosio, G., Zweier, J.L., Duilio, C., Kuppusamy, P., Santoro, G., Elia, P.P., Tritto, I., Cirillo, P., Condorelli, M., Chiariello, M.*, et al.* (1993). Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. **J Biol Chem** *268*, 18532-18541.

17 Ame, J.C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. **Bioessays** *26*, 882-893.

18 Ames, B.N. (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. **Free Radic Res Commun** *7*, 121-128.

19 Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985a). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. **Cell** *42*, 791-798.

20 Anderson, K.V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. (1985b). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. **Cell** *42*, 779-789.

21 Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S.R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S., and Yokota, J. (1997). Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. **Oncogene** *14*, 2857-2861.

22 Austen, K.F., and Fearon, D.T. (1979). A molecular basis of activation of the alternative pathway of human complement. **Adv Exp Med Biol** *120B*, 3-17.

23 Baadsgaard, O., Wulf, H.C., Wantzin, G.L., and Cooper, K.D. (1987). UVB and UVC, but not UVA, potently induce the appearance of T6- DR+ antigen-presenting cells in human epidermis. **J Invest Dermatol** *89*, 113-118.

24 Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D.H., Beutler, B., and Theofilopoulos, A.N. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. **Nat Med** *13*, 543-551.

25 Baer, R.L., and Harber, L.C. (1965). Photobiology of lupus erythematosus. **Arch Dermatol** *92*, 124-128.

26 Baima, B., and Sticherling, M. (2001). Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus. **Br J Dermatol** *144*, 958-966.

27 Balachandran, S., Thomas, E., and Barber, G.N. (2004). A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. **Nature** *432*, 401-405.

28 Banchereau, J., and Pascual, V. (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. **Immunity** *25*, 383-392.

29 Barchet, W., Krug, A., Cella, M., Newby, C., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pekosz, A., and Colonna, M. (2005). Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. **Eur J Immunol** *35*, 236-242.

30 Barchet, W., Wimmenauer, V., Schlee, M., and Hartmann, G. (2008). Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. **Curr Opin Immunol** *20*, 389-395.

31 Barrat, F.J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J.H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R.L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. **J Exp Med** *202*, 1131-1139.

32 Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell** *3*, 421-429.

33 Bashir, M.M., Sharma, M.R., and Werth, V.P. (2009). UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF-alpha production in keratinocytes through enhanced gene transcription. **J Invest Dermatol** *129*, 994-1001.

34 Bashir, S., Harris, G., Denman, M.A., Blake, D.R., and Winyard, P.G. (1993). Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. **Ann Rheum Dis** *52*, 659-666.

35 Basner-Tschakarjan, E., Gaffal, E., O'Keeffe, M., Tormo, D., Limmer, A., Wagner, H., Hochrein, H., and Tuting, T. (2006). Adenovirus efficiently transduces plasmacytoid dendritic cells resulting in TLR9-dependent maturation and IFN-alpha production. **J Gene Med** *8*, 1300-1306.

36 Batista, L.F., Kaina, B., Meneghini, R., and Menck, C.F. (2009). How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. **Mutat Res** *681*, 197-208.

37 Baumann, U., Chouchakova, N., Gewecke, B., Kohl, J., Carroll, M.C., Schmidt, R.E., and Gessner, J.E. (2001). Distinct tissue site-specific requirements of mast cells and complement components C3/C5a receptor in IgG immune complex-induced injury of skin and lung. **J Immunol** *167*, 1022-1027.

38 Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. **J Biol Chem** *272*, 19633-19636.

39 Beissert, S., Ullrich, S.E., Hosoi, J., and Granstein, R.D. (1995). Supernatants from UVB radiation-exposed keratinocytes inhibit Langerhans cell presentation of tumor-associated antigens via IL-10 content. **J Leukoc Biol** *58*, 234-240.

40 Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H.J., and Herrlich, P. (1998). Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. **EMBO J** *17*, 5170-5181.

41 Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (2006). Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. **Ann Rheum Dis** *65*, 57-63.

42 Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev** *16*, 6-21.

43 Bird, A.P. (1993). Functions for DNA methylation in vertebrates. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** *58*, 281-285.

44 Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. **Science** *294*, 1540-1543.

45 Block, S.R., Winfield, J.B., Lockshin, M.D., D'Angelo, W.A., and Christian, C.L. (1975). Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. **Am J Med** *59*, 533-552.

46 Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., and Dizdaroglu, M. (1992). Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. **Biochemistry** *31*, 106-110.

47 Bonicalzi, M.E., Haince, J.F., Droit, A., and Poirier, G.G. (2005). Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when? **Cell Mol Life Sci** *62*, 739-750.

48 Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., and Cidlowski, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends Cell Biol** *5*, 21-26.

49 Botto, M. (1998). C1q knock-out mice for the study of complement deficiency in autoimmune disease. **Exp Clin Immunogenet** *15*, 231-234.

50 Boule, M.W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I.R. (2004). Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. **J Exp Med** *199*, 1631-1640.

51 Bourre, F., Renault, G., and Sarasin, A. (1987). Sequence effect on alkali-sensitive sites in UV-irradiated SV40 DNA. **Nucleic Acids Res** *15*, 8861-8875.

52 Bowie, A.G., and Fitzgerald, K.A. (2007). RIG-I: tri-ing to discriminate between self and non-self RNA. **Trends Immunol** *28*, 147-150.

53 Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., and Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. **Cell** *15*, 1-14.

54 Brash, D.E., and Haseltine, W.A. (1982). UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. **Nature** *298*, 189-192.

55 Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., and Ponten, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** *88*, 10124-10128.

56 Bryant, C., and Fitzgerald, K.A. (2009). Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. **Trends Cell Biol** *19*, 455-464.

57 Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L*., et al.* (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. **Nat Immunol** *10*, 266-272.

58 Burdon, R.H., Alliangana, D., and Gill, V. (1995). Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells. **Free Radic Res** *23*, 471-486.

59 Burrus, G.R., Briggs, J.A., and Briggs, R.C. (1992). Characterization of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: relationship to interferon-inducible proteins. **J Cell Biochem** *48*, 190-202.

60 Busconi, L., Lau, C.M., Tabor, A.S., Uccellini, M.B., Ruhe, Z., Akira, S., Viglianti, G.A., Rifkin, I.R., and Marshak-Rothstein, A. (2006). DNA and RNA autoantigens as autoadjuvants. **J Endotoxin Res** *12*, 379-384.

61 Byrne, A., and Reen, D.J. (2002). Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. **J Immunol** *168*, 1968-1977.

62 Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutat Res** *424*, 9-21.

63 Cadet, J., Douki, T., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (2001). Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. **Curr Probl Dermatol** *29*, 62-73.

64 Camussi, G., Tetta, C., Segoloni, G., Coda, R., and Vercellone, A. (1982). Localization of neutrophil cationic proteins and loss of anionic charges in glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus glomerulonephritis. **Clin Immunol Immunopathol** *24*, 299-314.

65 Cao, T.M., Wong, R.M., Sheehan, K., Laport, G.G., Stockerl-Goldstein, K.E., Johnston, L.J., Shizuru, J.A., Negrin, R.S., and Lowsky, R. (2005). CD34, CD4, and CD8 cell doses do not influence engraftment, graft-versus-host disease, or survival following myeloablative human leukocyte antigen-identical peripheral blood allografting for hematologic malignancies. **Exp Hematol** *33*, 279-285.

66 Cao, W., Manicassamy, S., Tang, H., Kasturi, S.P., Pirani, A., Murthy, N., and Pulendran, B. (2008). Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. **Nat Immunol** *9*, 1157-1164.

67 Carey, M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. **Cell** *92*, 5-8.

68 Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P.N., and Bowie, A.G. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. **Nat Immunol** *7*, 1074-1081.

69 Casciola-Rosen, L.A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. **J Exp Med** *179*, 1317-1330.

70 Cerutti, P.A. (1994). Oxy-radicals and cancer. **Lancet** *344*, 862-863.

71 Cervera, R., Khamashta, M.A., Font, J., Sebastiani, G.D., Gil, A., Lavilla, P., Domenech, I., Aydintug, A.O., Jedryka-Goral, A., de Ramon, E.*, et al.* (1993). Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. **Medicine (Baltimore)** *72*, 113-124.

72 Chen, Y., Lenert, P., Weeratna, R., McCluskie, M., Wu, T., Davis, H.L., and Krieg, A.M. (2001). Identification of methylated CpG motifs as inhibitors of the immune stimulatory CpG motifs. **Gene Ther** *8*, 1024-1032.

73 Cheong, W.K., Hughes, G.R., Norris, P.G., and Hawk, J.L. (1994). Cutaneous photosensitivity in dermatomyositis. **Br J Dermatol** *131*, 205-208.

74 Chiu, Y.H., Macmillan, J.B., and Chen, Z.J. (2009). RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. **Cell** *138*, 576-591.

75 Choubey, D., and Lengyel, P. (1995). Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein. **J Biol Chem** *270*, 6134-6140.

76 Choubey, D., and Panchanathan, R. (2008). Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus. **Immunol Lett** *119*, 32-41.

77 Choubey, D., Snoddy, J., Chaturvedi, V., Toniato, E., Opdenakker, G., Thakur, A., Samanta, H., Engel, D.A., and Lengyel, P. (1989). Interferons as gene activators. Indications for repeated gene duplication during the evolution of a cluster of interferon-activatable genes on murine chromosome 1. **J Biol Chem** *264*, 17182-17189.

78 Choudhury, R.P., Lee, J.M., and Greaves, D.R. (2005). Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med** *2*, 309-315.

79 Christensen, S.R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Akira, S., and Shlomchik, M.J. (2005). Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. **J Exp Med** *202*, 321-331.

80 Chung, J.H., Kwon, O.S., Eun, H.C., Youn, J.I., Song, Y.W., Kim, J.G., and Cho, K.H. (1998). Apoptosis in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. **Am J Dermatopathol** *20*, 233-241.

81 Clancy, R.M., Neufing, P.J., Zheng, P., O'Mahony, M., Nimmerjahn, F., Gordon, T.P., and Buyon, J.P. (2006). Impaired clearance of apoptotic cardiocytes is linked to anti-SSA/Ro and -SSB/La antibodies in the pathogenesis of congenital heart block. **J Clin Invest** *116*, 2413-2422.

82 Clydesdale, G.J., Dandie, G.W., and Muller, H.K. (2001). Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. **Immunol Cell Biol** *79*, 547-568.

83 Cocca, C., Nunez, M., Gutierrez, A., Martin, G., Cricco, G., Medina, V., Mohamad, N., Rivera, E., and Bergoc, R. (2004). IGF-I in mammary tumorigenesis and diabetes. **Anticancer Res** *24*, 2953-2965.

84 Cohen-Jonathan, E., Toulas, C., Ader, I., Monteil, S., Allal, C., Bonnet, J., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., Daly-Schveitzer, N., and Favre, G. (1999). The farnesyltransferase inhibitor FTI-277 suppresses the 24-kDa FGF2-induced radioresistance in HeLa cells expressing wild-type RAS. **Radiat Res** *152*, 404-411.

85 Collins, L.V., Hajizadeh, S., Holme, E., Jonsson, I.M., and Tarkowski, A. (2004). Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. **J Leukoc Biol** *75*, 995-1000.

86 Collins, T., Lapierre, L.A., Fiers, W., Strominger, J.L., and Pober, J.S. (1986). Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A** *83*, 446-450.

87 Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat Immunol** *5*, 1219-1226.

88 Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell** *124*, 263-266.

89 Cooper, G.S., Dooley, M.A., Treadwell, E.L., St Clair, E.W., Parks, C.G., and Gilkeson, G.S. (1998). Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** *41*, 1714-1724.

90 Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Lott, M.T., and Wallace, D.C. (1992). Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. **Mutat Res** *275*, 169-180.

91 Costa, R.M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H., and Menck, C.F. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie** *85*, 1083-1099.

92 Cotgreave, I.A. (1996). Absorption and metabolic fate of ozone--the molecular basis of ozone-induced toxicity. **Scand J Work Environ Health** *22 Suppl 3*, 15-26.

93 Coulthard, L.R., White, D.E., Jones, D.L., McDermott, M.F., and Burchill, S.A. (2009). p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. **Trends Mol Med** *15*, 369-379.

94 Courtney, P.A., Crockard, A.D., Williamson, K., Irvine, A.E., Kennedy, R.J., and Bell, A.L. (1999). Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. **Ann Rheum Dis** *58*, 309-314.

95 Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brzozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K.K., Krug, A., and Hopfner, K.P. (2008). The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. **Mol Cell** *29*, 169-179.

96 Cunningham, M.L., Krinsky, N.I., Giovanazzi, S.M., and Peak, M.J. (1985). Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. **J Free Radic Biol Med** *1*, 381-385.

97 Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T.H., Fitzgerald, K.A., and Kelliher, M.A. (2005). Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-{kappa}B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. **J Biol Chem** *280*, 36560-36566.

98 D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. **Biochem J** *342 (Pt 2)*, 249-268.

99 Dandie, G.W., Clydesdale, G.J., Jacobs, I., and Muller, H.K. (1998). Effects of UV on the migration and function of epidermal antigen presenting cells. **Mutat Res** *422*, 147-154.

100 Dawson, M.J., and Trapani, J.A. (1995). IFI 16 gene encodes a nuclear protein whose expression is induced by interferons in human myeloid leukaemia cell lines. **J Cell Biochem** *57*, 39-51.

101 Dawson, M.J., and Trapani, J.A. (1996). HIN-200: a novel family of IFN-inducible nuclear proteins expressed in leukocytes. **J Leukoc Biol** *60*, 310-316.

102 de Boer, J., and Hoeijmakers, J.H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis** *21*, 453-460.

103 De Fabo, E.C., and Noonan, F.P. (1983). Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. **J Exp Med** *158*, 84-98.

104 de Gruijl, F.R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. **Eur J Cancer** *35*, 2003-2009.

105 de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. **Mol Cell** *8*, 1129-1135.

106 Decker, P., Singh-Jasuja, H., Haager, S., Kotter, I., and Rammensee, H.G. (2005). Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. **J Immunol** *174*, 3326-3334.

107 Deng, C., Kaplan, M.J., Yang, J., Ray, D., Zhang, Z., McCune, W.J., Hanash, S.M., and Richardson, B.C. (2001). Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. **Arthritis Rheum** *44*, 397-407.

108 Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell** *103*, 351-361.

109 Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. **Proc Natl Acad Sci U S A** *95*, 15623-15628.

110 Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J.A., and Karin, M. (1993). NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. **Science** *261*, 1442-1445.

111 DeYoung, K.L., Ray, M.E., Su, Y.A., Anzick, S.L., Johnstone, R.W., Trapani, J.A., Meltzer, P.S., and Trent, J.M. (1997). Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. **Oncogene** *15*, 453-457.

112 Dianov, G., Bischoff, C., Piotrowski, J., and Bohr, V.A. (1998). Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. **J Biol Chem** *273*, 33811-33816.

113 Diao, F., Li, S., Tian, Y., Zhang, M., Xu, L.G., Zhang, Y., Wang, R.P., Chen, D., Zhai, Z., Zhong, B.*, et al.* (2007). Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A** *104*, 11706-11711.

114 Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. **Science** *303*, 1529-1531.

115 Diebold, S.S., Massacrier, C., Akira, S., Paturel, C., Morel, Y., and Reis e Sousa, C. (2006). Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. **Eur J Immunol** *36*, 3256-3267.

116 Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolff, S.M., Bernheim, H.A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I.S., Palladino, M.A., Jr., and O'Connor, J.V. (1986). Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J Exp Med** *163*, 1433-1450.

117 Dini, L., Lentini, A., Diez, G.D., Rocha, M., Falasca, L., Serafino, L., and Vidal-Vanaclocha, F. (1995). Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. **J Cell Sci** *108 (Pt 3)*, 967-973.

118 Dizdaroglu, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. **Mutat Res** *275*, 331-342.

119 Dizdaroglu, M., Laval, J., and Boiteux, S. (1993). Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. **Biochemistry** *32*, 12105-12111.

120 Dong, L., Ito, S., Ishii, K.J., and Klinman, D.M. (2005). Suppressive oligodeoxynucleotides delay the onset of glomerulonephritis and prolong survival in lupus-prone NZB x NZW mice. **Arthritis Rheum** *52*, 651-658.

121 dos Santos, R.F., Santiago, M.B., Yoshinari, N.H., Rodrigues, C.J., and Cossermelli, W. (1988). [The direct immunofluorescence skin test in systemic lupus erythematosus. Correlation with the clinical stage of the disease, laboratory changes and nephropathy]. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo** *43*, 197-200.

122 Doualla-Bell, F., and Koromilas, A.E. (2001). Induction of PG G/H synthase-2 in bovine myometrial cells by interferon-tau requires the activation of the p38 MAPK pathway. **Endocrinology** *142*, 5107-5115.

123 Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J., and Sage, E. (2003). Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. **Biochemistry** *42*, 9221-9226.

124 Douki, T., Zalizniak, T., and Cadet, J. (1997). Far-UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: sequence effects. **Photochem Photobiol** *66*, 171-179.

125 Drenkard, C., and Alarcon-Segovia, D. (2000). The new prognosis of systemic lupus erythematosus: treatment-free remission and decreased mortality and morbidity. **Isr Med Assoc J** *2*, 382-387.

126 Du, W., and Maniatis, T. (1992). An ATF/CREB binding site is required for virus induction of the human interferon beta gene [corrected]. **Proc Natl Acad Sci U S A** *89*, 2150-2154.

127 Duhl, D.M., Gaczynski, M., Olinski, R., and Briggs, R.C. (1989). Intranuclear distribution of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen in HL-60 cells. **J Cell Physiol** *141*, 148-153.

128 Dunkern, T.R., Fritz, G., and Kaina, B. (2001). Ultraviolet light-induced DNA damage triggers apoptosis in nucleotide excision repair-deficient cells via Bcl-2 decline and caspase-3/-8 activation. **Oncogene** *20*, 6026-6038.

129 Duthie, M.S., Kimber, I., and Norval, M. (1999). The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. **Br J Dermatol** *140*, 995-1009.

130 Eller, M.S., Yaar, M., and Gilchrest, B.A. (1994). DNA damage and melanogenesis. **Nature** *372*, 413-414.

131 Enk, C.D., Sredni, D., Blauvelt, A., and Katz, S.I. (1995). Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. **J Immunol** *154*, 4851-4856.

132 Epe, B. (1996). DNA damage profiles induced by oxidizing agents. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** *127*, 223-249.

133 Epstein, J.H., Tuffanelli, D., and Dubois, E.L. (1965). Light Sensitivity and Lupus Erythematosus. **Arch Dermatol** *91*, 483-485.

134 Everett, M.A., and Olson, R.L. (1965). Response of Cutaneous Lupus Erythematosus to Ultraviolet Light. **J Invest Dermatol** *44*, 133-138.

135 Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest** *101*, 890-898.

136 Feig, D.I., Reid, T.M., and Loeb, L.A. (1994). Reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cancer Res** *54*, 1890s-1894s.

137 Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., and Beer, H.D. (2007). The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. **Curr Biol** *17*, 1140-1145.

138 Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature** *458*, 509-513.

139 Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E.*, et al.* (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis. **Nat Immunol** *11*, 385-393.

140 Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., and Maniatis, T. (2003a). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. **Nat Immunol** *4*, 491-496.

141 Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T.*, et al.* (2001). Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature** *413*, 78-83.

142 Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., and Golenbock, D.T. (2003b). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. **J Exp Med** *198*, 1043-1055.

143 Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L., Hogsett, W.E., and Tingey, D.T. (1988). Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. **Arch Biochem Biophys** *262*, 266-272.

144 Font, J., Cervera, R., Navarro, M., Pallares, L., Lopez-Soto, A., Vivancos, J., and Ingelmo, M. (1992). Systemic lupus erythematosus in men: clinical and immunological characteristics. **Ann Rheum Dis** *51*, 1050-1052.

145 Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev** *227*, 106-128.

146 Fredericksen, B.L., Keller, B.C., Fornek, J., Katze, M.G., and Gale, M., Jr. (2008). Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. **J Virol** *82*, 609-616.

147 Frleta, D., Yu, C.I., Klechevsky, E., Flamar, A.L., Zurawski, G., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2009). Influenza virus and poly(I:C) inhibit MHC class I-restricted presentation of cell-associated antigens derived from infected dead cells captured by human dendritic cells. **J Immunol** *182*, 2766-2776.

148 Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Hammer, J., and Taniguchi, T. (1989). Involvement of a cis-element that binds an H2TF-1/NF kappa B like factor(s) in the virus-induced interferon-beta gene expression. **Nucleic Acids Res** *17*, 3335-3346.

149 Funami, K., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Akazawa, T., Yamamoto, A., and Seya, T. (2004). The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. **Int Immunol** *16*, 1143-1154.

150 Furukawa, F., Kashihara-Sawami, M., Lyons, M.B., and Norris, D.A. (1990). Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. **J Invest Dermatol** *94*, 77-85.

151 Gaipl, U.S., Kuhn, A., Sheriff, A., Munoz, L.E., Franz, S., Voll, R.E., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2006). Clearance of apoptotic cells in human SLE. **Curr Dir Autoimmun** *9*, 173-187.

152 Gaipl, U.S., Munoz, L.E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., Voll, R.E., Winkler, T., Kuhn, A., Kalden, J.*, et al.* (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). **J Autoimmun** *28*, 114-121.

153 Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J Exp Med** *197*, 1107-1117.

154 Garinis, G.A., Jans, J., and van der Horst, G.T. (2006). Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. **Future Oncol** *2*, 191-199.

155 Gays, F., Unnikrishnan, M., Shrestha, S., Fraser, K.P., Brown, A.R., Tristram, C.M., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., and Brooks, C.G. (2000). The mouse tumor cell lines EL4 and RMA display mosaic expression of NK-related and certain other surface molecules and appear to have a common origin. **J Immunol** *164*, 5094-5102.

156 Gensch, K., Gudowius, S., Niehues, T., and Kuhn, A. (2005). [Connective tissue diseases in childhood]. **Hautarzt** *56*, 925-936.

157 Gilkeson, G.S., Bloom, D.D., Pisetsky, D.S., and Clarke, S.H. (1993). Molecular characterization of anti-DNA antibodies induced in normal mice by immunization with bacterial DNA. Differences from spontaneous anti-DNA in the content and location of VH CDR3 arginines. **J Immunol** *151*, 1353-1364.

158 Gilliam, J.N., and Hurd, E.R. (1976). Comparison of circulating T and B lymphocytes in discoid versus systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol Immunopathol** *6*, 149-155.

159 Gilliam, J.N., and Sontheimer, R.D. (1981). Distinctive cutaneous subsets in the spectrum of lupus erythematosus. **J Am Acad Dermatol** *4*, 471-475.

160 Gilmour, J.W., Vestey, J.P., George, S., and Norval, M. (1993). Effect of phototherapy and urocanic acid isomers on natural killer cell function. **J Invest Dermatol** *101*, 169-174.

161 Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R.A., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. **Proc Natl Acad Sci U S A** *103*, 8459-8464.

162 Gladman, D.D. (1996). Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus. **Curr Opin Rheumatol** *8*, 430-437.

163 Goh, K.C., Haque, S.J., and Williams, B.R. (1999). p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. **EMBO J** *18*, 5601-5608.

164 Gohda, J., Matsumura, T., and Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. **J Immunol** *173*, 2913-2917.

165 Gorden, K.B., Gorski, K.S., Gibson, S.J., Kedl, R.M., Kieper, W.C., Qiu, X., Tomai, M.A., Alkan, S.S., and Vasilakos, J.P. (2005). Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. **J Immunol** *174*, 1259-1268.

166 Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell** *111*, 927-930.

167 Goubau, D., Romieu-Mourez, R., Solis, M., Hernandez, E., Mesplede, T., Lin, R., Leaman, D., and Hiscott, J. (2009). Transcriptional re-programming of primary macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7. **Eur J Immunol** *39*, 527-540.

168 Graham, R.R., Kyogoku, C., Sigurdsson, S., Vlasova, I.A., Davies, L.R., Baechler, E.C., Plenge, R.M., Koeuth, T., Ortmann, W.A., Hom, G.*, et al.* (2007). Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. **Proc Natl Acad Sci U S A** *104*, 6758-6763.

169 Green, J.R., Montasser, M., and Woodrow, J.C. (1986). The association of HLA-linked genes with systemic lupus erythematosus. **Ann Hum Genet** *50*, 93-96.

170 Greinert, R., Volkmer, B., Wende, A., Voss, S., and Breitbart, E.W. (2003). [Prevention of skin cancer. Necessity, implementation and success]. **Hautarzt** *54*, 1152-1163.

171 Gribaudo, G., Ravaglia, S., Guandalini, L., Riera, L., Gariglio, M., and Landolfo, S. (1997). Molecular cloning and expression of an interferon-inducible protein encoded by gene 203 from the gene 200 cluster. **Eur J Biochem** *249*, 258-264.

172 Grollman, A.P., and Moriya, M. (1993). Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. **Trends Genet** *9*, 246-249.

173 Groves, R.W., Allen, M.H., Ross, E.L., Barker, J.N., and MacDonald, D.M. (1995). Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. **Br J Dermatol** *132*, 345-352.

174 Gugliesi, F., Mondini, M., Ravera, R., Robotti, A., de Andrea, M., Gribaudo, G., Gariglio, M., and Landolfo, S. (2005). Up-regulation of the interferon-inducible IFI16 gene by oxidative stress triggers p53 transcriptional activity in endothelial cells. **J Leukoc Biol** *77*, 820-829.

175 Guidot, D.M., McCord, J.M., Wright, R.M., and Repine, J.E. (1993). Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient Saccharomyces cerevisiae in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. **J Biol Chem** *268*, 26699-26703.

176 Guiducci, C., Ghirelli, C., Marloie-Provost, M.A., Matray, T., Coffman, R.L., Liu, Y.J., Barrat, F.J., and Soumelis, V. (2008). PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid predendritic cells in response to TLR activation. **J Exp Med** *205*, 315-322.

177 Gutteridge, J.M., Mumby, S., and Lamb, N.J. (1998). Iron binding and autoreduction by citrate: are these involved in signalling by iron regulatory protein-1? **Free Radic Res** *28*, 319-322.

178 Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G.*, et al.* (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature** *439*, 204-207.

179 Hahn, B.H., Grossman, J., Chen, W., and McMahon, M. (2007). The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia. **J Autoimmun** *28*, 69-75.

180 Haimovitz-Friedman, A. (1998). Radiation-induced signal transduction and stress response. **Radiat Res** *150*, S102-108.

181 Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr Rev** *52*, 253-265.

182 Halliwell, B., and Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett** *281*, 9-19.

183 Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. **Mutat Res** *275*, 257-266.

184 Hartmann, G., Battiany, J., Poeck, H., Wagner, M., Kerkmann, M., Lubenow, N., Rothenfusser, S., and Endres, S. (2003). Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol** *33*, 1633-1641.

185 Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature** *410*, 1099-1103.

186 Hazra, T.K., Hill, J.W., Izumi, T., and Mitra, S. (2001). Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** *68*, 193-205.

187 Hazra, T.K., Izumi, T., Maidt, L., Floyd, R.A., and Mitra, S. (1998). The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutation. **Nucleic Acids Res** *26*, 5116-5122.

188 Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S.*, et al.* (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. **Eur J Immunol** *33*, 2987-2997.

189 Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science** *303*, 1526-1529.

190 Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. **Nat Immunol** *3*, 196-200.

191 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.

192 Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. **J Exp Med** *199*, 1641-1650.

193 Henle, E.S., Luo, Y., Gassmann, W., and Linn, S. (1996a). Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family. **J Biol Chem** *271*, 21177-21186.

194 Henle, E.S., Luo, Y., and Linn, S. (1996b). Fe2+, Fe3+, and oxygen react with DNA-derived radicals formed during iron-mediated Fenton reactions. **Biochemistry** *35*, 12212-12219.

195 Herrlich, P., Karin, M., and Weiss, C. (2008). Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. **Mol Cell** *29*, 279-290.

196 Herrmann, M., Voll, R.E., and Kalden, J.R. (2000). Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunol Today** *21*, 424-426.

197 Hewinson, J., Moore, S.F., Glover, C., Watts, A.G., and MacKenzie, A.B. (2008). A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes. **J Immunol** *180*, 8410-8420.

198 Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** *40*, 1725.

199 Hochrein, H., Schlatter, B., O'Keeffe, M., Wagner, C., Schmitz, F., Schiemann, M., Bauer, S., Suter, M., and Wagner, H. (2004). Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A** *101*, 11416-11421.

200 Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S.*, et al.* (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. **Nature** *424*, 743-748.

201 Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature** *411*, 366-374.

202 Holmes, J., Jr., Clark, S., and Modrich, P. (1990). Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and Drosophila melanogaster cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A** *87*, 5837-5841.

203 Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005a). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. **Nature** *434*, 1035-1040.

204 Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W.C., and Taniguchi, T. (2004). Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** *101*, 15416-15421.

205 Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N.*, et al.* (2005b). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature** *434*, 772-777.

206 Hönigsmann, H., and Dubertret, L. (1996). UVA and the skin: round table. **E J of Derm** *3*, 219-238.

207 Horng, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. **Nat Immunol** *2*, 835-841.

208 Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature** *458*, 514-518.

209 Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M.*, et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. **Science** *314*, 994-997.

210 Hornung, V., Guenthner-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A.*, et al.* (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. **Nat Med** *11*, 263-270.

211 Hornung, V., and Latz, E. (2010). Intracellular DNA recognition. **Nat Rev Immunol** *10*, 123-130.

212 Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. **J Immunol** *168*, 4531-4537.

213 Hoshino, K., Sugiyama, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., Saito, M., Hemmi, H., Ohara, O., Akira, S., and Kaisho, T. (2006). IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. **Nature** *440*, 949-953.

214 Huang, J.C., Hsu, D.S., Kazantsev, A., and Sancar, A. (1994). Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. **Proc Natl Acad Sci U S A** *91*, 12213-12217.

215 Huynh, M.L., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. **J Clin Invest** *109*, 41-50.

216 Imlay, J.A., Chin, S.M., and Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science** *240*, 640-642.

217 Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. **Proc R Soc Lond B Biol Sci** *147*, 258-267.

218 Ishii, K.J., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. **Trends Immunol** *27*, 525-532.

219 Ishii, K.J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H.*, et al.* (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. **Nat Immunol** *7*, 40-48.

220 Ishii, K.J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C.*, et al.* (2008). TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. **Nature** *451*, 725-729.

221 Ishii, K.J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L.D., and Klinman, D.M. (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. **J Immunol** *167*, 2602-2607.

222 Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. **Nature** *455*, 674-678.

223 Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. **Nature** *461*, 788-792.

224 Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol** *5*, 987-995.

225 Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** *54 Pt 1*, 1-13.

226 Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol** *20*, 197-216.

227 Jans, J., Schul, W., Sert, Y.G., Rijksen, Y., Rebel, H., Eker, A.P., Nakajima, S., van Steeg, H., de Gruijl, F.R., Yasui, A.*, et al.* (2005). Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene. **Curr Biol** *15*, 105-115.

228 Janssen, E., Tabeta, K., Barnes, M.J., Rutschmann, S., McBride, S., Bahjat, K.S., Schoenberger, S.P., Theofilopoulos, A.N., Beutler, B., and Hoebe, K. (2006). Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. **Immunity** *24*, 787-799.

229 Janssens, S., and Beyaert, R. (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. **Mol Cell** *11*, 293-302.

230 Jeggo, P.A., Hafezparast, M., Thompson, A.F., Broughton, B.C., Kaur, G.P., Zdzienicka, M.Z., and Athwal, R.S. (1992). Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. **Proc Natl Acad Sci U S A** *89*, 6423-6427.

231 Jin, Y., Mailloux, C.M., Gowan, K., Riccardi, S.L., LaBerge, G., Bennett, D.C., Fain, P.R., and Spritz, R.A. (2007). NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. **N Engl J Med** *356*, 1216-1225.

232 Johnson, R.D., and Jasin, M. (2001). Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. **Biochem Soc Trans** *29*, 196-201.

233 Johnstone, R.W., and Trapani, J.A. (1999). Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. **Mol Cell Biol** *19*, 5833-5838.

234 Johnstone, R.W., Wei, W., Greenway, A., and Trapani, J.A. (2000). Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16. **Oncogene** *19*, 6033-6042.

235 Jones, S.A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J Immunol** *175*, 3463-3468.

236 Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. **Nat Immunol** *3*, 499.

237 Kaiser, W.J., Upton, J.W., and Mocarski, E.S. (2008). Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. **J Immunol** *181*, 6427-6434.

238 Kalden, J.R. (1997). Defective phagocytosis of apoptotic cells: possible explanation for the induction of autoantibodies in SLE. **Lupus** *6*, 326-327.

239 Kaneko, K., Smetana-Just, U., Matsui, M., Young, A.R., John, S., Norval, M., and Walker, S.L. (2008). cis-Urocanic acid initiates gene transcription in primary human keratinocytes. **J Immunol** *181*, 217-224.

240 Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Lin, L., Randolph, A., Valerie, K., Pestka, S., and Fisher, P.B. (2004). Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. **Oncogene** *23*, 1789-1800.

241 Kang, K., Hammerberg, C., Meunier, L., and Cooper, K.D. (1994). CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potently produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein. **J Immunol** *153*, 5256-5264.

242 Kao, J.L., Nadji, S., and Taylor, J.S. (1993). Identification and structure determination of a third cyclobutane photodimer of thymidylyl-(3'-->5')-thymidine: the trans-syn-II product. **Chem Res Toxicol** *6*, 561-567.

243 Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat Rev Immunol** *3*, 984-993.

244 Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., and Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. **Immunity** *23*, 165-175.

245 Kasai, H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. **Mutat Res** *387*, 147-163.

246 Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. **J Exp Med** *205*, 1601-1610.

247 Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., *et al.* (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature** *441*, 101-105.

248 Kawagoe, T., Sato, S., Jung, A., Yamamoto, M., Matsui, K., Kato, H., Uematsu, S., Takeuchi, O., and Akira, S. (2007). Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. **J Exp Med** *204*, 1013-1024.

249 Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. **Nat Immunol** *9*, 684-691.

250 Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity** *11*, 115-122.

251 Kawai, T., and Akira, S. (2006a). Innate immune recognition of viral infection. **Nat Immunol** *7*, 131-137.

252 Kawai, T., and Akira, S. (2006b). TLR signaling. **Cell Death Differ** *13*, 816-825.

253 Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. **Semin Immunol** *19*, 24-32.

254 Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S.*, et al.* (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. **Nat Immunol** *5*, 1061-1068.

255 Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. **Nat Immunol** *6*, 981-988.

256 Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Okada, K., Iida, T., and Nagata, S. (2003). Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. **Nat Immunol** *4*, 138-144.

257 Kerr, I.M., Brown, R.E., and Hovanessian, A.G. (1977). Nature of inhibitor of cell-free protein synthesis formed in response to interferon and double-stranded RNA. **Nature** *268*, 540-542.

258 Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** *26*, 239-257.

259 Kim, T.W., Staschke, K., Bulek, K., Yao, J., Peters, K., Oh, K.H., Vandenburg, Y., Xiao, H., Qian, W., Hamilton, T.*, et al.* (2007). A critical role for IRAK4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity. **J Exp Med** *204*, 1025-1036.

260 Kimkong, I., Avihingsanon, Y., and Hirankarn, N. (2009). Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR. **Lupus** *18*, 1066-1072.

261 Kimkong, I., Avihingsanon, Y., and Hirankarn, N. (2010). Association of IFI200 gene polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol** *37*, 1544-1547.

262 Kind, P., and Goerz, G. (1987). [Clinical aspects and differential diagnosis of cutaneous lupus erythematosus]. **Z Hautkr** *62*, 1337-1338, 1341-1332, 1347.

263 Kindl, G., and Raab, W. (1998). Licht und Haut. **Govi Verlag, Frankfurt 4 neubearbeitete Auflage**.

264 Kiss, E., Csipo, I., Cohen, J.H., Reveil, B., Kavai, M., and Szegedi, G. (1996). CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity** *25*, 53-58.

265 Kivisto, K., Punnonen, K., Toppari, J., and Leino, L. (1996). Urocanic acid suppresses the activation of human neutrophils in vitro. **Inflammation** *20*, 451-459.

266 Kleinman, M.E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J.Z., Albuquerque, R.J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y*., et al.* (2008). Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. **Nature** *452*, 591-597.

267 Kochs, G., and Haller, O. (1999). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. **Proc Natl Acad Sci U S A** *96*, 2082-2086.

268 Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J.C., and Luger, T.A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. **J Exp Med** *172*, 1609-1614.

269 Komuro, A., and Horvath, C.M. (2006). RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. **J Virol** *80*, 12332-12342.

270 Kondo, S., and Jimbow, K. (1998). Dose-dependent induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A. **J Cell Physiol** *177*, 493-498.

271 Kondo, S., Kono, T., Sauder, D.N., and McKenzie, R.C. (1993). IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. **J Invest Dermatol** *101*, 690-694.

272 Korb, L.C., and Ahearn, J.M. (1997). C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. **J Immunol** *158*, 4525-4528.

273 Krieg, A.M. (1995). CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? **J Clin Immunol** *15*, 284-292.

274 Krieg, A.M. (1996). An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. **J Lab Clin Med** *128*, 128-133.

275 Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu Rev Immunol** *20*, 709-760.

276 Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D., and Davis, H.L. (1998a). Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. **Proc Natl Acad Sci U S A** *95*, 12631-12636.

277 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.

278 Krieg, A.M., Yi, A.K., Schorr, J., and Davis, H.L. (1998b). The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. **Trends Microbiol** *6*, 23-27.

279 Krueger, J.G., Wolfe, J.T., Nabeya, R.T., Vallat, V.P., Gilleaudeau, P., Heftler, N.S., Austin, L.M., and Gottlieb, A.B. (1995). Successful ultraviolet B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and by selective depletion of intraepidermal T cells. **J Exp Med** *182*, 2057-2068.

280 Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. **Immunity** *21*, 107-119.

281 Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S., and Colonna, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. **Blood** *103*, 1433-1437.

282 Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z.K., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001a). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. **Eur J Immunol** *31*, 2154-2163.

283 Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M.*, et al.* (2001b). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. **Eur J Immunol** *31*, 3026-3037.

284 Krupitza, G., and Cerutti, P. (1989). ADP-ribosylation of ADPR-transferase and topoisomerase I in intact mouse epidermal cells JB6. **Biochemistry** *28*, 2034-2040.

285 Krutmann, J. (2003). [Skin aging]. **Hautarzt** *54*, 803.

286 Kuhn, A., Herrmann, M., Kleber, S., Beckmann-Welle, M., Fehsel, K., Martin-Villalba, A., Lehmann, P., Ruzicka, T., Krammer, P.H., and Kolb-Bachofen, V. (2006). Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation. **Arthritis Rheum** *54*, 939-950.

287 Kuhn, A., and Ruzicka, T. (2004). Classification of cutaneous lupus erythematosus. **In: Kuhn A, ed Cutaneous lupus erythematosus Heidelberg: Springer**, 53-57.

288 Kuhn, A., Sonntag, M., Richter-Hintz, D., Oslislo, C., Megahed, M., Ruzicka, T., and Lehmann, P. (2001). Phototesting in lupus erythematosus tumidus--review of 60 patients. **Photochem Photobiol** *73*, 532-536.

289 Kulms, D., Dussmann, H., Poppelmann, B., Stander, S., Schwarz, A., and Schwarz, T. (2002). Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). **Cell Death Differ** *9*, 598-608.

290 Kulms, D., Poppelmann, B., and Schwarz, T. (2000). Ultraviolet radiation-induced interleukin 6 release in HeLa cells is mediated via membrane events in a DNA damage-independent way. **J Biol Chem** *275*, 15060-15066.

291 Kulms, D., and Schwarz, T. (2002). Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. **Biochem Pharmacol** *64*, 837-841.

292 Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K.J., Takeuchi, O.*, et al.* (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. **J Exp Med** *203*, 1795-1803.

293 Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov** *2*, 717-726.

294 Kupper, T.S., Chua, A.O., Flood, P., McGuire, J., and Gubler, U. (1987). Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. **J Clin Invest** *80*, 430-436.

295 Kurimoto, I., and Streilein, J.W. (1992a). cis-urocanic acid suppression of contact hypersensitivity induction is mediated via tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol** *148*, 3072-3078.

296 Kurimoto, I., and Streilein, J.W. (1992b). Deleterious effects of cis-urocanic acid and UVB radiation on Langerhans cells and on induction of contact hypersensitivity are mediated by tumor necrosis factor-alpha. **J Invest Dermatol** *99*, 69S-70S.

297 Kurz, E.U., and Lees-Miller, S.P. (2004). DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. **DNA Repair (Amst)** *3*, 889-900.

298 Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev** *81*, 807-869.

299 Lahita, R.G. (1992). Overview of lupus erythematosus. **Clin Dermatol** *10*, 389-392.

300 Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (1998). The Ifi 200 genes: an emerging family of IFN-inducible genes. **Biochimie** *80*, 721-728.

301 Lanier, L.L. (1998). NK cell receptors. **Annu Rev Immunol** *16*, 359-393.

302 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.

303 Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M., and Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. **Mol Cell** *14*, 277-287.

304 Le Goff, P., and Saraux, A. (1999). Drug-induced lupus. **Rev Rhum Engl Ed** *66*, 40-45.

305 Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., Alexopoulou, L., Escriou, N., Flavell, R., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2006). Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. **PLoS Pathog** *2*, e53.

306 Lee, J., Chuang, T.H., Redecke, V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D.A., Raz, E., and Cottam, H.B. (2003). Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. **Proc Natl Acad Sci U S A** *100*, 6646-6651.

307 Lefevre, F., Guillomot, M., D'Andrea, S., Battegay, S., and La Bonnardiere, C. (1998). Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family. **Biochimie** *80*, 779-788.

308 Lehmann, A.R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. **Biochimie** *85*, 1101-1111.

309 Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. **Cell** *86*, 973-983.

310 Lenardo, M.J., Fan, C.M., Maniatis, T., and Baltimore, D. (1989). The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. **Cell** *57*, 287-294.

311 Lenert, P., Stunz, L., Yi, A.K., Krieg, A.M., and Ashman, R.F. (2001). CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF-kappaB activation. **Antisense Nucleic Acid Drug Dev** *11*, 247-256.

312 Leonard, W.J., and O'Shea, J.J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. **Annu Rev Immunol** *16*, 293-322.

313 Leuner, K., Pantel, J., Frey, C., Schindowski, K., Schulz, K., Wegat, T., Maurer, K., Eckert, A., and Muller, W.E. (2007). Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease. **J Neural Transm Suppl**, 207-215.

314 Leverkus, M., Yaar, M., and Gilchrest, B.A. (1997). Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. **Exp Cell Res** *232*, 255-262.

315 Lewis, D.A., and Spandau, D.F. (2007). UVB activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes occurs via a unique mechanism. **Arch Dermatol Res** *299*, 93-101.

316 Ley, C.O., and Gali, F.G. (1983). Parkinsonian syndrome after methanol intoxication. **Eur Neurol** *22*, 405-409.

317 Ley, R.D. (1983). Immunological detection of two types of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA. **Cancer Res** *43*, 41-45.

318 Li, J., Uchida, T., Todo, T., and Kitagawa, T. (2006). Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance Raman spectroscopy: Electron transfer from the FAD cofactor to ultraviolet-damaged DNA. **J Biol Chem** *281*, 25551-25559.

319 Li, N., and Karin, M. (1998). Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. **Proc Natl Acad Sci U S A** *95*, 13012-13017.

320 Li, X., Lu, C., Stewart, M., Xu, H., Strong, R.K., Igumenova, T., and Li, P. (2009a). Structural basis of double-stranded RNA recognition by the RIG-I like receptor MDA5. **Arch Biochem Biophys** *488*, 23-33.

321 Li, X., Ranjith-Kumar, C.T., Brooks, M.T., Dharmaiah, S., Herr, A.B., Kao, C., and Li, P. (2009b). The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. **J Biol Chem** *284*, 13881-13891.

322 Li, Y., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D.K., Levy, D.E., Gaestel, M., Nebreda, A.R., Fish, E.N., and Platanias, L.C. (2004). Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling. **J Biol Chem** *279*, 970-979.

323 Lien, E., Sellati, T.J., Yoshimura, A., Flo, T.H., Rawadi, G., Finberg, R.W., Carroll, J.D., Espevik, T., Ingalls, R.R., Radolf, J.D.*, et al.* (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. **J Biol Chem** *274*, 33419-33425.

324 Lippke, J.A., Gordon, L.K., Brash, D.E., and Haseltine, W.A. (1981). Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A** *78*, 3388-3392.

325 Lleo, A., Selmi, C., Invernizzi, P., Podda, M., and Gershwin, M.E. (2008). The consequences of apoptosis in autoimmunity. **J Autoimmun** *31*, 257-262.

326 Lo, H.L., Nakajima, S., Ma, L., Walter, B., Yasui, A., Ethell, D.W., and Owen, L.B. (2005). Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. **BMC Cancer** *5*, 135.

327 Long, E.O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Annu Rev Immunol** *17*, 875-904.

328 Loo, Y.M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M.A., Garcia-Sastre, A., Katze, M.G.*, et al.* (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. **J Virol** *82*, 335-345.

329 Lu, R., Nash, H.M., and Verdine, G.L. (1997). A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. **Curr Biol** *7*, 397-407.

330 Lucas, M., Stuart, L.M., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2003). Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. **J Immunol** *171*, 2610-2615.

331 Ludlow, L.E., Johnstone, R.W., and Clarke, C.J. (2005). The HIN-200 family: more than interferon-inducible genes? **Exp Cell Res** *308*, 1-17.

332 Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell** *120*, 237-248.

333 Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. **J Exp Med** *198*, 513-520.

334 Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proc Natl Acad Sci U S A** *101*, 5598-5603.

335 Ma, L., Chan, K.W., Trendell-Smith, N.J., Wu, A., Tian, L., Lam, A.C., Chan, A.K., Lo, C.K., Chik, S., Ko, K.H.*, et al.* (2005). Systemic autoimmune disease induced by dendritic cells that have captured necrotic but not apoptotic cells in susceptible mouse strains. **Eur J Immunol** *35*, 3364-3375.

336 Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. **Cell** *108*, 781-794.

337 Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr., and Silverman, R.H. (2007). Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. **Nature** *448*, 816-819.

338 Mandron, M., Aries, M.F., Boralevi, F., Martin, H., Charveron, M., Taieb, A., and Davrinche, C. (2008). Age-related differences in sensitivity of peripheral blood monocytes to lipopolysaccharide and Staphylococcus aureus toxin B in atopic dermatitis. **J Invest Dermatol** *128*, 882-889.

339 Marie, I., Svab, J., Robert, N., Galabru, J., and Hovanessian, A.G. (1990). Differential expression and distinct structure of 69- and 100-kDa forms of 2-5A synthetase in human cells treated with interferon. **J Biol Chem** *265*, 18601-18607.

340 Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. **Nat Rev Immunol** *6*, 823-835.

341 Martin, D.A., and Elkon, K.B. (2005). Autoantibodies make a U-turn: the toll hypothesis for autoantibody specificity. **J Exp Med** *202*, 1465-1469.

342 Martin, D.A., and Elkon, K.B. (2006). Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway. **Arthritis Rheum** *54*, 951-962.

343 Martin, M.U., and Wesche, H. (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. **Biochim Biophys Acta** *1592*, 265-280.

344 Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell** *10*, 417-426.

345 Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M.P., Correa, G., Ono, Y., and Goodarzi, H. (2010). Light, including ultraviolet. **J Autoimmun** *34*, J247-257.

346 Mayer, I.A., Verma, A., Grumbach, I.M., Uddin, S., Lekmine, F., Ravandi, F., Majchrzak, B., Fujita, S., Fish, E.N., and Platanias, L.C. (2001). The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells. **J Biol Chem** *276*, 28570-28577.

347 McCartney, S.A., Thackray, L.B., Gitlin, L., Gilfillan, S., Virgin, H.W., and Colonna, M. (2008). MDA-5 recognition of a murine norovirus. **PLoS Pathog** *4*, e1000108.

348 McGoldrick, J.P., Yeh, Y.C., Solomon, M., Essigmann, J.M., and Lu, A.L. (1995). Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein. **Mol Cell Biol** *15*, 989-996.

349 McWhirter, S.M., Fitzgerald, K.A., Rosains, J., Rowe, D.C., Golenbock, D.T., and Maniatis, T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A** *101*, 233-238.

350 Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. **J Clin Invest** *115*, 407-417.

351 Mecocci, P., MacGarvey, U., and Beal, M.F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. **Ann Neurol** *36*, 747-751.

352 Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. **N Engl J Med** *343*, 338-344.

353 Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell** *91*, 295-298.

354 Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science** *296*, 298-300.

355 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Mol Cell** *2*, 253-258.

356 Melchjorsen, J., Jensen, S.B., Malmgaard, L., Rasmussen, S.B., Weber, F., Bowie, A.G., Matikainen, S., and Paludan, S.R. (2005). Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. **J Virol** *79*, 12944-12951.

357 Menck, C.F. (2002). Shining a light on photolyases. **Nat Genet** *32*, 338-339.

358 Meunier, J.R., Sarasin, A., and Marrot, L. (2002). Photogenotoxicity of mammalian cells: a review of the different assays for in vitro testing. **Photochem Photobiol** *75*, 437-447.

359 Meunier, L., Bata-Csorgo, Z., and Cooper, K.D. (1995). In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36+ CD11b+ CD1- macrophage subset by infiltration and proliferation; CD1+ Langerhans-like dendritic antigen-presenting cells are concomitantly depleted. **J Invest Dermatol** *105*, 782-788.

360 Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., and Hovanessian, A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. **Cell** *62*, 379-390.

361 Mevorach, D. (2000). Opsonization of apoptotic cells. Implications for uptake and autoimmunity. **Ann N Y Acad Sci** *926*, 226-235.

362 Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. **Nature** *437*, 1167-1172.

363 Michallet, M.C., Meylan, E., Ermolaeva, M.A., Vazquez, J., Rebsamen, M., Curran, J., Poeck, H., Bscheider, M., Hartmann, G., Konig, M., *et al.* (2008). TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. **Immunity** *28*, 651-661.

364 Mir, A., Porteu, F., Levy, M., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (1988). C3b receptor (CR1) on phagocytic cells from SLE patients: analysis of the defect and familial study. **Clin Exp Immunol** *73*, 461-466.

365 Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. **Cell** *54*, 903-913.

366 Mok, C.C., and Lau, C.S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **J Clin Pathol** *56*, 481-490.

367 Mondini, M., Vidali, M., Airo, P., De Andrea, M., Riboldi, P., Meroni, P.L., Gariglio, M., and Landolfo, S. (2007). Role of the interferon-inducible gene IFI16 in the etiopathogenesis of systemic autoimmune disorders. **Ann N Y Acad Sci** *1110*, 47-56.

368 Moodycliffe, A.M., Bucana, C.D., Kripke, M.L., Norval, M., and Ullrich, S.E. (1996). Differential effects of a monoclonal antibody to cis-urocanic acid on the suppression of delayed and contact hypersensitivity following ultraviolet irradiation. **J Immunol** *157*, 2891-2899.

369 Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. **J Biochem Mol Biol** *40*, 1-6.

370 Nagano, Y., and Kojima, Y. (1954). [Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolets rays]. **C R Seances Soc Biol Fil** *148*, 1700-1702.

371 Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. **Annu Rev Immunol** *23*, 853-875.

372 Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell** *140*, 619-630.

373 Nakao, M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene** *278*, 25-31.

374 Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., and Moroy, T. (2000). Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. **Nat Genet** *25*, 177-181.

375 Nascimento, A.L., and Meneghini, R. (1995). Cells transfected with transferrin receptor cDNA lacking the iron regulatory domain become more sensitive to the DNA-damaging action of oxidative stress. **Carcinogenesis** *16*, 1335-1338.

376 Nelson, W.G., and Kastan, M.B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. **Mol Cell Biol** *14*, 1815-1823.

377 Nickoloff, B.J., Qin, J.Z., Chaturvedi, V., Bacon, P., Panella, J., and Denning, M.F. (2002). Life and death signaling pathways contributing to skin cancer. **J Investig Dermatol Symp Proc** *7*, 27-35.

378 Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S., and Defranco, A.L. (2005). TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. **J Biol Chem** *280*, 37107-37117.

379 Noguchi, M., Iwamori, M., Hirano, T., Kobayashi, S., Hashimoto, H., Hirose, S., and Nagai, Y. (1992). Autoantibodies to T and B cell lines detected in serum samples from patients with systemic lupus erythematosus with lymphopenia and hypocomplementaemia. **Ann Rheum Dis** *51*, 713-716.

380 Norval, M. (2006). The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. **Prog Biophys Mol Biol** *92*, 108-118.

381 O'Connor, M.J., Martin, N.M., and Smith, G.C. (2007). Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. **Oncogene** *26*, 7816-7824.

382 O'Neill, L.A., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol** *7*, 353-364.

383 Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., and Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. **Nature** *439*, 208-211.

384 Ohshima, H., and Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutat Res** *305*, 253-264.

385 Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T., and Nagata, S. (2005). Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. **J Exp Med** *202*, 1333-1339.

386 Olson, R.L., and Everett, M.A. (1975). Epidermal apoptosis: cell deletion by phagocytosis. **J Cutan Pathol** *2*, 53-57.

387 Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., and Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. **Nat Immunol** *4*, 161-167.

388 Oxholm, A., Oxholm, P., Staberg, B., and Bendtzen, K. (1988). Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. **Br J Dermatol** *118*, 369-376.

389 Pablos, J.L., Santiago, B., Galindo, M., Carreira, P.E., Ballestin, C., and Gomez-Reino, J.J. (1999). Keratinocyte apoptosis and p53 expression in cutaneous lupus and dermatomyositis. **J Pathol** *188*, 63-68.

390 Parodi, A., and Rebora, A. (1997). ARA and EADV criteria for classification of systemic lupus erythematosus in patients with cutaneous lupus erythematosus. **Dermatology** *194*, 217-220.

391 Patterson, J.B., and Samuel, C.E. (1995). Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. **Mol Cell Biol** *15*, 5376-5388.

392 Paul, A.V., Peters, J., Mugavero, J., Yin, J., van Boom, J.H., and Wimmer, E. (2003). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. **J Virol** *77*, 891-904.

393 Peak, M.J., Peak, J.G., and Carnes, B.A. (1987). Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. **Photochem Photobiol** *45*, 381-387.

394 Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev** *22*, 153-183.

395 Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E., and Sage, E. (2000). Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. **J Biol Chem** *275*, 26732-26742.

396 Perniok, A., Wedekind, F., Herrmann, M., Specker, C., and Schneider, M. (1998). High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. **Lupus** *7*, 113-118.

397 Perry, A.K., Chow, E.K., Goodnough, J.B., Yeh, W.C., and Cheng, G. (2004). Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. **J Exp Med** *199*, 1651-1658.

398 Picardo, M., Passi, S., Sirianni, M.C., Fiorilli, M., Russo, G.D., Cortesi, E., Barile, G., Breathnach, A.S., and Nazzaro-Porro, M. (1985). Activity of azelaic acid on cultures of lymphoma- and leukemia-derived cell lines, normal resting and stimulated lymphocytes and 3T3 fibroblasts. **Biochem Pharmacol** *34*, 1653-1658.

399 Pichlmair, A., and Reis e Sousa, C. (2007). Innate recognition of viruses. **Immunity** *27*, 370-383.

400 Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. **Science** *314*, 997-1001.

401 Pion, E., Ullmann, G.M., Ame, J.C., Gerard, D., de Murcia, G., and Bombarda, E. (2005). DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. **Biochemistry** *44*, 14670-14681.

402 Pippig, D.A., Hellmuth, J.C., Cui, S., Kirchhofer, A., Lammens, K., Lammens, A., Schmidt, A., Rothenfusser, S., and Hopfner, K.P. (2009). The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. **Nucleic Acids Res** *37*, 2014-2025.

403 Platanias, L.C. (2003). The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. **Pharmacol Ther** *98*, 129-142.

404 Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008). Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host Microbe** *3*, 77-87.

405 Poeck, H., Wagner, M., Battiany, J., Rothenfusser, S., Wellisch, D., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2004). Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. **Blood** *103*, 3058-3064.

406 Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C.*, et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science** *282*, 2085-2088.

407 Pramatarov, K.D. (1998). Drug-induced lupus erythematosus. **Clin Dermatol** *16*, 367-377.

408 Rahman, A., and Isenberg, D.A. (2008). Systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med** *358*, 929-939.

409 Raman, M., Earnest, S., Zhang, K., Zhao, Y., and Cobb, M.H. (2007). TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. **EMBO J** *26*, 2005-2014.

410 Ramsahoye, B.H., Davies, C.S., and Mills, K.I. (1996). DNA methylation: biology and significance. **Blood Rev** *10*, 249-261.

411 Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E.*, et al.* (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. **Nat Immunol** *11*, 395-402.

412 Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **J Photochem Photobiol B** *63*, 88-102.

413 Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H., and Sancar, A. (1997). In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. **Proc Natl Acad Sci U S A** *94*, 9463-9468.

414 Rebsamen, M., Heinz, L.X., Meylan, E., Michallet, M.C., Schroder, K., Hofmann, K., Vazquez, J., Benedict, C.A., and Tschopp, J. (2009). DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. **EMBO Rep** *10*, 916-922.

415 Reefman, E., de Jong, M.C., Kuiper, H., Jonkman, M.F., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Bijl, M. (2006a). Is disturbed clearance of apoptotic keratinocytes responsible for UVB-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythematosus? **Arthritis Res Ther** *8*, R156.

416 Reefman, E., Dijstelbloem, H.M., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Bijl, M. (2003). Fcgamma receptors in the initiation and progression of systemic lupus erythematosus. **Immunol Cell Biol** *81*, 382-389.

417 Reefman, E., Kuiper, H., Jonkman, M.F., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Bijl, M. (2006b). Skin sensitivity to UVB irradiation in systemic lupus erythematosus is not related to the level of apoptosis induction in keratinocytes. **Rheumatology (Oxford)** *45*, 538-544.

418 Reeves, W.H., and Sthoeger, Z.M. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. **J Biol Chem** *264*, 5047-5052.

419 Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. **Semin Immunol** *16*, 27-34.

420 Rezaei, N. (2006). Therapeutic targeting of pattern-recognition receptors. **Int Immunopharmacol** *6*, 863-869.

421 Richardson, B. (1986). Effect of an inhibitor of DNA methylation on T cells. II. 5-Azacytidine induces self-reactivity in antigen-specific T4+ cells. **Hum Immunol** *17*, 456-470.

422 Richardson, B., Scheinbart, L., Strahler, J., Gross, L., Hanash, S., and Johnson, M. (1990). Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** *33*, 1665-1673.

423 Richardson, B.C., Strahler, J.R., Pivirotto, T.S., Quddus, J., Bayliss, G.E., Gross, L.A., O'Rourke, K.S., Powers, D., Hanash, S.M., and Johnson, M.A. (1992). Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** *35*, 647-662.

424 Richter, C. (1992). Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. **Mutat Res** *275*, 249-255.

425 Rider, J.R., Ollier, W.E., Lock, R.J., Brookes, S.T., and Pamphilon, D.H. (1997). Human cytomegalovirus infection and systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol** *15*, 405-409.

426 Rivero, S.J., Diaz-Jouanen, E., and Alarcon-Segovia, D. (1978). Lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Clinical, diagnostic, and prognostic significance. **Arthritis Rheum** *21*, 295-305.

427 Robbins, M., Judge, A., Liang, L., McClintock, K., Yaworski, E., and MacLachlan, I. (2007). 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. **Mol Ther** *15*, 1663-1669.

428 Roberts, R.M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D., and Bixby, J. (1998). The evolution of the type I interferons. **J Interferon Cytokine Res** *18*, 805-816.

429 Roberts, T.L., Idris, A., Dunn, J.A., Kelly, G.M., Burnton, C.M., Hodgson, S., Hardy, L.L., Garceau, V., Sweet, M.J., Ross, I.L.*, et al.* (2009). HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. **Science** *323*, 1057-1060.

430 Robinson, M.J., Sancho, D., Slack, E.C., LeibundGut-Landmann, S., and Reis e Sousa, C. (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. **Nat Immunol** *7*, 1258-1265.

431 Ronnblom, L., Eloranta, M.L., and Alm, G.V. (2006). The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** *54*, 408-420.

432 Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med** *12*, 440-450.

433 Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O., and Grollman, A.P. (1997). Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. **Proc Natl Acad Sci U S A** *94*, 7429-7434.

434 Rosenstein, B.S., and Mitchell, D.L. (1987). Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. **Photochem Photobiol** *45*, 775-780.

435 Roth-Cross, J.K., Bender, S.J., and Weiss, S.R. (2008). Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia. **J Virol** *82*, 9829-9838.

436 Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B.G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K.A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. **J Immunol** *175*, 5260-5268.

437 Routledge, M.N., Wink, D.A., Keefer, L.K., and Dipple, A. (1994). DNA sequence changes induced by two nitric oxide donor drugs in the supF assay. **Chem Res Toxicol** *7*, 628-632.

438 Rozzo, S.J., Allard, J.D., Choubey, D., Vyse, T.J., Izui, S., Peltz, G., and Kotzin, B.L. (2001). Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. **Immunity** *15*, 435-443.

439 Rudd, B.D., Smit, J.J., Flavell, R.A., Alexopoulou, L., Schaller, M.A., Gruber, A., Berlin, A.A., and Lukacs, N.W. (2006). Deletion of TLR3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection. **J Immunol** *176*, 1937-1942.

440 Ruiz-Arguelles, A., Brito, G.J., Reyes-Izquierdo, P., Perez-Romano, B., and Sanchez-Sosa, S. (2007). Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration. **J Autoimmun** *29*, 281-286.

441 Ryals, J., Dierks, P., Ragg, H., and Weissmann, C. (1985). A 46-nucleotide promoter segment from an IFN-alpha gene renders an unrelated promoter inducible by virus. **Cell** *41*, 497-507.

442 Sadler, A.J., and Williams, B.R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. **Nat Rev Immunol** *8*, 559-568.

443 Sage, E. (1993). Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. **Photochem Photobiol** *57*, 163-174.

444 Saha, S.K., Pietras, E.M., He, J.Q., Kang, J.R., Liu, S.Y., Oganesyan, G., Shahangian, A., Zarnegar, B., Shiba, T.L., Wang, Y.*, et al.* (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. **EMBO J** *25*, 3257-3263.

445 Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. **Proc Natl Acad Sci U S A** *104*, 582-587.

446 Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T.*, et al.* (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. **Proc Natl Acad Sci U S A** *106*, 20842-20846.

447 Salunga, T.L., Cui, Z.G., Shimoda, S., Zheng, H.C., Nomoto, K., Kondo, T., Takano, Y., Selmi, C., Alpini, G., Gershwin, M.E.*, et al.* (2007). Oxidative stress-induced apoptosis of bile duct cells in primary biliary cirrhosis. **J Autoimmun** *29*, 78-86.

448 Sanders, C.J., Van Weelden, H., Kazzaz, G.A., Sigurdsson, V., Toonstra, J., and Bruijnzeel-Koomen, C.A. (2003). Photosensitivity in patients with lupus erythematosus: a clinical and photobiological study of 100 patients using a prolonged phototest protocol. **Br J Dermatol** *149*, 131-137.

449 Sano, H., Takai, O., Harata, N., Yoshinaga, K., Kodama-Kamada, I., and Sasaki, T. (1989). Binding properties of human anti-DNA antibodies to cloned human DNA fragments. **Scand J Immunol** *30*, 51-63.

450 Sarafian, T.A., and Bredesen, D.E. (1994). Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? **Free Radic Res** *21*, 1-8.

451 Sarkar, D., Desalle, R., and Fisher, P.B. (2008). Evolution of MDA-5/RIG-I-dependent innate immunity: independent evolution by domain grafting. **Proc Natl Acad Sci U S A** *105*, 17040-17045.

452 Sasai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Fujita, F., Nakanishi, M., and Seya, T. (2005). Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. **J Immunol** *174*, 27-30.

453 Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N.*, et al.* (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. **Immunity** *13*, 539-548.

454 Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol** *171*, 4304-4310.

455 Satoh, M.S., Jones, C.J., Wood, R.D., and Lindahl, T. (1993). DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. **Proc Natl Acad Sci U S A** *90*, 6335-6339.

456 Savarese, E., Chae, O.W., Trowitzsch, S., Weber, G., Kastner, B., Akira, S., Wagner, H., Schmid, R.M., Bauer, S., and Krug, A. (2006). U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. **Blood** *107*, 3229-3234.

457 Scharer, O.D. (2003). Chemistry and biology of DNA repair. **Angew Chem Int Ed Engl** *42*, 2946-2974.

458 Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Schlissel, M.S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. **Annu Rev Immunol** *10*, 359-383.

459 Scheinberg, M.A., and Cathcart, E.S. (1974). B cell and T cell lymphopenia in systemic lupus erythematosus. **Cell Immunol** *12*, 309-314.

460 Scheinfeld, N., and Deleo, V.A. (2004). Photosensitivity in lupus erythematosus. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** *20*, 272-279.

461 Schiller, M., Bekeredjian-Ding, I., Heyder, P., Blank, N., Ho, A.D., and Lorenz, H.M. (2008). Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. **Cell Death Differ** *15*, 183-191.

462 Schindler, C., Levy, D.E., and Decker, T. (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. **J Biol Chem** *282*, 20059-20063.

463 Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G.*, et al.* (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. **Immunity** *31*, 25-34.

464 Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J.C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F.S., Michallet, M.C., Besch, R., Hopfner, K.P.*, et al.* (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. **Proc Natl Acad Sci U S A** *106*, 12067-12072.

465 Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P.A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free Radic Res Commun** *17*, 221-237.

466 Schul, W., Jans, J., Rijksen, Y.M., Klemann, K.H., Eker, A.P., de Wit, J., Nikaido, O., Nakajima, S., Yasui, A., Hoeijmakers, J.H.*, et al.* (2002). Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice. **EMBO J** *21*, 4719-4729.

467 Schwarting, A., Paul, K., Tschirner, S., Menke, J., Hansen, T., Brenner, W., Kelley, V.R., Relle, M., and Galle, P.R. (2005). Interferon-beta: a therapeutic for autoimmune lupus in MRL-Faslpr mice. **J Am Soc Nephrol** *16*, 3264-3272.

468 Schwarz, A., Bhardwaj, R., Aragane, Y., Mahnke, K., Riemann, H., Metze, D., Luger, T.A., and Schwarz, T. (1995). Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. **J Invest Dermatol** *104*, 922-927.

469 Schwarz, T. (1998). Mechanisms of UV-induced immunosuppression. Link between UV-induced tolerance and apoptosis. **Eur J Dermatol** *8*, 196-197.

470 Schwarz, T. (2003). Effekte von ultravioletter Strahlung auf das Immunsystem. **JDDG 2 (Band 1)**, 142-150.

471 Seckmeyer, G., Thiel, S., Blumthaler, M., Fabian, P., Gerber, S., Gugg-Helminger, A., Hader, D.P., Huber, M., Kettner, C., Kohler, U.*, et al.* (1994). Intercomparison of spectral-UV-radiation measurement systems. **Appl Opt** *33*, 7805-7812.

472 Seelig, H.P., Ehrfeld, H., and Renz, M. (1994). Interferon-gamma-inducible protein p16. A new target of antinuclear antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** *37*, 1672-1683.

473 Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., and Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. **Cell** *122*, 669-682.

474 Setlow, R.B., and Carrier, W.L. (1966). Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. **J Mol Biol** *17*, 237-254.

475 Sharma, S., tenOever, B.R., Grandvaux, N., Zhou, G.P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. **Science** *300*, 1148-1151.

476 Shatkin, A.J., and Manley, J.L. (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. **Nat Struct Biol** *7*, 838-842.

477 Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., and Ames, B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proc Natl Acad Sci U S A** *91*, 10771-10778.

478 Shinohara, M.L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M.B., Kobayashi, K.S., Glimcher, L.H., and Cantor, H. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. **Nat Immunol** *7*, 498-506.

479 Shirota, H., Gursel, M., and Klinman, D.M. (2004). Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN-gamma- and IL-12-mediated signaling. **J Immunol** *173*, 5002-5007.

480 Shoshan, Y., Shapira, I., Toubi, E., Frolkis, I., Yaron, M., and Mevorach, D. (2001). Accelerated Fas-mediated apoptosis of monocytes and maturing macrophages from patients with systemic lupus erythematosus: relevance to in vitro impairment of interaction with iC3b-opsonized apoptotic cells. **J Immunol** *167*, 5963-5969.

481 Sigurdsson, S., Nordmark, G., Goring, H.H., Lindroos, K., Wiman, A.C., Sturfelt, G., Jonsen, A., Rantapaa-Dahlqvist, S., Moller, B., Kere, J.*, et al.* (2005). Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. **Am J Hum Genet** *76*, 528-537.

482 Simon, J.C., Mosmann, T., Edelbaum, D., Schopf, E., Bergstresser, P.R., and Cruz, P.D., Jr. (1994). In vivo evidence that ultraviolet B-induced suppression of allergic contact sensitivity is associated with functional inactivation of Th1 cells. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** *10*, 206-211.

483 Sipley, J.D., Menninger, J.C., Hartley, K.O., Ward, D.C., Jackson, S.P., and Anderson, C.W. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. **Proc Natl Acad Sci U S A** *92*, 7515-7519.

484 Smith, G.C., and Jackson, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. **Genes Dev** *13*, 916-934.

485 Smith, G.C.M., and Jackson, S.P. (2003). In: Bradshaw RA, Dennis EA (eds.) Handbook of Cell Signalling. **Elsevier Science: USA** *1*, 557-561.

486 Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., O'Connor, P.M., and Fornace, A.J., Jr. (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. **Oncogene** *10*, 1053-1059.

487 Sontheimer, R.D. (1989). Subacute cutaneous lupus erythematosus: a decade's perspective. **Med Clin North Am** *73*, 1073-1090.

488 Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., and Wagner, H. (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. **Eur J Immunol** *27*, 1671-1679.

489 Spencer, J.M., and Amonette, R.A. (1995). Indoor tanning: risks, benefits, and future trends. **J Am Acad Dermatol** *33*, 288-298.

490 Stacey, K.J., Ross, I.L., and Hume, D.A. (1993). Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages. **Immunol Cell Biol** *71 (Pt 2)*, 75-85.

491 Stacey, K.J., Sweet, M.J., and Hume, D.A. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. **J Immunol** *157*, 2116-2122.

492 Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006a). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. **Immunity** *24*, 93-103.

493 Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006b). Type I interferons in host defense. **Immunity** *25*, 373-381.

494 Stewart, S.A., Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E.Y., An, D.S., Sabatini, D.M., Chen, I.S., Hahn, W.C., Sharp, P.A.*, et al.* (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. **RNA** *9*, 493-501.

495 Stingl, G., Katz, S.I., Shevach, E.M., Rosenthal, A.S., and Green, I. (1978). Analogous functions of macrophages and Langerhans cells in the initiation in the immune response. **J Invest Dermatol** *71*, 59-64.

496 Stocker, R., Bowry, V.W., and Frei, B. (1991). Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. **Proc Natl Acad Sci U S A** *88*, 1646-1650.

497 Strickland, J.E., Greenhalgh, D.A., Koceva-Chyla, A., Hennings, H., Restrepo, C., Balaschak, M., and Yuspa, S.H. (1988). Development of murine epidermal cell lines which contain an activated rasHa oncogene and form papillomas in skin grafts on athymic nude mouse hosts. **Cancer Res** *48*, 165-169.

498 Sun, Q., Sun, L., Liu, H.H., Chen, X., Seth, R.B., Forman, J., and Chen, Z.J. (2006). The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. **Immunity** *24*, 633-642.

499 Swaak, A.J., Nossent, J.C., Bronsveld, W., Van Rooyen, A., Nieuwenhuys, E.J., Theuns, L., and Smeenk, R.J. (1989a). Systemic lupus erythematosus. I. Outcome and survival: Dutch experience with 110 patients studied prospectively. **Ann Rheum Dis** *48*, 447-454.

500 Swaak, A.J., Nossent, J.C., Bronsveld, W., van Rooyen, A., Nieuwenhuys, E.J., Theuns, L., and Smeenk, R.J. (1989b). Systemic lupus erythematosus. II. Observations on the occurrence of exacerbations in the disease course: Dutch experience with 110 patients studied prospectively. **Ann Rheum Dis** *48*, 455-460.

501 Swantek, J.L., Tsen, M.F., Cobb, M.H., and Thomas, J.A. (2000). IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. **J Immunol** *164*, 4301-4306.

502 Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J.*, et al.* (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A** *101*, 3516-3521.

503 Takahashi, K., Kawai, T., Kumar, H., Sato, S., Yonehara, S., and Akira, S. (2006). Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. **J Immunol** *176*, 4520-4524.

504 Takahasi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., Yoneyama, M., Horiuchi, M., Ogura, K., Fujita, T.*, et al.* (2009). Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. **J Biol Chem** *284*, 17465-17474.

505 Takahasi, K., Yoneyama, M., Nishihori, T., Hirai, R., Kumeta, H., Narita, R., Gale, M., Jr., Inagaki, F., and Fujita, T. (2008). Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. **Mol Cell** *29*, 428-440.

506 Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2008). Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. **Adv Drug Deliv Rev** *60*, 847-857.

507 Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K.*, et al.* (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. **Nature** *448*, 501-505.

508 Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). MDA5/RIG-I and virus recognition. **Curr Opin Immunol** *20*, 17-22.

509 Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity** *11*, 443-451.

510 Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. **Int Immunol** *13*, 933-940.

511 Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **J Immunol** *169*, 10-14.

512 Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., and Akira, S. (2000). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. **Int Immunol** *12*, 113-117.

513 Tan, E.M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. **Adv Immunol** *44*, 93-151.

514 Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** *25*, 1271-1277.

515 Tannenbaum, C.S., Major, J., Ohmori, Y., and Hamilton, T.A. (1993). A lipopolysaccharide-inducible macrophage gene (D3) is a new member of an interferon-inducible gene cluster and is selectively expressed in mononuclear phagocytes. **J Leukoc Biol** *53*, 563-568.

516 Tchou, J., and Grollman, A.P. (1993). Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. **Mutat Res** *299*, 277-287.

517 Totter, J.R. (1980). Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A** *77*, 1763-1767.

518 Trapani, J.A., Browne, K.A., Dawson, M.J., Ramsay, R.G., Eddy, R.L., Show, T.B., White, P.C., and Dupont, B. (1992). A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon-gamma in myeloid cells. **Immunogenetics** *36*, 369-376.

519 Trenam, C.W., Blake, D.R., and Morris, C.J. (1992). Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron. **J Invest Dermatol** *99*, 675-682.

520 Triantafilou, K., Orthopoulos, G., Vakakis, E., Ahmed, M.A., Golenbock, D.T., Lepper, P.M., and Triantafilou, M. (2005a). Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. **Cell Microbiol** *7*, 1117-1126.

521 Triantafilou, K., Vakakis, E., Orthopoulos, G., Ahmed, M.A., Schumann, C., Lepper, P.M., and Triantafilou, M. (2005b). TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. **Eur J Immunol** *35*, 2416-2423.

522 Trinchieri, G. (2004). Cytokines and cytokine receptors. **Immunol Rev** *202*, 5-7.

523 Tsai, Y.T., Chiang, B.L., Kao, Y.F., and Hsieh, K.H. (1995). Detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus genome in white blood cells from patients with juvenile rheumatoid arthritis and childhood systemic lupus erythematosus. **Int Arch Allergy Immunol** *106*, 235-240.

524 Tsuchida, T., Zou, J., Saitoh, T., Kumar, H., Abe, T., Matsuura, Y., Kawai, T., and Akira, S. (2010). The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. **Immunity** *33*, 765-776.

525 Uddin, S., Lekmine, F., Sharma, N., Majchrzak, B., Mayer, I., Young, P.R., Bokoch, G.M., Fish, E.N., and Platanias, L.C. (2000). The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. **J Biol Chem** *275*, 27634-27640.

526 Uddin, S., Majchrzak, B., Woodson, J., Arunkumar, P., Alsayed, Y., Pine, R., Young, P.R., Fish, E.N., and Platanias, L.C. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. **J Biol Chem** *274*, 30127-30131.

527 Uematsu, S., and Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. **J Biol Chem** *282*, 15319-15323.

528 Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotani, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T.*, et al.* (2005). Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon-{alpha} induction. **J Exp Med** *201*, 915-923.

529 Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S.*, et al.* (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nat Immunol** *11*, 997-1004.

530 Uze, G., Schreiber, G., Piehler, J., and Pellegrini, S. (2007). The receptor of the type I interferon family. **Curr Top Microbiol Immunol** *316*, 71-95.

531 Vallin, H., Perers, A., Alm, G.V., and Ronnblom, L. (1999). Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. **J Immunol** *163*, 6306-6313.

532 van den Oord, J.J., Vandeghinste, N., De Ley, M., and De Wolf-Peeters, C. (1994). Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. **Am J Pathol** *145*, 294-300.

533 van der Leun, J.C. (2004). The ozone layer. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** *20*, 159-162.

534 van Nieuwenhuijze, A.E., van Lopik, T., Smeenk, R.J., and Aarden, L.A. (2003). Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** *62*, 10-14.

535 Venkataraman, T., Valdes, M., Elsby, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., and Barber, G.N. (2007). Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. **J Immunol** *178*, 6444-6455.

536 Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F., and Klinman, D.M. (2001). Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. **J Immunol** *166*, 2372-2377.

537 Viglianti, G.A., Lau, C.M., Hanley, T.M., Miko, B.A., Shlomchik, M.J., and Marshak-Rothstein, A. (2003). Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. **Immunity** *19*, 837-847.

538 Vink, A.A., Strickland, F.M., Bucana, C., Cox, P.A., Roza, L., Yarosh, D.B., and Kripke, M.L. (1996). Localization of DNA damage and its role in altered antigen-presenting cell function in ultraviolet-irradiated mice. **J Exp Med** *183*, 1491-1500.

539 Vitali, C., Bencivelli, W., Isenberg, D.A., Smolen, J.S., Snaith, M.L., Sciuto, M., Neri, R., and Bombardieri, S. (1992). Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. **Clin Exp Rheumatol** *10*, 541-547.

540 Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. **Mol Cell** *8*, 213-224.

541 Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature** *390*, 350-351.

542 Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S.*, et al.* (2005). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. **J Exp Med** *202*, 1575-1585.

543 Wagner, H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. **Adv Immunol** *73*, 329-368.

544 Wagner, H. (2006). Endogenous TLR ligands and autoimmunity. **Adv Immunol** *91*, 159-173.

545 Wakeland, E.K., Liu, K., Graham, R.R., and Behrens, T.W. (2001). Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Immunity** *15*, 397-408.

546 Walchner, M., Messer, G., and Kind, P. (1997). Phototesting and photoprotection in LE. **Lupus** *6*, 167-174.

547 Walchner, M., Meurer, M., Plewig, G., and Messer, G. (2000). Clinical and immunologic parameters during thalidomide treatment of lupus erythematosus. **Int J Dermatol** *39*, 383-388.

548 Walker, S.L., and Young, A.R. (2007). An action spectrum (290-320 nm) for TNFalpha protein in human skin in vivo suggests that basal-layer epidermal DNA is the chromophore. **Proc Natl Acad Sci U S A** *104*, 19051-19054.

549 Walport, M.J., Davies, K.A., and Botto, M. (1998). C1q and systemic lupus erythematosus. **Immunobiology** *199*, 265-285.

550 Walsh, L.J. (1995). Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumour necrosis factor-alpha. **Immunol Cell Biol** *73*, 226-233.

551 Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature** *412*, 346-351.

552 Wang, J.P., Liu, P., Latz, E., Golenbock, D.T., Finberg, R.W., and Libraty, D.H. (2006). Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. **J Immunol** *177*, 7114-7121.

553 Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E., and Flavell, R.A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nat Med** *10*, 1366-1373.

554 Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature** *171*, 737-738.

555 Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R., and Paludan, S.R. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. **J Virol** *80*, 5059-5064.

556 Weiss, J.M., Renkl, A.C., Denfeld, R.W., de Roche, R., Spitzlei, M., Schopf, E., and Simon, J.C. (1995). Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. **Eur J Immunol** *25*, 2858-2862.

557 Weller, E.M., Hain, J., Jung, T., Kinder, R., Kofferlein, M., Burkart, W., and Nusse, M. (1996). UV-B-induced cell cycle perturbations, micronucleus induction, and modulation by caffeine in human keratinocytes. **Int J Radiat Biol** *69*, 371-384.

558 Wen, Z.K., Xu, W., Xu, L., Cao, Q.H., Wang, Y., Chu, Y.W., and Xiong, S.D. (2007). DNA hypomethylation is crucial for apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in SLE-non-susceptible mice. **Rheumatology (Oxford)** *46*, 1796-1803.

559 Wenzel, J., Tüting, T., and Bieber, T. (2003). Kutane Manifestationen des Lupus erythematodes. **Dtsch Med Wochenschr** *2003*, 1655-1658.

560 Werth, V.P., Zhang, W., Dortzbach, K., and Sullivan, K. (2000). Association of a promoter polymorphism of tumor necrosis factor-alpha with subacute cutaneous lupus erythematosus and distinct photoregulation of transcription. **J Invest Dermatol** *115*, 726-730.

561 Willment, J.A., and Brown, G.D. (2008). C-type lectin receptors in antifungal immunity. **Trends Microbiol** *16*, 27-32.

562 Wiseman, H., and Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem J** *313 (Pt 1)*, 17-29.

563 Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., and Essigmann, J.M. (1990). Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. **Biochemistry** *29*, 7024-7032.

564 Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R.A., McKercher, S.R., and Martin, P. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. **Development** *127*, 5245-5252.

565 Wu, X., and Peng, S.L. (2006). Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. **Arthritis Rheum** *54*, 336-342.

566 Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol** *68*, 251-306.

567 Xu, L.G., Wang, Y.Y., Han, K.J., Li, L.Y., Zhai, Z., and Shu, H.B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. **Mol Cell** *19*, 727-740.

568 Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J.*, et al.* (2006). Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. **Nat Immunol** *7*, 962-970.

569 Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K.*, et al.* (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science** *301*, 640-643.

570 Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T.*, et al.* (2002a). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. **Nature** *420*, 324-329.

571 Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. **Nat Immunol** *4*, 1144-1150.

572 Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002b). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol** *169*, 6668-6672.

573 Yan, H., Dalal, K., Hon, B.K., Youkharibache, P., Lau, D., and Pio, F. (2008). RPA nucleic acid-binding properties of IFI16-HIN200. **Biochim Biophys Acta** *1784*, 1087-1097.

574 Yanai, H., Savitsky, D., Tamura, T., and Taniguchi, T. (2009). Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. **Curr Opin Immunol** *21*, 17-22.

575 Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S.*, et al.* (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. **Science** *308*, 1626-1629.

576 Yasuda, K., Ogawa, Y., Yamane, I., Nishikawa, M., and Takakura, Y. (2005a). Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. **J Leukoc Biol** *77*, 71-79.

577 Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Luppa, 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.

578 Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C.J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H., and Wagner, H. (2005b). Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. **J Immunol** *174*, 6129-6136.

579 Yoneyama, M., and Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. **Immunol Rev** *227*, 54-65.

580 Yoneyama, M., and Fujita, T. (2010). Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. **Rev Med Virol** *20*, 4-22.

581 Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S.*, et al.* (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. **J Immunol** *175*, 2851-2858.

582 Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nat Immunol** *5*, 730-737.

583 Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., and Nagata, S. (2005). Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. **Nat Immunol** *6*, 49-56.

584 Yoshida, R., Takaesu, G., Yoshida, H., Okamoto, F., Yoshioka, T., Choi, Y., Akira, S., Kawai, T., Yoshimura, A., and Kobayashi, T. (2008). TRAF6 and MEKK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. **J Biol Chem** *283*, 36211-36220.

585 Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol** *9*, 47-59.

586 Yung, R.L., Quddus, J., Chrisp, C.E., Johnson, K.J., and Richardson, B.C. (1995). Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo. **J Immunol** *154*, 3025-3035.

587 Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. **Science** *303*, 1522-1526.

588 Zhang, J., Pieper, A., and Snyder, S.H. (1995). Poly(ADP-ribose) synthetase activation: an early indicator of neurotoxic DNA damage. **J Neurochem** *65*, 1411-1414.

589 Zhang, Q.M., Ishikawa, N., Nakahara, T., and Yonei, S. (1998). Escherichia coli MutY protein has a guanine-DNA glycosylase that acts on 7,8-dihydro-8-oxoguanine:guanine mispair to prevent spontaneous G:C-->C:G transversions. **Nucleic Acids Res** *26*, 4669-4675.

590 Zhang, S.Y., Jouanguy, E., Ugolini, S., Smahi, A., Elain, G., Romero, P., Segal, D., Sancho-Shimizu, V., Lorenzo, L., Puel, A.*, et al.* (2007). TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. **Science** *317*, 1522-1527.

591 Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P.*, et al.* (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. **Immunity** *29*, 538-550.

592 Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nat Immunol** *11*, 136-140.

593 Zhu, F.G., Reich, C.F., and Pisetsky, D.S. (2003). Effect of cytofectins on the immune response of murine macrophages to mammalian DNA. **Immunology** *109*, 255-262.

594 Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2007). Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. **J Virol** *81*, 3170-3180.

595 Ziegler, A., Leffell, D.J., Kunala, S., Sharma, H.W., Gailani, M., Simon, J.A., Halperin, A.J., Baden, H.P., Shapiro, P.E., Bale, A.E.*, et al.* (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** *90*, 4216-4220.

596 Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. **Science** *300*, 1542-1548.

5.6 Danksagung

Bei allen, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben und mich während meiner Promotion auf so vielfältige Weise persönlich und inhaltlich unterstützt haben, bedanke ich mich ganz herzlich.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gunther Hartmann bedanken, der es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit am Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie unter seiner Leitung anzufertigen. Für die wohlwollende, wissenschaftliche Förderung sowie die Übernahme des ersten Gutachtens danke ich ihm.

Bei Herrn Prof. Dr. Percy Knolle möchte ich mich herzlich für die Übernahme des zweiten Koreferats bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Winfried Barchet, der mich in allen Belangen meiner Arbeit unterstützte und mich in jeder Phase der Promotion sehr sachkundig und richtungweisend begleitete. Durch seine intensive Betreuung sowie seine vielen guten und hilfreichen Ideen hat er maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Des Weiteren danke ich ihm für das engagierte Korrekturlesen dieses Manuskripts.

Ebenso möchte ich allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung sowie für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre danken. Besonders erwähnen möchte ich Kirsten Kübler, Soheila Riemann, Carola tho Pesch, Volker Böhnert, Malte Stasch und Thomas Zillinger, die mich die meiste Zeit durch alle Höhen und Tiefen des Laboralltags begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Darüber hinaus danke ich dem gesamten KlinChemKlinPharm-Team für die freundschaftlich-kollegiale und fachlich wertvolle Zusammenarbeit. Im Hinblick auf die Anfänge dieses Projektes habe ich vor allem Taner Cavlar zu danken.

Für die sehr nette und überaus hilfreiche Kooperation mit der Dermatologischen Klinik möchte ich mich an dieser Stelle insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Thomas Tüting, Herrn Dr. Jörg Wenzel sowie Frau Dr. Sabine Zahn bedanken.

Herrn Prof. Dr. Veit Hornung sowie Herrn Dr. Andreas Limmer möchte ich für das freundliche Überlassen von transgenen Mäusen danken. Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus gilt mein Dank für die Bereitstellung des großen Repertoires an Inhibitoren.

Ohne den Rückhalt, die Unterstützung und auch die Nachsicht meiner gesamten Familie und Freunde wäre meine Promotion nicht möglich gewesen.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Thomas Wagner für sein uneingeschränktes Verständnis, seinen Zuspruch gerade in Nerven zehrenden Phasen der Dissertation und natürlich seine Liebe. Auch seiner Familie möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen. Max danke ich insbesondere für die endlose Bereitschaft, mich bei guter Laune zu halten.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern Margret und Klaus Gehrke, auf die ich mich stets verlassen konnte und die mich die gesamte Zeit hindurch so liebevoll und bedingungslos unterstützten. Ich danke ihnen aus tiefstem Herzen für alles.

5.7 Lebenslauf

Nadine Gehrke

Persönliche Daten:

- Geburtstag: 04. Februar 1981
- Geburtsort: Koblenz
- Familienstand: ledig
- Religionszugehörigkeit: römisch-katholisch
- Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

- 1987-1991: Grundschule Schillerschule Lahnstein
- 1991-2000: Privates, staatlich anerkanntes Johannesgymnasium Lahnstein
  Schulabschluss: Abitur (Note 1,5)

Hochschulstudium:

- WS2000/01-SS2006: Biologie-Studium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
  Studienabschluss: Diplom (Gesamtnote: gut)

Promotion:

- 2006-2011: Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn und Bearbeitung der vorliegenden Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Gunther Hartmann

Veröffentlichungen:

- Formalin-fixed Staphylococcus aureus particles prevent allergic sensitization in a murine model of type I allergy. Gisch K, Gehrke N, Bros M, Priesmeyer C, Knop J, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Int Arch Allergy Immunol. 2007;144(3):183-96.
- Divergent effects of biolistic gene transfer in a mouse model of allergic airway inflammation. Zindler E, Gehrke N, Luft C, Reuter S, Taube C, Finotto S, Reske-Kunz AB, Sudowe S. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jan;38(1):38-46.
- Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. Kübler K, Gehrke N, Riemann S, Böhnert V, Zillinger T, Hartmann E, Pölcher M, Rudlowski C, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. Cancer Res. 2010 Jul 1;70(13):5293-304.
- Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. Kübler K, Gehrke N, Riemann S, Daßler J, Coch C, Wimmenauer V, Pölcher M, Rudlowski C, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. (Resubmission) EJI.