

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
Forschungsgruppe Immunbiologie
an der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Victoria Kolb-Bachofen

Die Suppression der endothelialen Entzündungsantwort durch CpG-DNA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lisa Zahner

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Fr. Prof. Dr. Victoria Kolb-Bachofen
Korreferent: Hr. Prof. Dr. Colin MacKenzie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Toll like Rezeptoren	1
1.2 TLR9 – Vorkommen und Signaltransduktion	3
1.3 CpG-DNA	4
1.4 Bedeutung von Endothelzellen	6
1.5 Bedeutung von Makrophagen	7
1.6 Klinische Relevanz	8
1.7 Zielsetzung der Arbeit	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Gebrauchsmaterialien	10
2.1.1.1 Geräte.....	10
2.1.1.2 Glaswaren	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.2.1 Chemikalien	11
2.1.2.2 Plastikartikel	12
2.1.3 Kits.....	12
2.1.4 Zellkulturmedien, Zusätze	13
2.1.5 Lösungen und Puffer.....	15
2.2 Methoden	15
2.2.1 Kultur primärer dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen.....	15
2.2.2 Kultur immortalisierter mikrovaskulärer Endothelzellen.....	16
2.2.3 Kultur der Makrophagenzelllinie MonoMac 6.....	16
2.2.4 Kultur der Makrophagenzelllinie THP-1.....	17
2.2.5 Mycoplasmen - PCR.....	17

2.2.6	Einfrieren von Zellen	17
2.2.7	Auftauen von Zellen	17
2.2.8	Aktivieren der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen.....	18
2.2.9	Inkubation der Zellen mit TLR-spezifischen Liganden	18
2.2.9.1	Polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI:C)	18
2.2.9.2	Lipopolysaccharid (LPS)	18
2.2.9.3	Imiquimod.....	18
2.2.9.4	CpG-DNA/Kontroll DNA.....	19
2.2.10	Vitalitätsassay	19
2.2.11	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	20
2.2.11.1	IL-8 Sandwich ELISA	20
2.2.11.2	IL-6 Sandwich ELISA	20
2.2.12	Proteinbestimmung	21
2.2.13	Isolierung und Quantifizierung von RNA	21
2.2.14	Reverse Transkription.....	21
2.2.15	Konventionelle PCR	22
2.2.16	Real Time PCR.....	23
2.2.17	Statistische Methoden.....	24
3	Ergebnisse	26
3.1	Endothelzellen und CpG-DNA D19^{chimäre}	26
3.1.1	CpG-DNA senkt die IL-8 Sekretion in HMEC-1	26
3.1.2	CpG-DNA senkt die IL-6 Sekretion in HMEC-1	27
3.1.3	Wachstumssteigerung von HMEC-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	28
3.1.4	CpG-DNA D19 ^{chimäre} senkt die IL-6 Sekretion in HDMEC	29
3.1.5	CpG-DNA senkt die IFN- β Expression in HMEC-1	30
3.2	Makrophagen und CpG-DNA D19^{chimäre}	33
3.2.1	CpG-DNA D19 ^{chimäre} steigert die IL-8 Sekretion in MM6	33
3.2.2	CpG-DNA D19 ^{chimäre} steigert die IL-8 Sekretion in THP-1	34
3.2.3	CpG-DNA D19 ^{chimäre} steigert die IFN- β Expression in MM6.....	35
3.3	Kontrollen und ihre Wirkung auf die IL-8 Sekretion	38
3.3.1	CpG-DNA D19 ^{PDE}	38
3.3.1.1	HMEC-1.....	38

3.3.1.2	MM6	39
3.3.1.3	THP-1.....	40
3.3.2	Kontrolle DNA ^{PTO}	41
3.3.2.1	HMEC-1.....	41
3.3.2.2	MM6	42
3.3.2.3	THP-1.....	43
3.3.3	Kontroll DNA ^{PDE}	44
3.3.3.1	HMEC-1.....	44
3.3.3.2	THP-1.....	45
4	Diskussion.....	47
4.1	CpG-DNA D19 ^{chimäre} Wirkung auf humane Endothelzellen	48
4.2	CpG-DNA D19 ^{chimäre} Wirkung auf humane Makrophagen	49
4.3	Wirkungen der Kontroll-DNAs	51
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis.....	56
7	Danksagung.....	62
8	Lebenslauf	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Signaltransduktion von TLR9 und CpG-ODNs ist MyD88 abhängig.	4
Abb. 1-2: A: Phosphodiesterbindung, B: Phosphorothioatbindung.	6
Abb. 3-1: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	27
Abb. 3-2: IL-6 Sekretion von aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	28
Abb. 3-3: Relatives Wachstum von ruhenden und aktivierten HMEC-1 in 48 Stunden unter steigenden CpG-DNA D19 ^{chimäre} Konzentrationen.	29
Abb. 3-4: IL-6 Sekretion in von ruhenden und aktivierten HDMEC nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	30
Abb. 3-5: IFN- β Expression von ruhenden und aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	31
Abb. 3-6: Überblick Endothelzellen	32
Abb. 3-7: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten MM6 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	34
Abb. 3-8: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten THP-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	35
Abb. 3-9: IFN- β Expression von ruhenden und aktivierten MM6 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre}	36
Abb. 3-10: Überblick Makrophagen	37
Abb. 3-11: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre} und CpG-DNA D19 ^{PDE}	39
Abb. 3-12: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten MM6 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre} und CpG-DNA D19 ^{PDE}	40
Abb. 3-13: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten THP-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre} und CpG-DNA D19 ^{PDE}	41
Abb. 3-14: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre} und Kontroll DNA ^{PTO}	42
Abb. 3-15: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten MM6 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre} und Kontroll DNA ^{PTO}	43
Abb. 3-16: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten THP-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre} und Kontroll DNA ^{PTO}	44
Abb. 3-17: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19 ^{chimäre} und Kontroll DNA ^{PDE}	45

Abb. 3-18: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten THP-1 nach CpG-DNA
D19^{chimäre} und Kontroll DNA^{PDE} 45

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Überblick über die verschiedenen TLRs und einige ihrer Liganden.	2
Tab. 1-2: CpG-DNA Typen Überblick.	5
Tab. 2-1: Kulturmedien.....	14
Tab. 2-2: Lösungen und Puffer	15
Tab. 2-3: DNA Sequenzen.....	19
Tab. 2-4: Verdünnungen IL-8 ELISA.....	20
Tab. 2-5: Verdünnungen IL-6 ELISA.....	21
Tab. 2-6: Reverse Transkription	22
Tab. 2-7: Konventionelle PCR.....	22
Tab. 2-8: Primer für konventionelle PCR.....	23
Tab. 2-9: Real Time PCR	23
Tab. 2-10: Primer für Real Time PCR.....	24
Tab. 4-1: Übersicht Ergebnisse.....	53

Abkürzungsverzeichnis

AP1	Adapterprotein 1
APC	Antigen präsentierende Zellen
ATF1	Activating Transcription Factor-1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTL	Cytotoxische T-Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EC	Endothelzellen
ECGS/H	Wachstumssupplement für humane Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Endothelialer Wachstumsfaktor
ELISA	Enzymgekoppelter Immunsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum
HDMEC	humane primäre dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HMEC-1	humane immortalisierte mikrovaskuläre Endothelzelllinie
HPRT	Hypoxanthine-guanin phosphoribosyltransferase
HQ-FCS	High Quality fötales Kälberserum
IFN	Interferon
IKK	Komplex: inhibitor of nuclear factor- κ B <i>kinase</i>
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IRAK	IL-1 Rezeptorassoziierte Kinase
JNK	c-JUN N-terminal kinase
LRRs	Leucinreiche Abschnitte
LPS	Lipopolysaccharid
MHC II	Major Histocompatibility Complex
MM6	Mono Mac 6
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NIK	NF- κ B-inducing kinase
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotide

OPI	Zellwachstumssupplement (Oxalacetat, Pyruvat, Insulin)
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDC	plasmacytoide dendritische Zelle
PDE	Phosphodiesterbindungen
polyI:C	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	Pattern Recognition Rezeptoren
PTO	Phosphorothioatbindungen
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
tGPI	Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Glykoprotein
TIR Domäne	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll like Rezeptor
TLRs	Toll like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAM	TRIF-verwandtes Adaptermolekül
TRIF	Toll/IL-1-Rezeptordomäne IFN- β induzierender Adaptor

1 Einleitung

1.1 Toll like Rezeptoren

Das Überleben eines Organismus hängt in großem Maße davon ab, pathogene Keime bereits am Eintritt hindern zu können. Kommt es trotzdem zum Übertritt und der Vermehrung von Keimen in den Körper, so ist es entscheidend, dass diese schnell und effektiv bekämpft werden. Die Zellen, Moleküle und Mechanismen, die diese Aufgabe übernehmen, werden als „Das Immunsystem“ zusammengefasst.

Zu diesem Abwehrsystem gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs). TLRs sind Keimbahn-kodierte Rezeptoren und Teil des angeborenen Immunsystems. Sie gehören zur Gruppe der Muster-Erkennungs-Rezeptoren (Pattern Recognition Rezeptoren, PRRs) und erkennen Pathogen assoziierte molekulare Muster (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs). So werden Strukturen bezeichnet, die ausschließlich in Pathogenen, nicht aber im menschlichen Körper vorkommen. Damit ist es für TLRs möglich körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Endogene Liganden unterstützen die Abwehrreaktion oder erzeugen eine überschießende Abwehr (Autoimmunprozess) (Akira et al., 2006; Kaisho et al., 2006; Takeda et al., 2006).

TLRs kommen in allen Vertebraten vor. Sie wurden ursprünglich in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo sie neben der dorsoventralen Polarität auch für die Abwehr gegen Pilzinfektionen zuständig sind (Moussian et al., 2005). Da TLRs auch in einfachen Lebensformen vorkommen, liegt es nahe an zu nehmen, dass es ein entwicklungs-geschichtlich relativ altes System ist.

Lange Zeit wurde angenommen, dass TLRs aufgrund ihrer speziellen Erkennung körperfremder Strukturen nur auf Immunzellen vorkommen. Mittlerweile sind für viele andere Zellen TLR Expressionen nachgewiesen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass fast jede Zelle diese angeborenen - aber auch spezifisch erkennenden Rezeptoren – exprimiert (Fitzner et al., 2008; Dorn et al., 2006; Liu et al., 2008).

Bis heute sind insgesamt zehn verschiedene humane Toll like Rezeptoren bekannt, die alle unterschiedliche Strukturen oder Moleküle erkennen. TLRs kommen sowohl als Monomere (TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10) wie auch als Heterodimere (TLR1/2, TLR2/6, TLR4/5) vor.

Einige TLRs sind in der Plasmamembran lokalisiert (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) andere befinden sich intrazellulär, vermutlich in der Endosomenmembran (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9).

Die Liganden der bis heute bekannten TLRs sind vielfältig und viralen, bakteriellen, fungiden oder parasitären Ursprungs. Endogene Liganden der TLRs spielen, wie oben bereits erwähnt, als „Gefahr“-Signale und bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die bereits identifizierten humanen TLRs mit einigen ihrer zugehörigen Liganden (PAMPs).

TLRs	Liganden (PAMPs)
TLR1/TLR2	Triacyl-Lipopeptide (bakteriell)
TLR2	tGPI-Mutin, Phospholipomannan, Peptidoglycan, Hämagglutinin Protein, Porine, Lipoarabinomannan
TLR3	lange doppelsträngige DNA, synthetisches Analogon Poly(I:C)
TLR4	Lipopolysaccharid, Glukoinositolphospholipid (Parasiten), Glukoronoxylomannan (Pilze),
TLR5	Flagellin (Bakterien)
TLR2/TLR6	bakterielle Peptidoglykane, Zymosan, tGPI-Mutin
TLR7	kurze einzel- und doppelsträngige RNA, synthetische Guanosinanaloga
TLR8	kurze einzel- und doppelsträngige RNA, synthetische Guanosinanaloga
TLR9	unmethylierte CpG-DNA (Viren und Bakterien)
TLR10	noch unbekannt

Tab. 1-1: Überblick über die verschiedenen TLRs und einige ihrer Liganden.

(Modifiziert nach Akira et al., 2006 und Fitzner et al., 2008.)

TLRs besitzen einen extrazellulären und einen zytosolischen Anteil, damit sind sie sogenannte Transmembranproteine. Extrazellulär bestehen TLRs aus Leucinreichen Abschnitten (LRRs), der zytosolische Anteil besitzt eine hohe Homologie zur IL-1 Rezeptorfamilie. Er wird als Toll/IL-1-Rezeptor Domäne (TIR-Domäne) bezeichnet. Diese TIR-Domäne ermöglicht die Rekrutierung von Adapterproteinen, die ebenfalls eine TIR-Domäne aufweisen (MyD88, TRIF, TRAM). Die Interaktion der beiden TIR-Domänen setzt die TLR-Signalkaskade in Gang, es werden weitere Adapterproteine zum Proteinkomplex rekrutiert. Die genaue Signalkaskade ist bei allen TLRs unter-

schiedlich. Allgemein kann ein MyD88-abhängiger von einem MyD88-unabhängigen Weg unterschieden werden (Heng et al., 2009; Li et al., 2002; Häcker et al., 2000).

Die Bindung eines Liganden an den zugehörigen TLR löst eine Signaltransduktion über verschiedene Adapterproteine aus und endet schließlich in der Sekretion von Interleukinen, und damit in einer Entzündungsreaktion. Letztendlich kommt es darüber auch zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems, das spezifisch auf Erreger reagieren kann.

1.2 TLR9 – Vorkommen und Signaltransduktion

TLR9 gehört zu den intrazellulären Toll like Rezeptoren und liegt in nicht aktivierten Zellen vermutlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) vor. Bei Kontakt von CpG-DNA mit der Zelle kommt es zunächst zur rezeptormediierten endozytotischen Aufnahme von CpG-DNA in die Zelle. Die CpG-DNA befindet sich nun intrazellulär in Endosomen. In noch nicht abschließend gekläarter Weise gelangt TLR9 in die CpG-DNA-haltigen Zellorganellen. Hier bindet CpG-DNA in saurem Milieu direkt an TLR9 (Latz et al., 2004; Ahmad-Nejad et al., 2002). Diese Bindung löst eine Signaltransduktion über das Adapterprotein MyD88 aus (Häcker et al., 2000; Fitzner et al., 2008). Über verschiedene Kinasen und weitere Adapterproteine kommt es letztendlich zur Aktivierung von speziellen Transkriptionsfaktoren, $\text{Nf}\kappa\text{B}$ und zur Expression bestimmter Gene, worauf die Ausschüttung von Zytokinen, sowie eine Aktivierung des Immunsystems folgen (s. Abb. 1-1).

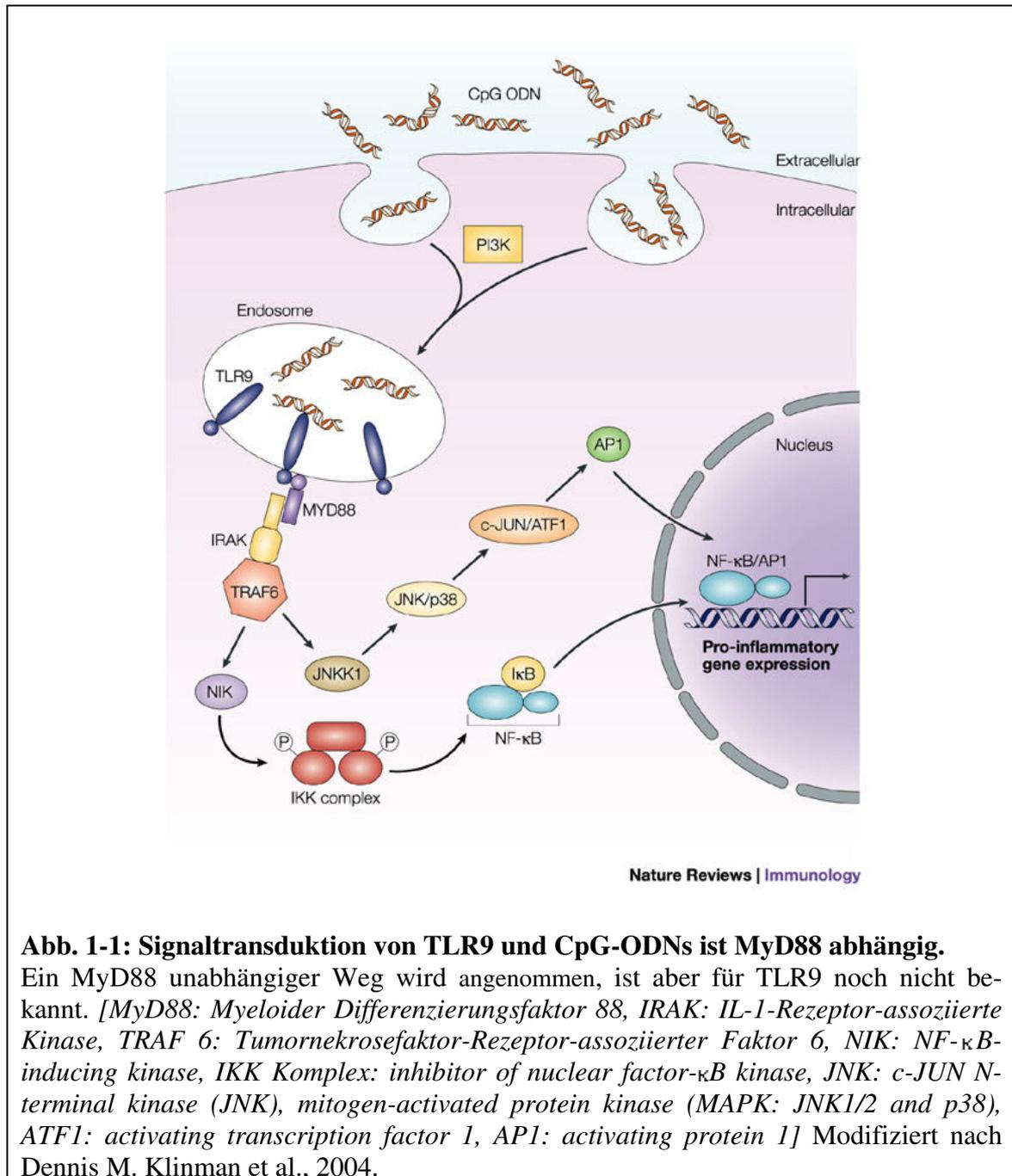


Abb. 1-1: Signaltransduktion von TLR9 und CpG-ODNs ist MyD88 abhängig.

Ein MyD88 unabhängiger Weg wird angenommen, ist aber für TLR9 noch nicht bekannt. [MyD88: Myeloider Differenzierungsfaktor 88, IRAK: IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase, TRAF 6: Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6, NIK: NF- κ B-inducing kinase, IKK Komplex: inhibitor of nuclear factor- κ B kinase, JNK: c-JUN N-terminal kinase (JNK), mitogen-activated protein kinase (MAPK: JNK1/2 and p38), ATF1: activating transcription factor 1, AP1: activating protein 1] Modifiziert nach Dennis M. Klinman et al., 2004.

1.3 CpG-DNA

Bereits 1893/1894 fand Coley heraus, dass ein bestimmter durch Hitze inaktivierbarer Teil von *Streptococcus pyogenes* eine immunologische Reaktion in Krebspatienten auslöste. Es dauerte fast 100 Jahre bis dieser Teil als DNA identifiziert wurde, da die Vorinkubation mit DNase, aber nicht mit RNase, den Effekt aufhebt (Tokunaga et al., 1984). Folgende Studien zeigten einen sequenzspezifischen immunstimulatorischen Effekt von DNA. Krieg et al. wiesen 1995 nach, dass vor Allem DNA-Moleküle mit einem zentralen CpG Motiv und einer dieses umgebenden Palindromsequenz, biolo-

gisch aktiv sind. Dieser Versuch wurde mit künstlich hergestellter DNA, sogenannten Oligodesoxynukleotiden (ODNs) durchgeführt.

Die DNA setzt sich aus insgesamt 4 Basen zusammen: Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin. Statistisch bedeutet diese Tatsache für das CpG-Motiv ein Vorkommen von 1:16. Für bakterielle DNA trifft dies auch zu, bei Vertebraten ist diese Wahrscheinlichkeit allerdings um 1/5 geringer. Ein weiterer bedeutender Unterschied besteht in der Methylierung des Cytosins. Bakteriell ist Cytosin zu einem geringen Anteil methyliert, während das Cytosin bei Vertebraten zum größten Teil methyliert ist (Razin and Friedman, 1981). Eine Methylierung des Cytosins führt zu einer fast vollständigen Zerstörung des immunstimulatorischen Effekts (Krieg et al., 1995). Somit hat bakterielle DNA mit der unmethylierten CpG-DNA ein pathogenassoziiertes Muster (PAMP), das als „Fremd“ über einen PRR, hier den TLR9, erkannt wird.

CpG-DNA lässt sich in 3 Klassen (1) A, (2) B, (3) C unterteilen (s. a. Tab. 1-2)

(1) CpG-DNA Typ A ist charakterisiert durch einen Abschnitt in dem mehrere Guanosine über Thioatbindungen verbunden sind, dem sogenannten Phosphorothioat poly-G. Typ A hat außerdem ein zentrales, über Phosphodiester verbundenes CpG Motiv. CpG-DNA Typ A stimuliert in plasmacytoiden dendritischen Zellen (pDC) viel IFN- α Expression und bewirkt eine eher schwache B-Zellstimulation. Zu dieser Gruppe gehört die in dieser Arbeit untersuchte CpG-DNA D19^{chimäre} (Hartmann und Krieg et al., 2000).

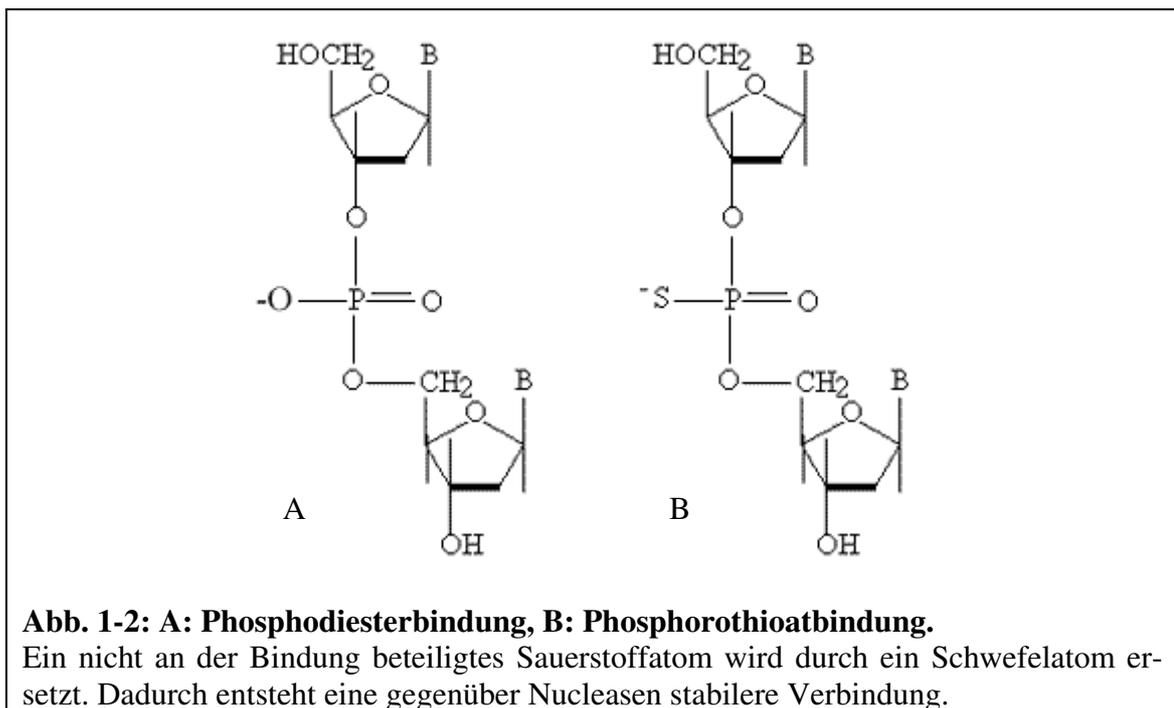
(2) CpG-DNA Typ B ist dadurch gekennzeichnet, dass sie keine Phosphodiesterbindungen, sondern nur Phosphorothioatbindungen besitzt. Typ B bewirkt vor allem eine starke B-Zellstimulation, die Expression von IFN- α durch Aktivierung von pDC's ist vergleichsweise gering (Hartmann und Krieg et al., 2000).

(3) CpG-DNA Typ C zeichnet sich durch ein CpG-Motiv am 5'Ende und eine palindromische Sequenz am 3'Ende aus. Dieser Typ aktiviert etwa zu gleichen Teilen die B-Zellen und die pDC's (Hartmann et al., 2003).

	Typ A	Typ B	Typ C
Charakteristik	PTO poly G zentrales CpG-Motiv	PTO Rückrat	CpG Motiv 5'Ende Palindrom 3'Ende
B-Zellstimulation	schwach	stark	mittel
pDC Aktivierung	stark	schwach	mittel
typ. Vertreter	CpG DNA D19 ^{chimäre}	ODN 2006	ODN 2216

Tab. 1-2: CpG-DNA Typen Überblick.

Die oben bereits erwähnten künstlich hergestellten ODNs enthalten oft zum Schutz vor Abbau durch Nucleasen Phosphorothioatbindungen. Phosphorothioat modifizierte Oligonucleotide sind Verbindungen, bei denen ein nicht an der Brückenbildung beteiligtes Sauerstoffatom der Internucleotidbindung durch Schwefel ersetzt worden ist (Cieslak et al., 2002) (s. Abb. 1-2). In der Natur kommen nur Phosphodiesterbindungen vor. Therapeutisch werden ausschließlich künstlich hergestellte ODNs verwendet, oft mit Phosphorothioatbindungen.



1.4 Bedeutung von Endothelzellen

Endothelzellen sind einschichtige Zellverbände, die alle Gefäße, sowohl Venen wie Arterien, des menschlichen Körpers von innen auskleiden. Sie bilden damit eine interaktive Grenze zwischen dem umgebendem Gewebe und der Blutbahn und gehören bei blutenden Wunden und bei im Blut zirkulierenden Pathogenen zu den ersten Kontaktzellen.

An der Ausbildung der Zeichen einer akuten Entzündung - Rubor, Tumor, Calor, Dolor und Functio laesa - sind die Endothelzellen maßgeblich beteiligt. So kommt es durch proinflammatorische Aktivierung von Endothelzellen mittels Zytokinen zu einer Vergrößerung ihrer Zellzwischenräume und damit zur Exsudation von Flüssigkeit (Tumor) (Ahlqvist et al., 2000). Die Blutviskosität nimmt dadurch zu, der Gefäßdurchmesser erhöht sich, sodass es zu einer Verlangsamung des Blutstroms kommt (Rubor). Die

Leukozyten verweilen durch diese Veränderung länger am Ort der Entzündung. Aktivierte Endothelzellen verfügen über Oberflächenmoleküle, die eine Adhäsion der Leukozyten ermöglichen. Diese direkt eingegangene Verbindung führt zur Migration der Leukozyten über die Zellzwischenräume in das befallene Gewebe (Friedl et al., 2008). Die ersten über diesen Mechanismus einwandernden Zellen sind Granulozyten sowie Monozyten. Der gleichzeitige Verschluss kleiner Kapillaren soll eine systemische Ausbreitung der Pathogene verhindern.

Zugleich erfüllt das Endothel auch spezifischere Aufgaben in der Immunabwehr, indem es an der rezeptormediierten Erkennung von Pathogenen beteiligt ist. Über Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (pathogen recognition receptors, PRRs) an der luminalen Oberfläche, wie beispielsweise den Toll like Rezeptoren, erkennen sie direkt Teile von Bakterien als fremd (Fitzner et al., 2008). Diese direkte Interaktion mit Pathogenen führt zu der Ausschüttung verschiedenster Zytokine, was die Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen zur Folge hat. Damit erfüllt das Endothel nicht nur Barrierefunktionen sondern ist auch direkt an einer potenten Immunabwehr beteiligt.

1.5 Bedeutung von Makrophagen

Makrophagen gehören zu den Leukozyten und entstehen zunächst im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen. Von hier aus werden sie ins Blut als noch unreife Monozyten abgegeben. Durch Einfluss von Zytokinen können Monozyten zu Makrophagen reifen, ihre wesentliche Aufgabe besteht dann in der Erkennung, Phagozytose und Präsentation eingedrungener Pathogene.

Eine Erkennung körperfremder Organismen wird diesen Zellen ebenfalls durch PRRs, z.B. Toll like Rezeptoren, ermöglicht. Auch Makrophagen verfügen über alle zehn bekannten TLRs. Fremdkörper werden erkannt, endozytotisch aufgenommen und von lysosomalen Enzymen zersetzt. Die innerhalb der Makrophagen zerkleinerten Teile von Bakterien, Pilzen oder Viren werden über MHC II Moleküle nach außen präsentiert. So ist die Aktivierung des adaptiven Immunsystems in Form von B- und T-Zellen und damit eine spezifischere Bekämpfung sowie die Ausbildung von Gedächtniszellen möglich. Zusätzlich setzen über Pathogenbindung aktivierte Makrophagen inflammatorische Zytokine frei, die für die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Zellen nötig sind (Medizinische Mikrobiologie, Hof, Dörries, 2005).

Makrophagen kommen, unterschiedlich bezeichnet, in fast allen Geweben des menschlichen Körpers vor. Hier erkennen sie auch körpereigene alte oder zerfallene Zellteile und beseitigen diese.

1.6 Klinische Relevanz

TLR9 Stimulation durch CpG-ODN in Immunzellen hat einen durchweg immunstimulatorischen Effekt, sodass dieser Weg ein interessanter Ansatz zur Therapie von z. B. Allergien, Infektionen und Krebs geworden ist. (Krieg et al., 2006). So befinden sich Ansätze zur Therapie von beispielsweise Asthma bereits in klinischen Studien und zeigen positive Effekte bei der Reduktion der allergischen Symptome (Horner et al., 2001). In Maus Modellen zeigen sich für bestimmte Tumore gute antitumorale Effekte durch CpG-ODN und die dadurch stimulierte Immunantwort (Klinman, 2004).

Alle Therapiemöglichkeiten befinden sich noch in klinischen Studien und somit der Erprobung ihrer tatsächlichen positiven Wirkung.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die direkte Beteiligung von Endothelzellen an der Immunantwort durch Erkennen von Pathogenstrukturen (pathogen associated molecular pattern, PAMPs) via TLRs ist erst seit wenigen Jahren bekannt. Bisher wurde der Signalkaskade, die nach Bindung der pathogenen Strukturen abläuft, vor allem ein immunstimulatorischer Effekt nachgewiesen. In letzter Zeit wurden aber immer mehr Zellen des menschlichen Körpers auf TLR Vorkommen untersucht und eine Bindung bestimmter PAMPs an bestimmten Zellen löste überraschenderweise einen antiinflammatorischen Effekt aus (Dorn et al., 2007; Fitzner et al., 2008). Inkubiert man Endothelzellen *in vitro* mit dem TLR 9 Ligand CpG-DNA so ist eine verminderte Freisetzung von IL-8 sowie eine geringere Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) im Vergleich zu unbehandelten Endothelzellen zu beobachten (Fitzner et al., 2008).

Diese Arbeit beschäftigt sich zum einen damit, ob dieser immunsuppressive Effekt zellspezifisch nur in Nicht-Immunzellen (z. B. Hautzellen) nachweisbar ist. Hierzu wurden als Vergleich unter gleichen Versuchsbedingungen Makrophagen als Vertreter der Immunzellen und ihre Reaktion auf CpG-DNA untersucht.

Zum anderen stellte sich die Frage nach der Sequenzspezifität. Hierfür wurden unter jeweils gleichen Versuchsbedingungen andere DNA Sequenzen – ohne Phosphorothioatbindungen bzw. ohne CpG Motiv – und deren Effekte in Endothelzellen und Makrophagen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gebrauchsmaterialien

2.1.1.1 Geräte

- Autoklav GLA40 (Fa. Fritz Gössner Medizin und Labortechnik, Hamburg, Deutschland)
- ABI Prism HT 7900 Real Time PCR System (Fa. Applied Biosystems, Foster City U.S.A.)
- Brutschränke: Heraeus® Hera Cell® (Fa. Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland), Brutschrank IG150 (Fa. Jouan, Saint Nazaire, Frankreich)
- Bunsenbrenner: Flammy L (Fa. Schütt, Göttingen, Deutschland), Fireboy (Fa. Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz)
- FLUOstar OPTIMA Mikroplatten-Leser (Fa. BMG Labtech, Offenburg, Deutschland)
- Heizblock Biometra TB1 Thermoblock (Fa. Thistle Scientific, Glasgow, England)
- Magnetrührer REQ Ikamak® (Fa. Ika-Werke Staufen, Deutschland)
- Mikroskop: Axiovert200 und Axioplan (Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- Multipette Costar® (Fa. Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande)
- pH Meter digital766 (Fa. Knick, Berlin, Deutschland)
- Ultraschall UP50H (Fa. Dr. Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland)
- Schüttler: Lab Shaker Modell Kühner (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
IKA® VIBRAX VXR basic (Fa. Ika® -Werke Staufen, Deutschland)
- Spannungsgeber für Elektrophoresen Power Pac Basic (Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules, U.S.A.)
- Sterilbank EF5EC, Euroflow (Fa. Clean Air Technik B.V., Woerden, Niederlande)
- Thermocycler Gene Amp PCR-System 9700 (Fa. Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.)
- UV-Lichtplatte Fluouunk (254nm) (Fa. Bachofer, Reutlingen, Deutschland)

- Vortex MS1 Minishake (Fa. Ika[®]-Werke Staufen, Deutschland)
- Waagen: Feinwaage AG285 (Fa. Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Schweiz), Waage Adventurer pro AV412 (Fa. OHAUS[®], Pine Brook, U.S.A.)
- Wasserbad Thermomix[®] RU (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Zellkulturpumpe Laboport[®] (Fa. KNF Neuberger Inc., Fullerton, U.S.A.)
- Zentrifugen: Allegra 6KR (Fa. Beckman Coulter Inc., Trenton, U.S.A.); MiniSpin 5415D (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.1.1.2 Glaswaren

- Bechergläser, Glasflaschen, Messzylinder, Erlmeyer Kolben (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland); Fa. Schott-Duran[®], Wertheim, Deutschland)
- Neubauer Zählkammer (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

2.1.2.1 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol (Fa. Riedel-de Häen, Hannover, Deutschland)
- Agarose, Albumin aus Rinderserum (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
- Alamar Blue (Fa. Invitrogen BioSource[™], Karlsruhe, Deutschland)
- CpG-DNA, Oligonukleotide für die Gene HPRT, Interferon- β (Fa. Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
- Ethanol, Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat Natriumhydroxid, Salzsäure (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethidiumbromid, Triton X-100 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Größenmarker MWM XIV für Agarosegele (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Imiquimod, Poly(I:C) (Fa. Invivogen, San Diego, U.S.A.)
- LAL Reagent Water (Fa. Cambrex BioScience, Walkersville, U.S.A.)
- LPS (*E.coli* O55:B5) (Fa. Sigma, Saint Louis, U.S.A.)
- Nonidet P-40, Schwefelsäure (Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)

- Rekombinantes humanes Interleukin-1 β , humaner Tumornekrosefaktor- α , humanes Interferon- γ (Fa. Strathmann Biotec, Hannover, Deutschland)
- Tris, Tris-HCL (Fa. Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2.2 Plastikartikel

- 96Well-Platten F96 MaxSorp Nunc-Immunoplates (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark)
- 96Well-Platten PS-Microplate 96K, Gewebekulturschalen
12Well/6Well/6cm/10cm, PP-Röhrchen 15ml/50ml, Cellstar 2ml Pipette (Fa. Greiner Bio-One, Essen, Deutschland)
- Absaugpipette 5ml (Fa. BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Cell-Lifter Costar[®] (Fa. Corning Inc., Corning, U.S.A.)
- Injektionsnadel 20 G x 11/2 (Fa. Terumo, Leuven, Belgien)
- Parafilm[®] (American National Can[™], Chicago, U.S.A.)
- Pipetten Costar[®] 5ml/10ml/25ml (Fa. Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande)
- Pipettenspitzen TipOne[®] 10 μ l/200 μ l/1000 μ l (Fa. StarLab GmbH, Ahrensberg, Deutschland)
- Präzisions Dispenser Tips 1,25ml/2,5ml/5ml (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland)
- Reaktionsgefäße Save Lock Tubes 0,5ml/1,5ml/2ml (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Spritzen: Omnifix[®] F Luer 1ml, Injekt 10ml Luer Solo (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Sterilfilter Minisart[®] 0,20 μ m (Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland)

2.1.3 Kits

- DC Protein Assay (Fa. BioRad[®], München, Deutschland)
- Interleukin-8 DuoSet[®] ELISA Development System, H₂O₂/Tetramethylmenzidin (Fa. R&D System, Minneapolis, U.S.A.)
- Interleukin-6 BD OptEIA (Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- QuantiTect Kit, QIAshredder, RNeasy Mini Kit, Taq PCR Core Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland)

- VenorGeM[®] Mycoplasma Detection Kit (Fa. Minerva Biolabs GmbH, Wuhlheide, Deutschland)
- RT PCR Kit

2.1.4 Zellkulturmedien, Zusätze

- Amphotericin B, Gentamycin, ECGM-MV (Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
- FCS, HQ-FCS, Penicillin/ Streptomycin, RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamine, 1% Trypsin/0,3% EDTA, DMEM Low Glucose, Aminosäuren, Pyruvatlösung (Fa. PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- Glutamax[™], MCDB 131 Medium (Fa. GIBCO[®] invitrogen cell culture, Karlsruhe, Deutschland)
- OPI media Supplement: 1 mM Oxalat, 0,45 mM Pyruvat, 0,2 U/ml Insulin (Fa. Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)

MCDB 131* Kulturmedium HMEC-1	
MCDB 131	
+ FCS	10%
+ Glutamax I	1x
+ Amphotericin B	50 ng/ml
+ Gentamycin	50 µg/ml
DMEM* Abstoppen HMEC-1	
DMEM Low Glucose	
+ FCS	10%
+ Amphotericin B	50 ng/ml
+ Gentamycin	50 µg/ml
ECGM-MV* Kulturmedium HDMEC	
ECGM-MV	
+ ECGS/H	0,4%
+ FCS	5%
+ EGF	10 ng/ml
+ Hydrocortison	1µg/ml
+ Amphotericin B	50 ng/ml
+ Gentamycin	50 µg/ml
DMEM** Abstoppen HDMEC	
DMEM Low Glucose	
+ FCS	20%
+ Penicillin/Streptomycin	60 U/ml
RPMI* Kulturmedium MM6	
RPMI 1640	
+ HQ-FCS	10%
+ Glutamax I	1x
+ OPI Media Supplement	5ml
+ Amphotericin B	50 ng/ml
+ Gentamycin	50 µg/ml
RPMI** Kulturmedium THP-1	
RPMI 1640	
+ HQ-FCS	10%
+ Glutamax I	1x
+ Aminosäuren	5 ml
+ Pyruvat	5 ml
+ Amphotericin B	50 ng/ml
+ Gentamycin	50 µg/ml

Tab. 2-1: Kulturmedien

2.1.5 Lösungen und Puffer

PBS (pH 7,4)	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
TAE (pH 8,5)	
Tris-Acetat	40 mM
EDTA · Na ₂	1 mM
Hiscott Puffer (pH 7,4)	
Tris	50 mM
NaCl	150 mM
NP40	1%
EDTA	5 mM
Glycerol	10%

Tab. 2-2: Lösungen und Puffer

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur primärer dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen

Die primären dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) wurden in Endothelial Cell Growth Medium MV supplementiert mit 0,4 % ECGS/H, 5 % FCS, 10 ng/ml EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamycin (ECGM MV^{HDMEC}) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 – 90 % und im proliferierenden Stadium mit PBS/0,02 % EDTA gewaschen und mit 1 % Trypsin/0,3 % EDTA versetzt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das weitere Ablösen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur und unter lichtmikroskopischer Beobachtung. Abgestoppt wurde die Trypsinisierungsreaktion durch Zugabe von DMEM^{StoppA/G}.

Nach anschließender Zentrifugation für 6 min bei 1500 rpm wurde das Pellet in frischem ECGM-MV^{HDMEC} resuspendiert und in einer Dichte von 750 Mio. Zellen pro 10 cm Kulturschale (weitere Subkultivierung) oder in einer Dichte von 30.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte (ELISA) ausgesät. Für die Versuche wurden die Passagen 4 - 11 verwendet.

2.2.2 Kultur immortalisierter mikrovaskulärer Endothelzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten immortalisierten mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1 stammen aus dem Center of Disease Control and Prevention (Atlanta, U.S.A.). Sie wurden in MCDB 131 mit den Zusätzen 10 % FCS, 5ml GlutamaxTM, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamycin (MCDB 131^{HMEC-1}) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Subkultivierung erfolgte im proliferierendem Stadium und einer Konfluenz von 80 – 90 %. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, dann mit 1 % Trypsin/0,3 % EDTA versetzt. Dieser Ansatz wurde für 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die weitere Ablösung der Zellen fand bei RT und unter lichtmikroskopischer Beobachtung statt. Die Trypsinisierungsreaktion wurde durch Zugabe von DMEM^{StoppP/S} abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1500 rpm für 6 min zentrifugiert und in frischem MCDB 131^{HMEC-1} resuspendiert, um dann in einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro 10 cm Kulturschale (weitere Subkultivierung) oder in einer Dichte von 50.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte (ELISA) bzw. 500.000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte (RT-PCR) ausgesät zu werden. Für die Versuche wurden die Passagen 20 - 30 verwendet.

2.2.3 Kultur der Makrophagenzelllinie MonoMac 6

Die Kultivierung der Makrophagenzelllinie MonoMac 6 (MM6) erfolgte als Suspensionskultur in RPMI supplementiert mit 10 % HQ FCS, 5 ml GlutamaxTM, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamycin und 5 ml OPI (RPMI^{MM6}) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen nach einwöchigem Wachstum durch mehrmaliges Resuspendieren ab gespült und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem RPMI^{MM6} aufgenommen und in einer Dichte von ca. 5 Mio. Zellen pro 10 cm Kulturschale (weitere Subkultivierung) oder in einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro Well einer 12-Well-Platte (ELISA) bzw. 2 Mio. Zellen pro Well auf 6-Well-Platte (RT-PCR) ausgesät. Für die Versuche wurden die Passagen 41 - 50 verwendet.

2.2.4 Kultur der Makrophagenzelllinie THP-1

Die Makrophagenzelllinie THP-1 wurden als Suspensionskultur in RPMI supplementiert mit 10 % HQ FCS, 5 ml Glutamax™, 5 ml Aminosäuren, 5 ml Pyruvat, 50 ng/ml Amphotericin B, 50 µg/ml Gentamycin (RPMI^{THP-1}) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Subkultivierung und das Aussäen für die Versuche erfolgten entsprechend den MM6. Es wurden die Passagen 21 - 30 verwendet.

2.2.5 Mycoplasmen - PCR

Die Infektion mit Mycoplasmenbakterien stellt ein Problem in der Zellkultur dar. Sie werden unter anderem von verschiedenen TLRs erkannt und würden Ergebnisse verfälschen, außerdem greifen sie in den zellulären Stoffwechsel ein. Diese Tatsache machte es bei den Versuchen unerlässlich in regelmäßigen Abständen die Kontamination auszuschließen. In ca. 4-wöchigen Abständen wurden die Überstände der Zellkulturen mit dem VenorGeM® Mycoplasma Detection Kit nach Herstellerangaben untersucht.

2.2.6 Einfrieren von Zellen

Um die Zellen längerfristig zu lagern, wurden sowohl die Endothelzellen wie auch die Makrophagenzelllinien eingefroren. Die Endothelzellen wurden wie oben beschrieben trypsinisiert. Bei den Suspensionskulturen entfiel dieser Schritt. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 4 °C kaltem FCS aufgenommen und im Verhältnis 1:2 mit ebenfalls 4 °C kaltem Einfriermedium (20 % DMSO + jeweiliges Medium) gemischt. Die Zellen von je einer Platte wurden in einem Kryoröhrchen schonend im 5100 Cryo 1 °C Freezing Container auf -80 °C abgekühlt. Die anschließende Lagerung erfolgte durchgängig bei -80 °C.

2.2.7 Auftauen von Zellen

Da das DMSO im Einfriermedium zytotoxisch wirkt, wurden die Zellen zügig im 37 °C warmen Wasserbad angetaut und in 10 ml 4 °C kaltem entsprechendem Zellkulturmedium gewaschen. Diese Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 rpm (MM6/THP-1) bzw. 6 min bei 1500 rpm (HMEC-1/HDMEC) zentrifugiert, danach konnte das Pellet in 10 ml frischem Medium gelöst werden. Anschließend wurden die Zellen auf 10 cm Kulturschalen (Ein Kryoröhrchen pro Schale) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.8 Aktivieren der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen

Um die Zellen zu aktivieren, wurden die drei folgenden Zytokine mit je 1000 U/ml verwendet: humanes rekombinantes IL-1 β , humanes rekombinantes TNF- α sowie humanes rekombinantes IFN- γ . Die Zellen wurden – unabhängig vom jeweiligen Zelltyp – für jeweils 24 Stunden mit dem Zytokinmix inkubiert.

2.2.9 Inkubation der Zellen mit TLR-spezifischen Liganden

Vor der Inkubation mit verschiedenen TLR-Liganden wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen.

Die lyophilisierten Liganden wurden nach Herstellerangaben in LAL-Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung gelöst und für die Zielkonzentration im jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt.

2.2.9.1 Polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI:C)

Um 2,5 mg lyophilisiertes Poly(I:C) zu lösen, wurde es zunächst mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt, dann auf 50 °C erhitzt, was die dimerisierten Einzelstränge trennt, und nach kurzem Mischen bei RT abgekühlt. Diese Lösung wurde bei –20 °C eingefroren und maximal zweimal aufgetaut. In den Versuchen wurde eine Konzentration von 50 μ g/ml verwendet.

2.2.9.2 Lipopolysaccharid (LPS)

Zunächst wurde aus LPS (*Escherichia coli* O55:B5, Stammlösung 10 mg/ml, Lagerung bei 4 °C) eine Vorverdünnung in LAL-Wasser (1:100) hergestellt. Um die Mizellenbildung von LPS aufzuheben, die den Endotoxin-Anteil isoliert, wurde diese Vorverdünnung dreimal 10 sec mit Ultraschall behandelt und anschließend auf Eis gekühlt. Die Zielkonzentration im Medium betrug 10 ng/ml.

2.2.9.3 Imiquimod

Imiquimod [(1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo [4,5-C]quinolin-4-amin)] wurde in LAL-Wasser zu einer Stammlösung von 2,08 mM gelöst, aliquotiert und bei –20 °C eingefroren. Für die Versuche wurde die Stocklösung maximal dreimal aufgetaut und auf 10 μ M verdünnt.

2.2.9.4 CpG-DNA/Kontroll DNA

Die lyophilisierte DNA wurde zunächst in LAL Wasser zu einer Konzentration von 1000 μM gelöst und bei -20°C eingefroren. Diese Stocklösung wurde ebenfalls maximal dreimal aufgetaut und für die Versuche auf Zielkonzentrationen zwischen 1 und 10 μM verdünnt.

Folgende DNA Sequenzen wurden verwendet:

DNA	Sequenz
CpG-DNA D19 ^{chimäre}	5'- ggTGCATCGATGCAGgggggG-3'
CpG-DNA D19 ^{PDE}	5'- GGTGCATCGATGCAGGGGGG-3'
Kontrolle ^{PTO}	5'- actactacatagactac -3'
Kontrolle ^{PDE}	5'- ACTACTACATAGACTAC -3'

Tab. 2-3: DNA Sequenzen

In den Sequenzen zeigen die Großbuchstabe Phosphodiester Bindungen, die Kleinbuchstaben Phosphorothioat Bindungen an. (Hartmann und Krieg et al., 2000, Hartmann et al., 2003)

Die Inkubation erfolgte für 6, 24 oder 48 Stunden je nach Zelltyp und Readout bei 37°C und 5 % CO_2 .

Für 6 Stunden wurden HMEC-1 zum IL-8 Nachweis inkubiert (Fitzner et al., 2008). IL-6 wurde nach 48 Stunden Inkubation nachgewiesen. Dieser Zeitraum beruht auf eigenen Zeitreihenversuchen, die hier den besten Effekt zeigten. Für die übrigen Zellen und Readouts wurde die Inkubation für 24 Stunden durchgeführt, was ebenfalls mit eigenen Zeitreihenversuchen überprüft wurde.

2.2.10 Vitalitätsassay

Um die relative Zellzahl 48 Stunden nach Inkubation mit CpG-DNA D19^{chimäre} zu bestimmen, wurde der Vitalitätsassay durchgeführt. Die Zellen wurden dabei mit einer Mischung aus Alamar Blue und Medium im Verhältnis 1:20 für 2 ½ Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. In dieser Zeit wurde der Farbstoff von den Zellen in einen Fluoreszenzmarker umgesetzt. Danach wurden 50 μl Überstand auf eine schwarze ELISA Platte pipettiert und die Fluoreszenz bei 590 nm im Mikroplatten-Lesegerät bestimmt. Die gemessene Fluoreszenz weist eine lineare Korrelation mit der Zellzahl auf. Die Zellen konnten nach der Behandlung und zweimaligem Waschen mit PBS normal weiterkultiviert werden.

2.2.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.2.11.1 IL-8 Sandwich ELISA

IL-8 wurde in den Zellkulturüberständen mit dem DuoSet® ELISA Development System (Fa. R&D System) nachgewiesen. Der ELISA erfolgte in Maxisorb Immunoplaten nach Herstellerangaben. Die H_2O_2 /Tetramethylbenzidin-Substratlösung wurde allerdings schon nach 5 min mit 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die optische Farbdichte wurde im Mikroplatten-Lesegerät bei 450 nm gemessen. Die Gegenmessung der Platte erfolgte bei 540 nm, dieser Wert wurde anschließend von der Messung der optischen Farbdichte abgezogen.

Als Proben wurden die Zellkulturüberstände von folgenden Zelltypen und ihren Verdünnungen eingesetzt:

Zelltypen	Verdünnungen	
	ruhend	aktiviert
HMEC-1	unverdünnt	1:5
MM6	unverdünnt	1:5
THP-1	unverdünnt	1:2

Tab. 2-4: Verdünnungen IL-8 ELISA

Bei der Ergebnisberechnung wurden, sofern Verdünnungen benötigt wurden diese wieder herausgerechnet.

2.2.11.2 IL-6 Sandwich ELISA

Der IL-6 ELISA wurde mit dem Kit von BD OptEIA (Fa. BD Biosciences) ebenfalls in Maxisorb Immunoplaten durchgeführt. Im Prinzip wurde nach Herstellerangaben vorgefahren, allerdings mit jeweils der Hälfte der angegebenen Volumina. Die Substratreaktion wurde nach 15 min abgestoppt. Die optische Farbdichte wurde ebenfalls im Mikroplatten-Lesegerät bei 450 nm bestimmt.

Als Proben wurden die Zellkulturüberstände von folgenden Zelltypen und ihren Verdünnungen eingesetzt:

Zelltypen	Verdünnungen	
	ruhend	aktiviert
HMEC-1	nicht messbar	1:5
HDMEC	keine	1:100

Tab. 2-5: Verdünnungen IL-6 ELISA

Bei der Ergebnisberechnung wurden, sofern Verdünnungen benötigt wurden, diese wieder herausgerechnet.

2.2.12 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten mit dem DC Protein Assay (Fa. BioRad®). Dieses Kit ist ein modifizierter Lowry Assay, erlaubt die Anwesenheit von Detergenzien und ist im Vergleich zu anderen Proteinbestimmungen zeitoptimiert. Die photometrische Messung erfolgte im Mikroplatten-Lesegerät bei 650 nm.

Um die in den ELISAs gemessenen Interleukin-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen auf Protein normieren zu können, wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen, um FCS Reste aus dem Medium zu entfernen und dann mit Lysepuffer lysiert. Für HMEC-1 und HDMEC wurden 50 µl Lysepuffer pro Well, für MM6 und THP-1 100 µl pro Well einer 12-Well-Platte verwendet. Bis zur Proteinbestimmung wurden die Lysate bei -80 °C gelagert.

2.2.13 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Zur Isolierung der RNA aus den Zellen wurde das RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur Zellyse wurden 400 µl Lysepuffer (RLT + Mercapto Ethanol im Verhältnis 1:100) pro Well einer 6-Well-Platte verwendet.

Die Quantifizierung der Nukleotide erfolgte im Photometer, indem die Absorption der Proben bestimmt wurde. Eine Absorption von 1 OD bei 260 nm entspricht dabei 40 µg/ml RNA. Der Quotient aus Nukleinabsorption bei 260 nm und Proteinabsorption bei 280 nm stellt dabei die Verunreinigung der Probe mit Protein dar und sollte zwischen 1,7 und 2,1 liegen.

2.2.14 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das QuantiTect Kit von Qiagen verwendet.

Mit Ausnahme der Zwischeninkubation von 5 min bei 42 °C finden alle Schritte auf Eis statt.

Material	Konzentrationen	Zwischeninkubation
RNA	1 µg	5 min bei 42°C
gDNA Wicout Buffer	2µl	
H2O	ad 14µl	
danach je Probe:		
Reverse Transkriptase	1µl	
RT Buffer	5µl	
RT Primer Mix	1µl	

Tab. 2-6: Reverse Transkription

Die Proben wurden anschließend im Thermocycler GeneAmp PCR-System 9700 30 min auf 42 °C erhitzt, danach 5 min auf 95 °C gehalten und dann auf 4 °C abgekühlt. Entweder wurden sie direkt in der PCR verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.2.15 Konventionelle PCR

Die PCR wurde mit dem Taq PCR Core Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Amplifiziert wurde im Thermocycler GeneAmp PCR-System 9700:

Material	Konzentrationen
cDNA	0,005 µg
10x PCR Puffer	1x
dNTPs [10 mM pro dNTP]	0,2 mM
Primer sense [20pM]	0,4 pM
Primer antisense [20pM]	0,4 pM
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,025 U
H2O	ad 50 µl

Tab. 2-7: Konventionelle PCR

Die PCR diente zum Nachweis, dass TLR9 bzw. IFN-β von den verwendeten Zellen überhaupt exprimiert wird. Die Zykluszahlen sind relativ hoch gewählt, um das Gen sicher nachzuweisen. HPRT diente als „Housekeeping-Gen“. Die Oligonukleotidsequenzen, die optimalen PCR Bedingungen sowie die entsprechenden Fragmentgrößen für die jeweiligen Gene wurden wie folgt gewählt:

TLR9	
Sense Primer	5'-GACCTCGAGTGTGAAGCATC-3'
Antisense Primer	5'-AGTTCCACTTGAGGTTGAGATG-3'
PCR Bedingungen	94 °C/30 sec., 55 °C/30 sec., 72 °C/30 sec., 40 Zyklen
Fragmentgröße	350 Basenpaare

IFN-beta	
Sense Primer	5'-GAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGC-3'
Antisense Primer	5'-GTTCTTAGGATTTCCACTCTGACTATGGTCC-3'
PCR Bedingungen	94 °C/20 sec., 60 °C/30 sec., 72 °C/30 sec., 40 Zyklen
Fragmentgröße	350 Basenpaare

HPRT	
Sense Primer	5'-GCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'
Antisense Primer	5'-CTTAGGCTTTGTATTTGGCTTTTC-3'
PCR Bedingungen	94 °C/30 sec., 55 °C/30 sec., 72 °C/30 sec., 25 Zyklen
Fragmentgröße	350 Basenpaare

Tab. 2-8: Primer für konventionelle PCR

2.2.16 Real Time PCR

Die Real Time PCR erfolgte mit dem Power Sybr PCR Master Mix im Abi Prism 7900HT Sequence Detection System. Detektiert wurde humanes IFN- β sowie das „Housekeeping“-Gen 18S.

Das folgende Pipettierschema wurde für alle Versuche verwendet, die Messung der Proben erfolgte als Triplets.

Material	Endkonzentration	
	IFN-beta	18s
cDNA	100ng	1ng
Sybr Green Master Mix [2x]	1x	1x
Primer sense [10 μ M]	300 nM	100 nM
Primer antisense [10 μ M]	300 nM	100 nM

Tab. 2-9: Real Time PCR

Folgende Primer wurden verwendet:

IFN-beta	
Sense Primer	5'-GAGCTACAACCTTGCTTGGATTCC-3'
Antisense Primer	5'-CAAGCCTCCCATTCAATTGC-3'
PCR Bedingungen	1x 95°C/15 min und 40x 95°C/15 sec., 60°C/30 sec, 72°C/30 sec
Zyklen	40
Fragmentgröße	83 Basenpaare

18S	
Sense Primer	5'-CATGGTGACCACGGGTGAC-3'
Antisense Primer	5'-TTCCTTGGATGTGGTAGCCG-3'
PCR Bedingungen	1x 95°C/15 Min. und 40x 95°C/15 Sek., 60°C/30 Sek., 72°C/30 Sek.
Zyklen	40
Fragmentgröße	79 Basenpaare

Tab. 2-10: Primer für Real Time PCR

Die eingesetzte Oligonukleotidsequenz für den IFN- β Nachweis aus Reimer et al., 2007 und auch die Primer für 18S wurden bei NCBI Blast sowie anhand der Dissoziationskurven überprüft.

Zur Berechnung der relativen IFN- β Menge wurde folgendermaßen vorgegangen: Die ermittelten C_T Werte für die unterschiedlichen CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentrationen wurden jeweils von den C_T Werten der nicht mit DNA behandelten Kontrollen abgezogen. Anschließend wurde der Quotient $2^{\text{IFN-}\beta \text{ CT Differenz}}/1,89^{18s \text{ CT Wert}}$ gebildet. Die Werte ohne CpG-DNA Behandlung wurden jeweils bei den ruhenden und voraktivierten Zellen auf 1 normiert, davon ausgehend wurde die prozentuale Expression der mRNA für das Zielgen IFN- β bei den verschiedenen Konzentrationen berechnet.

2.2.17 Statistische Methoden

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Alle Experimente wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt (n=2), einige Ergebnisse beruhen auf 3 (n=3) oder auf 6 (n=6) voneinander unabhängigen Experimenten.

Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student's t-Test für unabhängige Proben angewendet. Ein $p < 0,05$ gilt als signifikant, d. h. ein Fehler bei der Entsch-

dung ein Ergebnis für "wahr" einzustufen, tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ein.

3 Ergebnisse

3.1 Endothelzellen und CpG-DNA D19^{chimäre}

Eine Entzündungsreaktion hat den Sinn körperfremde Organismen zu bekämpfen und unschädlich zu machen. In diesem Zusammenhang erscheint es sinnvoll, dass auf Bestandteile von Bakterien, wie z.B. CpG-DNA, Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, welche eine Aktivierung des Immunsystems auslösen. Diese immunstimulatorische Reaktion auf CpG-DNA ist bei vielen Immunzellen bereits gut nachgewiesen.

Inkubiert man allerdings Endothelzellen *in vitro* mit CpG-DNA D19^{chimäre}, so entsteht ein genau gegenteiliger Effekt, nämlich eine verminderte Freisetzung des Zytokins IL-8 im Vergleich zu unbehandelten Endothelzellen (Fitzner et al., 2008).

3.1.1 CpG-DNA senkt die IL-8 Sekretion in HMEC-1

Zunächst wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen nachgewiesen, dass CpG-DNA D19^{chimäre} in steigender Konzentration die IL-8 Sekretion in der Endothelzellreihe HMEC-1 signifikant senkt.

Es wurden ruhende und mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , jeweils 1000 U/ml) für 24 Stunden voraktivierte Zellen mit steigenden CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentrationen (1, 5 und 10 μ M) behandelt. Die Inkubation mit dem TLR9 Liganden erfolgte im Falle des IL-8 ELISAs für 6 Stunden (Fitzner et al., 2008), danach wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert, um später die Proteinkonzentration bestimmen zu können. Die Kulturüberstände wurden im IL-8 ELISA eingesetzt und so die quantitative IL-8 Sekretion der Zellen ermittelt. Die Endergebnisse sind jeweils Quotienten aus der tatsächlichen Proteinkonzentration der Kultur und dem quantitativ ermittelten IL-8 Wert im Überstand.

Ruhende HMEC-1 sezernieren ein Level von $15,7 \pm 4,9$ ng IL-8/mg Zellprotein. Nach Zugabe von CpG-DNA D19^{chimäre} sinkt die IL-8 Sekretion signifikant ab einer Konzentration von 5 μ M CpG-DNA. Bei den maximal eingesetzten 10 μ M sinkt die Konzentration auf $3,4 \pm 0,6$ ng IL-8/mg Zellprotein, was im Vergleich zu den unbehandelten Zellen einer Erniedrigung um den Faktor 5 entspricht (s. Abb. 3-1).

Die mit proinflammatorischen Zytokinen voraktivierten Zellen wurden untersucht, um zu zeigen, wie sich CpG-DNA D19^{chimäre} auf bereits in einer Entzündung befindliche Endothelzellen auswirkt.

Aktiviert HMEC-1 ohne CpG Inkubation sezernieren in den 6 Stunden Inkubationszeit ein Level von $187,6 \pm 23,7$ ng IL-8/mg Zellprotein, was einem fast zwölfmal so hohen Spiegel gegenüber den ruhenden Zellen entspricht. Eine signifikante Absenkung der IL-8 Sekretion auf $68,1 \pm 19,7$ ng IL-8/mg Zellprotein ist auch hier bereits bei einer Konzentration von 5 μ M CpG-DNA D19^{chimäre} erreicht. Diese Senkung entspricht einem Faktor 2,8 (s. Abb. 3-1).

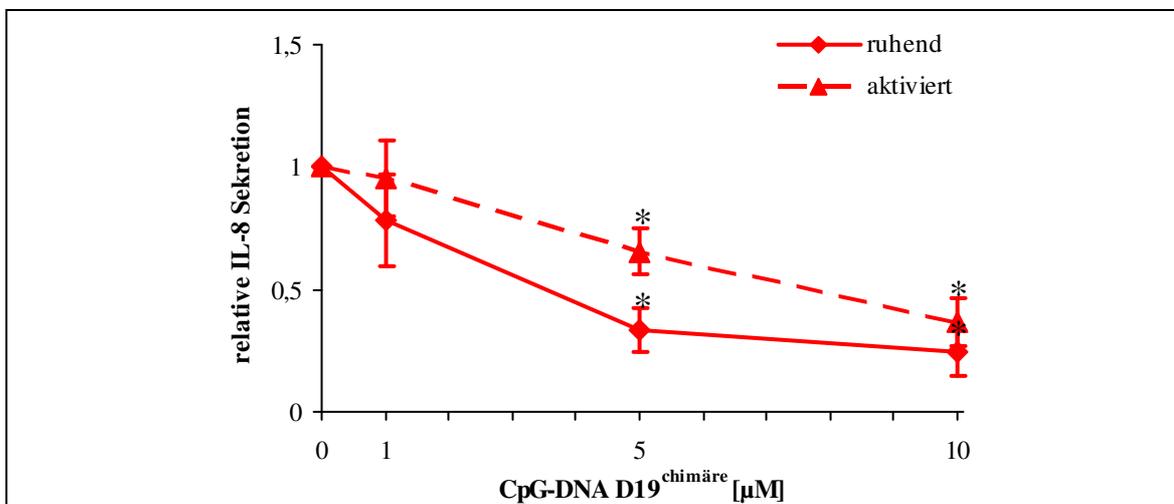


Abb. 3-1: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19^{chimäre}.

Mit dem Zytokintriplett (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , jeweils 1000U/ml) vorbehandelte und nicht vorbehandelte Zellen wurden für 6 Stunden mit 1, 5 bzw. 10 μ M CpG-DNA D19^{chimäre} inkubiert. Anschließend wurden die IL-8 Mengen in den Zellkulturüberständen mittels ELISA quantifiziert. Sowohl bei ruhenden wie bei aktivierten Zellen sinkt die IL-8 Menge mit steigender CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentration bereits ab 5 μ M signifikant. (n=3)

3.1.2 CpG-DNA senkt die IL-6 Sekretion in HMEC-1

Um diese immunsuppressive Wirkung von CpG-DNA D19^{chimäre} auf Endothelzellen mit einem zweiten Zytokin zu bestätigen, wurde der oben beschriebene Versuchsansatz wiederholt und der Nachweis von IL-6 im Zellkulturüberstand untersucht. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden, da sich in Zeitreihenuntersuchungen hier die größten quantitativen IL-6 Unterschiede im Sandwich ELISA ergaben.

Bei ruhenden HMEC-1 war es unter diesen Versuchsbedingungen nicht möglich eine IL-6 Menge oberhalb der Nachweisgrenze in den Zellkulturüberständen zu messen.

Mit dem Zytokintripltet voraktivierte HMEC-1 zeigen eine Sekretion von $32,8 \pm 10,1$ ng IL-6/mg Zellprotein.

Nach Inkubation mit CpG-DNA D19^{chimäre} zeigt sich auch hier bereits ab 1 μ M eine signifikante Senkung der IL-6 Sekretion um einen Faktor 2 (s. Abb. 3-2).

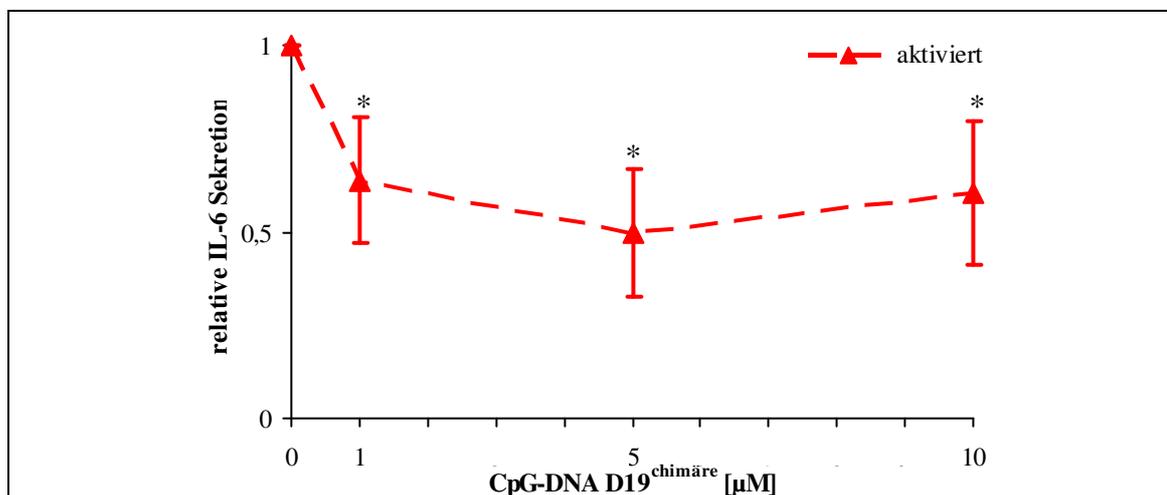


Abb. 3-2: IL-6 Sekretion von aktivierten HMEC-1 nach CpG-DNA D19^{chimäre}.

Um die IL-6 Mengen in den Zellkulturüberständen zu messen wurden voraktivierte HMEC-1 48 Stunden mit steigenden CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentrationen behandelt. Bereits ab 1 μ M CpG-DNA D19^{chimäre} sinkt die sezernierte IL-6 Menge signifikant um ca. 30 %. (n=6)

3.1.3 Wachstumssteigerung von HMEC-1 nach CpG-DNA D19^{chimäre}

Ein Grund für die geringere Zytokin Sekretion der HMEC-1 nach CpG Zugabe könnte theoretisch in einer verringerten Zellvitalität liegen. Um diesen Zusammenhang auszuschließen, wurde ein Vitalitätsassay mit Alamar Blue Färbung durchgeführt.

Ruhende HMEC-1 wachsen nach einer Inkubation mit 1 μ M CpG-DNA D19^{chimäre} für 48 Stunden gegenüber den unbehandelten Zellen um den Faktor 1,3, was bereits eine signifikante Steigerung bedeutet. Bei einer Behandlung mit 10 μ M steigt das Zellwachstum gegenüber den unbehandelten Zellen sogar auf einen Faktor von 1,4 (s. Abb. 3-3).

Auch voraktivierte Zellen zeigen ein verstärktes Wachstum unter steigenden CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentrationen, wenn auch insgesamt etwas schwächer. Bei einer Behandlung mit 10 μ M CpG-DNA D19^{chimäre} steigt das Wachstum um den Faktor 1,2 gegenüber den aktivierten Zellen ohne CpG-DNA D19^{chimäre} Behandlung (s. Abb. 3-3).

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter steigenden CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentrationen keine Zellen absterben, sondern, dass gegenteilig sogar das Wachstum gesteigert wird.

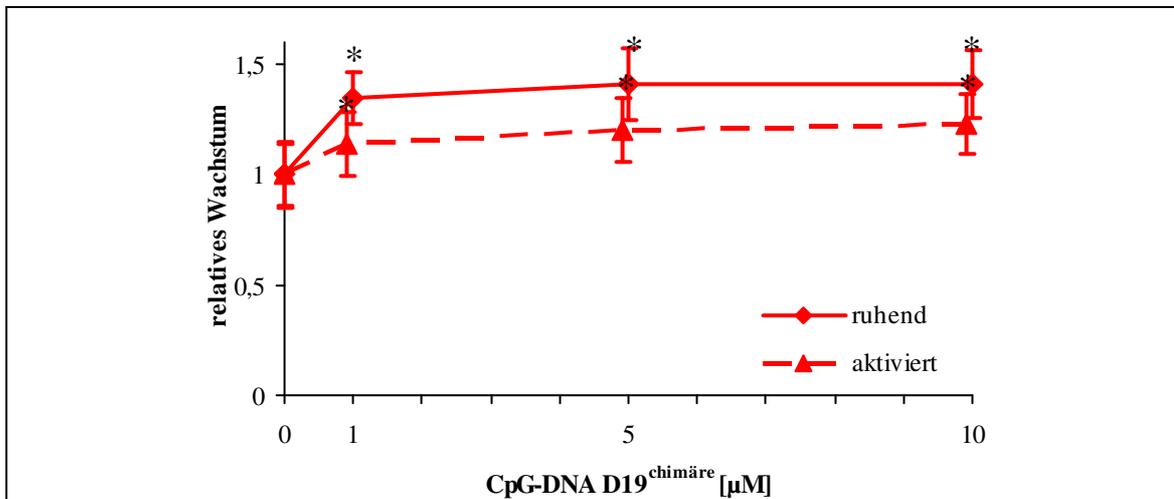


Abb. 3-3: Relatives Wachstum von ruhenden und aktivierten HMEC-1 in 48 Stunden unter steigenden CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentrationen.

Ruhende und voraktivierte Zellen wurden jeweils für 48 Stunden mit 0, 1, 5 und 10 µM CpG-DNA D19^{chimäre} inkubiert. Anschließend erfolgte für 2½ Stunden eine Inkubation mit Alamar Blue, in den Überständen wurde dann die Fluoreszenz gemessen, die linear mit der Zelldichte korreliert (n=3).

3.1.4 CpG-DNA D19^{chimäre} senkt die IL-6 Sekretion in HDMEC

Um zu zeigen, dass dieser immunsuppressive Effekt nicht nur ein Artefakt einer immortalisierten Endothelzelllinie ist, wurde der oben bereits beschriebene Versuchsaufbau mit den primären Endothelzellen HDMEC wiederholt. Die CpG-DNA D19^{chimäre} Inkubation betrug wieder 48 Stunden. Die quantitative IL-6 Freisetzung wurde mit dem gleichen ELISA gemessen.

Ruhende HDMEC sezernieren basale IL-6 Mengen von $6,0 \pm 1,1$ ng IL-6/mg Zellprotein, IL-6 ist hier also bereits bei nicht aktivierten Zellen gut nachweisbar. Nach Zugabe von CpG-DNA D19^{chimäre} sinkt die IL-6 Sekretion ab 5 µM signifikant auf $1,9 \pm 0,5$ ng IL-6/mg Zellprotein (Faktor 3,1) (s. Abb. 3-4).

Voraktivierte HDMEC setzen Mengen von $585,4 \pm 32,3$ ng IL-6/mg Zellprotein frei, was eine knapp 18-mal so hohe Sekretion im Vergleich zu den aktivierten Zellen der Endothelzelllinie bedeutet. Auch hier ist mit steigender CpG-DNA D19^{chimäre} Sekretion bereits ab 1 µM eine signifikante Sekretionssenkung nachweisbar, die bei 10 µM auf

einen Spiegel von $304,4 \pm 5,7$ ng IL-6/mg Zellprotein sinkt. $10 \mu\text{M}$ CpG-DNA D19^{chimäre} sind also in der Lage in HDMEC eine Reduktion der IL-6 Ausschüttung von 50 % zu bewirken (s. Abb. 3-4).

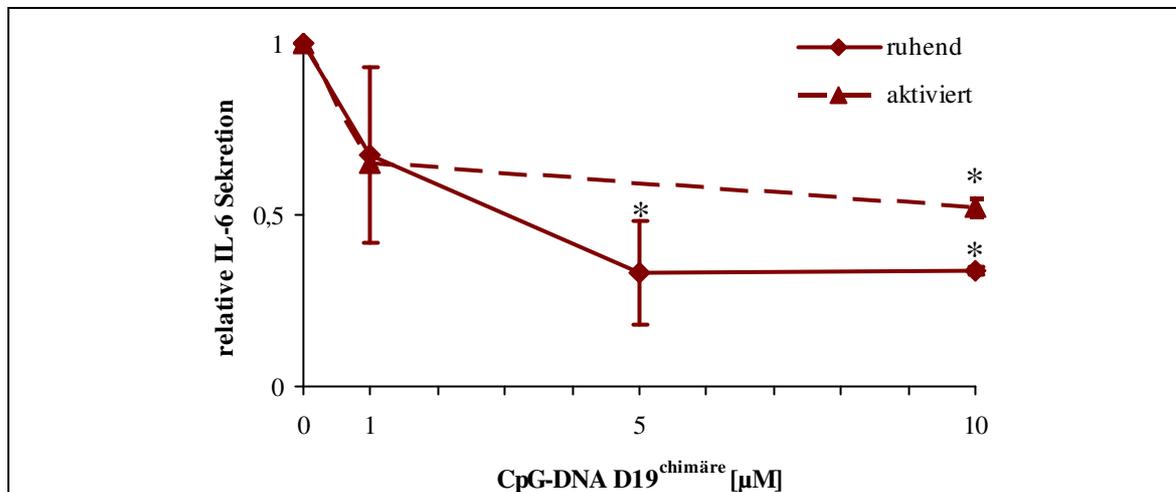


Abb. 3-4: IL-6 Sekretion in von ruhenden und aktivierten HDMEC nach CpG-DNA D19^{chimäre}

Es wurden nicht voraktivierte und voraktivierte Zellen mit steigenden CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentrationen behandelt und die Zellkulturüberstände nach 48 Stunden im IL-6 ELISA eingesetzt. Auch hier kann eine deutliche Senkung der IL-6 Sekretion beobachtet werden. Bei einer Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ um ca. 50 %. (n=3)

3.1.5 CpG-DNA senkt die IFN- β Expression in HMEC-1

Aus der Gruppe der Zytokine wurde also bislang sowohl für das Chemokin IL-8 als auch für IL-6 nachgewiesen, dass auf den Reiz CpG-DNA D19^{chimäre} eine Sekretions-senkung folgt. Zusätzlich wurde von den als antiviral und antitumoral beschriebenen Interferonen IFN- β untersucht.

Vorbereitend war es zunächst nötig mit konventioneller PCR zu überprüfen ob HMEC-1 und MM6 überhaupt IFN- β mRNA produzieren. Diese Versuche haben gezeigt, dass bei beiden Zelltypen im ruhenden sowie im aktivierten Zustand IFN- β mRNA entsteht. Nachdem die Etablierung eines IFN- β ELISA aufgrund zu niedriger Konzentrationen im Zellkulturüberstand nicht möglich war, wurde IFN- β mRNA quantitativ mittels Real Time PCR nachgewiesen.

Für diese Versuche wurden wieder ruhende und mit dem Zytokinriplett voraktivierte Zellen verglichen. Die CpG-DNA D19^{chimäre} Inkubation erfolgte anschließend für 24

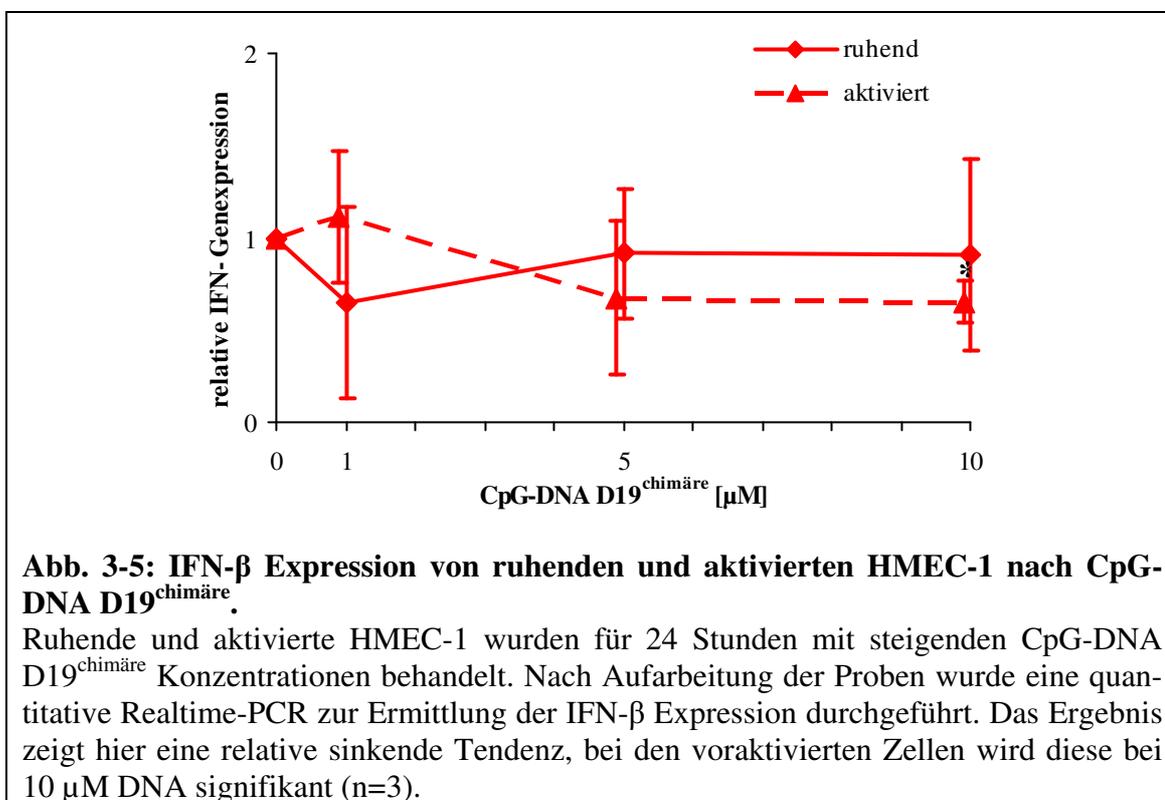
Stunden. Danach wurde die mRNA isoliert und für das "Housekeeping" Gen 18S und IFN- β eine Realtime-PCR durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass insgesamt relativ wenig IFN- β exprimiert wird, da für alle CpG-DNA Konzentrationen 100 ng cDNA benötigt wurden, um mittlere C_T -Werte von 25 zu erreichen.

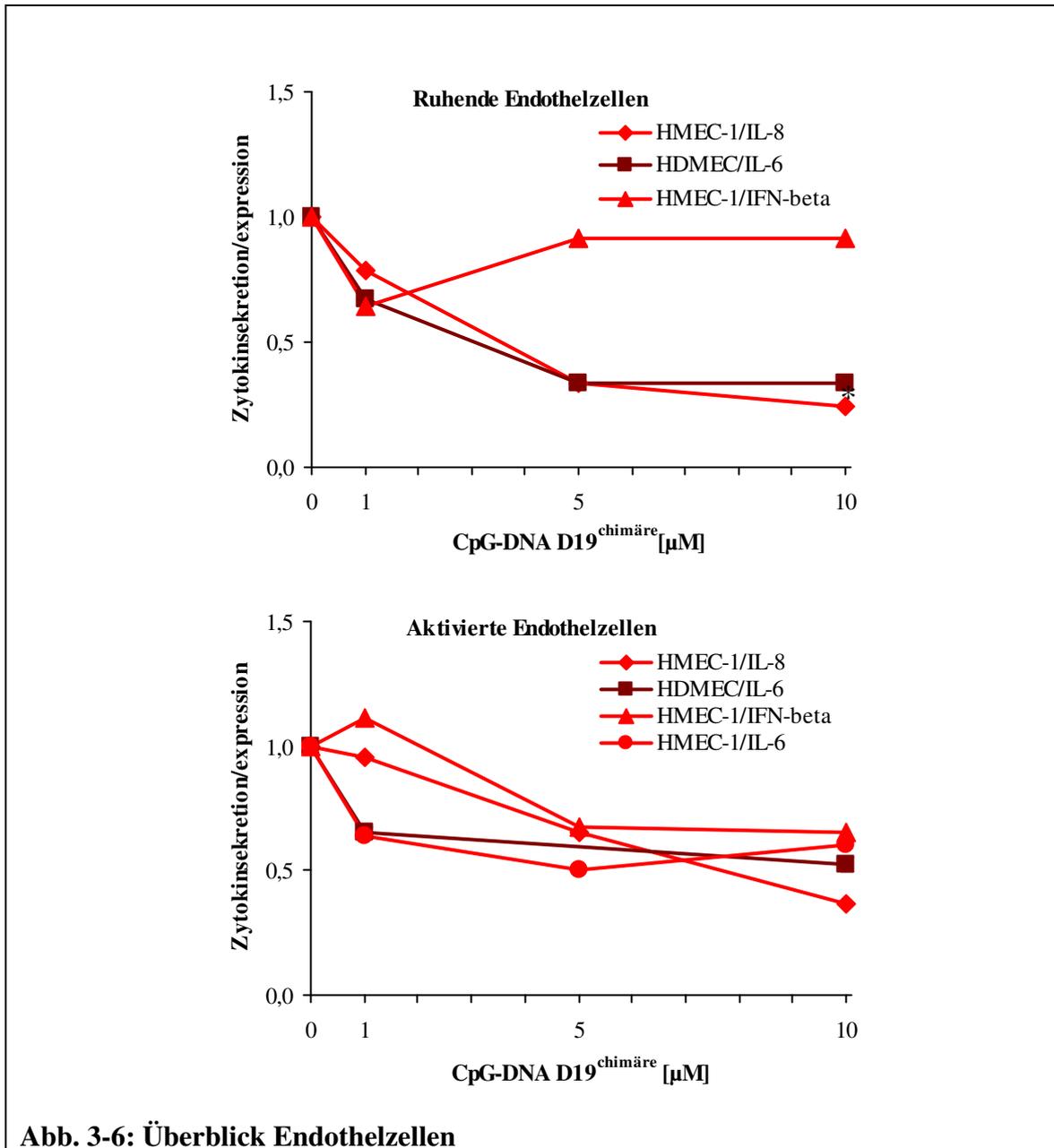
Bei den ruhenden Zellen mit 1 μ M CpG-DNA ist ein relativ deutliches Absinken der IFN- β Expression um durchschnittlich 40 % nachweisbar, auch wenn diese - aufgrund der sehr unterschiedlichen Ergebnisse der voneinander unabhängigen Versuche - nicht signifikant ist. Bei den höheren Konzentrationen nähert sich die IFN- β mRNA Menge im Durchschnitt wieder dem Ausgangswert an.

Die voraktivierten HMEC-1 hingegen zeigen ein eindeutigeres Bild. Nach einem minimalen Anstieg um 10 % bei 1 μ M sinkt die IFN- β Expression nach 5 und 10 μ M CpG-DNA um 40 % ab.

Zumindest die voraktivierten HMEC-1 zeigen also unter steigenden CpG-DNA Konzentrationen einen signifikanten Abfall der IFN- β Expression (s. Abb. 3-5).



Unter hier gegebenen Versuchsbedingungen ist also in allen durchgeführten Versuchen mit CpG-DNA D19^{chimäre} und Endothelzellen ein immunsuppressiver Effekt meistens hoch signifikant.



3.2 Makrophagen und CpG-DNA D19^{chimäre}

Um weiterhin zu zeigen, ob dieser immunsuppressive Effekt zellspezifisch ist, wurden unter identischen Versuchsbedingungen die zwei humanen Makrophagenzelllinien, MM6 und THP-1 und ihre Reaktion auf CpG-DNA D19^{chimäre} untersucht.

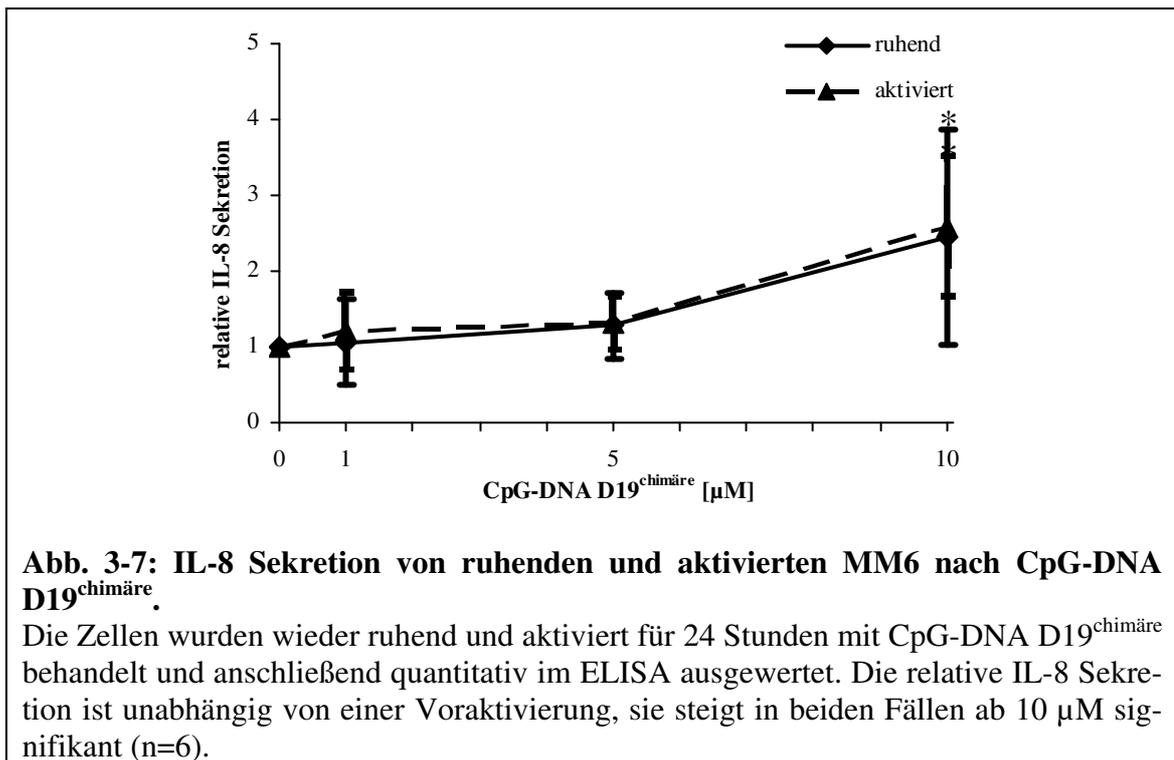
Für Makrophagen ist der immunstimulatorische Effekt nach CpG-DNA gut beschrieben (Sester et al., 2006). Ziel war es, dies auch für die in dieser Arbeit verwendete CpG-DNA D19^{chimäre} nachzuweisen.

3.2.1 CpG-DNA D19^{chimäre} steigert die IL-8 Sekretion in MM6

Es wurden wieder ruhende mit voraktivierten (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , jeweils 1000 U/ml für 24h) Zellen verglichen. Die folgende Inkubationszeit mit CpG-DNA D19^{chimäre} betrug in diesem Fall, wieder auf eigenen Zeitreihen begründet, 24 Stunden.

Nicht vorbehandelte MM6 sezernieren eine durchschnittliche Basismenge von $1,6 \pm 0,7$ ng IL-8/mg Protein. Eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion wird mit $10 \mu\text{M}$ CpG-DNA D19^{chimäre} erreicht und liegt etwa bei dem Faktor 1,5 (s. Abb. 3-7).

Voraktivierte Zellen setzen durchschnittlich $16,3 \pm 5,5$ ng IL-8/mg Protein frei. Auch hier ist eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion bei $10 \mu\text{M}$ nachweisbar, diesmal um den Faktor 2 (s. Abb. 3-7).

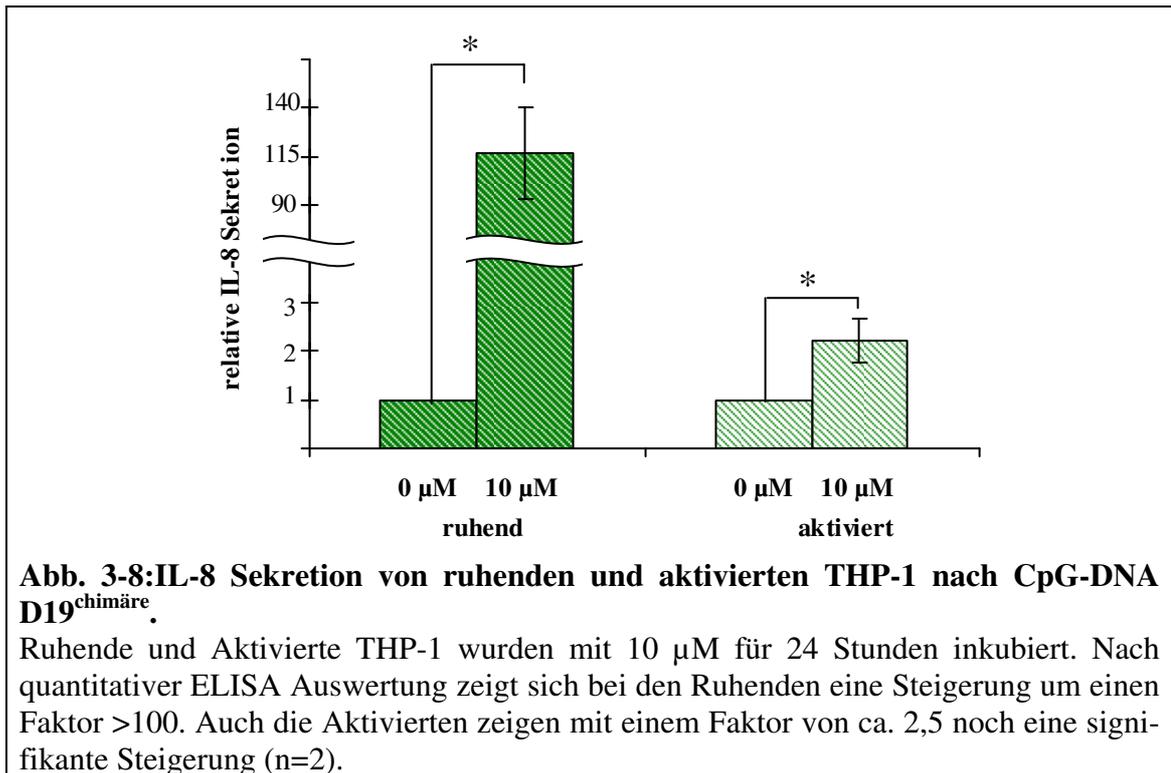


3.2.2 CpG-DNA D19^{chimäre} steigert die IL-8 Sekretion in THP-1

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde mit den THP-1 eine weitere humane Makrophagenzelllinie auf die IL-8 Sekretion nach CpG-DNA D19^{chimäre} untersucht. Die Versuchsbedingungen gleichen denen der MM6 mit dem Unterschied, dass lediglich eine CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentration von 10 µM eingesetzt wurde.

Die basale IL-8 Sekretion der THP-1 beträgt im Vergleich zu MM6 einen sehr viel geringeren Wert von $0,006 \pm 0,001$ ng IL-8/mg Protein. Bei Inkubation mit 10µM CpG-DNA D19^{chimäre} für 24 Stunden steigerte sich die IL-8 Sekretion signifikant auf $0,7 \pm 0,07$ ng IL-8/mg Protein, was einen Faktor >100 bedeutet. CpG-DNA D19^{chimäre} hat hier also einen vergleichsweise hohen Effekt auf eine gesteigerte IL-8 Sekretion (s. Abb. 3-8).

Voraktivierte THP-1 sezernieren ohne CpG-DNA D19^{chimäre} Inkubation $3,4 \pm 0,6$ ng IL-8/mg Protein. Bei Zugabe von CpG-DNA D19^{chimäre} steigert sich dieser Wert signifikant auf $8,3 \pm 0,8$ ng IL-8/mg Protein, also ca. um einen Faktor 2,5. Dieser Effekt ist nicht vergleichbar mit dem Faktor >100 der bei ruhenden Zellen erreicht wird, ist aber dennoch signifikant (s. Abb. 3-8).



3.2.3 CpG-DNA D19^{chimäre} steigert die IFN-β Expression in MM6

Um auch bei Makrophagen die Auswirkung auf die Interferonsynthese durch einen CpG-DNA D19^{chimäre} Stimulus zu überprüfen, wurde hier ebenfalls eine Realtime PCR zum Nachweis von IFN-β durchgeführt.

Die Inkubation mit CpG-DNA D19^{chimäre} betrug wieder 24 Stunden in steigender Konzentration von 1 über 5 bis 10 µM. Die Versuchsbedingungen gleichen denen für HMEC-1 beschriebenen.

Auch hier wurde bei allen Proben eine cDNA Menge von 100 ng eingesetzt.

Die ruhenden MM6 lassen mit steigender CpG-DNA D19^{chimäre} Konzentration eine deutliche, allerdings nicht signifikant steigende Tendenz erkennen (s. Abb. 3-9).

Bei den voraktivierten Zellen zeigt sich sogar eine durchschnittliche Steigerung um den Faktor 2,5. Die Ergebnisse sind, aufgrund der hohen Standardabweichung allerdings nicht signifikant (s. Abb. 3-9).

Es ist also auch für MM6 zumindest eine immunstimulatorische Tendenz auf den Reiz CpG-DNA D19^{chimäre} anzunehmen.

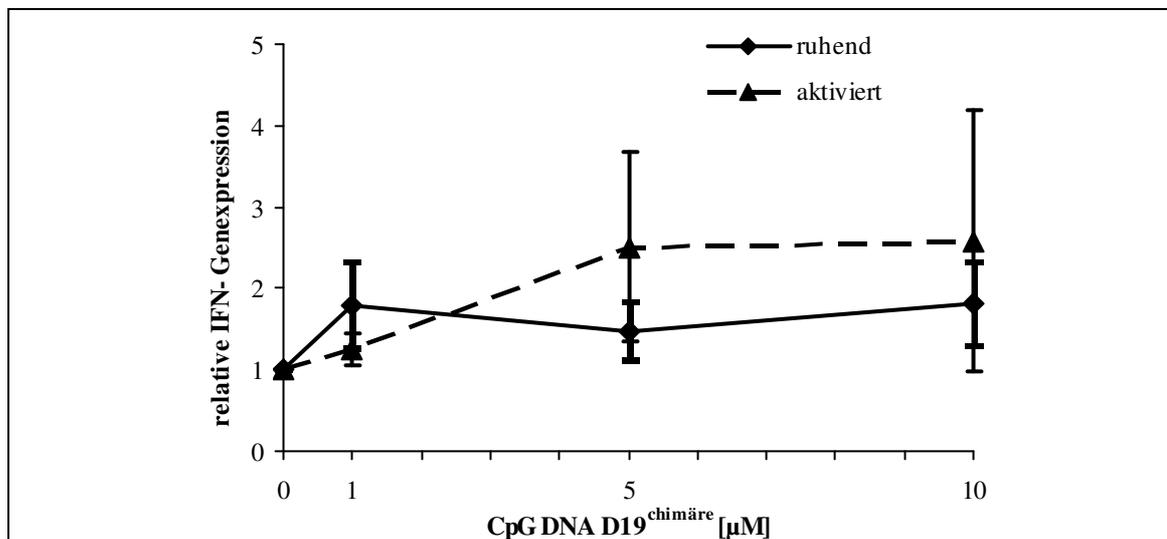
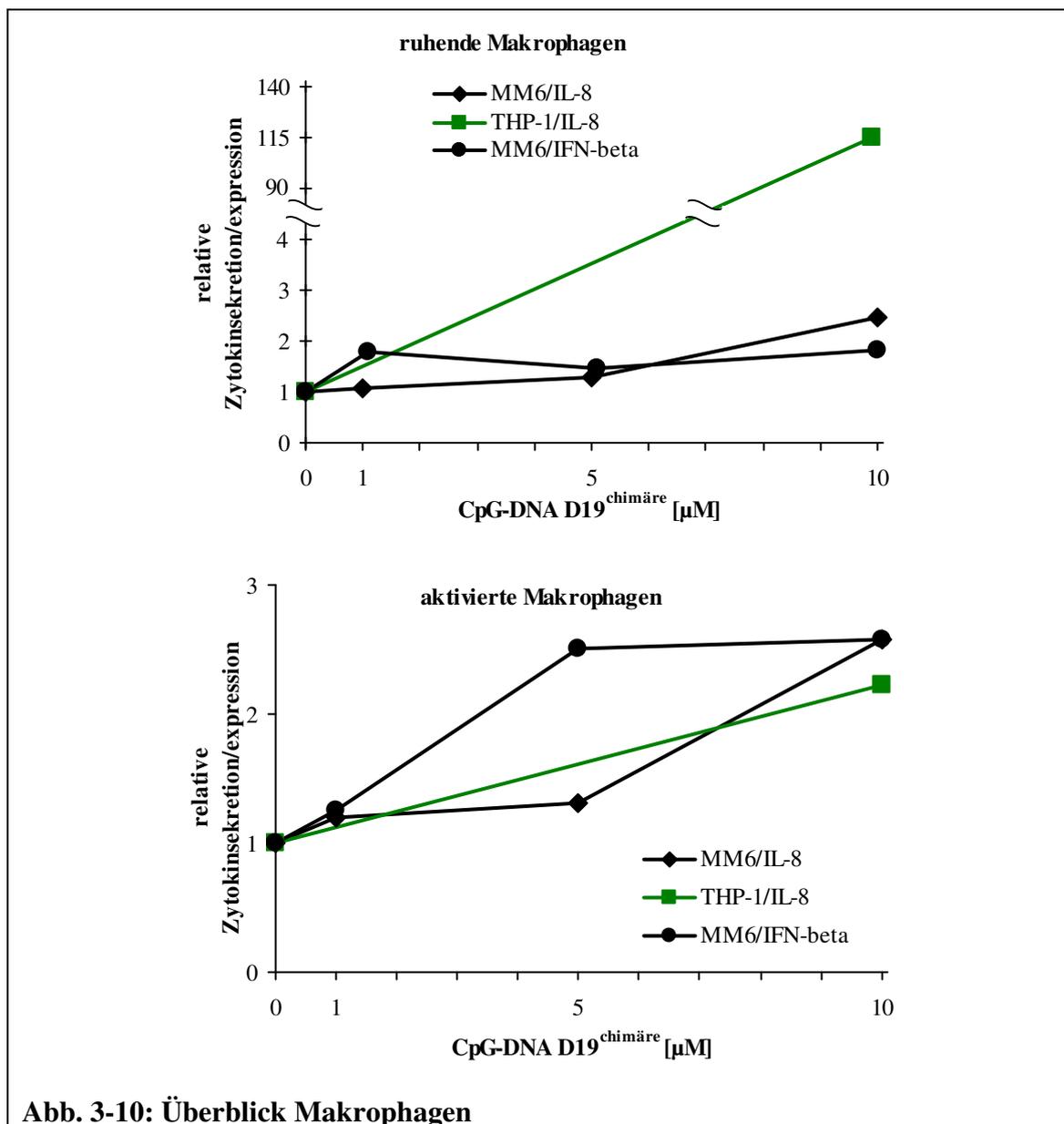


Abb. 3-9: IFN-β Expression von ruhenden und aktivierten MM6 nach CpG-DNA D19^{chimäre}.

Ruhende und aktivierte HMEC-1 wurden für 24 Stunden mit steigenden CpG-DNA D19 Konzentrationen behandelt. Nach Aufarbeitung der Proben wurde eine zweistufige quantitative Realtime PCR zur Ermittlung der IFN-β Expression durchgeführt. Das Ergebnis zeigt hier eine relative steigende Tendenz, aufgrund von großen Unterschieden zwischen den einzelnen Versuchen wird diese allerdings auch bei 10 µM nicht signifikant (n=3).

Alle mit CpG-DNA D19^{chimäre} und Makrophagen durchgeführten Versuche zeigen zumindest eine immunstimulatorische Tendenz. Es wurde also nachgewiesen, dass CpG-DNA D19^{chimäre} auf Makrophagen - im Gegensatz zu Endothelzellen - eine immunstimulatorische Wirkung hat.



3.3 Kontrollen und ihre Wirkung auf die IL-8 Sekretion

Weiterhin wurde nun untersucht, ob die nachgewiesenen Effekte auch tatsächlich auf dem CpG Motiv oder aber auf anderen Eigenschaften der untersuchten DNA beruhen. Hierfür wurden 3 Kontrollen verwendet, zunächst wurden in der CpG-DNA D19^{chimäre} die Phosphorothioatbindungen durch Phosphodiesterbindungen ersetzt (CpG-DNA D19^{PDE}). Außerdem wurde eine Kontroll DNA eingesetzt, die nachgewiesenermaßen eine nicht stimulatorische Wirkung zeigt (Hemmrich et al., 2003), sie enthält kein CpG Motiv und wurde zum einen mit Phosphodiesterbindungen (Kontroll DNA^{PDE}) und zum anderen mit Phosphorothioatbindungen (Kontroll DNA^{PTO}) eingesetzt. Die Wirkung dieser Kontrollen in steigenden Konzentrationen auf HMEC-1 und Makrophagen wird im Folgenden dargestellt.

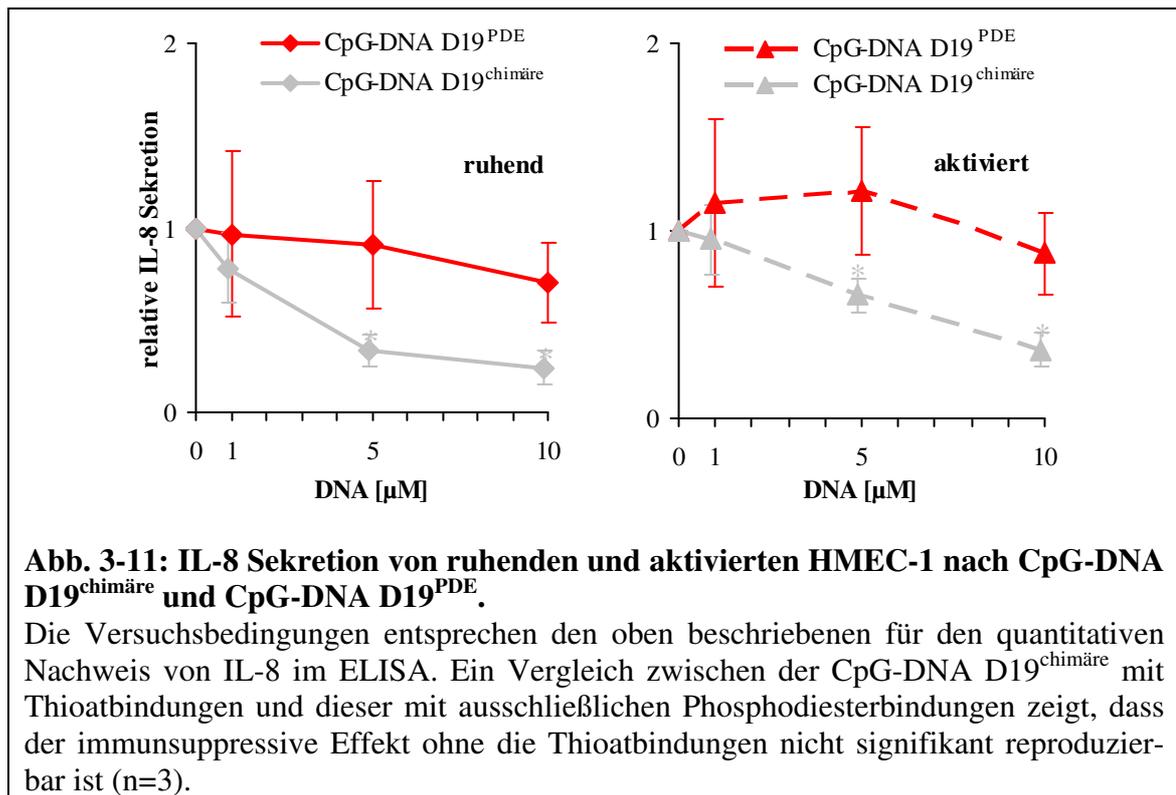
3.3.1 CpG-DNA D19^{PDE}

3.3.1.1 HMEC-1

Die Versuchsbedingungen gleichen den oben beschriebenen, es wurden vergleichend ruhende und voraktivierte Zellen untersucht.

Nach einer Inkubation der ruhenden Zellen mit CpG-DNA D19^{PDE} für sechs Stunden in steigenden Konzentrationen zeigt sich eine leicht sinkende Tendenz der IL-8 Sekretion ohne Signifikanz (von $15,7 \pm 4,9$ auf $10,2 \pm 2,3$ ng IL-8/mg Protein) (s. Abb. 3-11).

Derselbe Effekt ist bei den voraktivierten Zellen zu beobachten (von $187,6 \pm 23,7$ auf $164,9 \pm 25,9$ ng IL-8/mg Protein). Der hier beobachtete Faktor 1,1 ist allerdings nicht vergleichbar mit dem Faktor 2,5 den die CpG-DNA D19^{chimäre} in HMEC-1 bewirkt (s. Abb. 3-11).



3.3.1.2 MM6

Die Behandlung der MM6 mit CpG-DNA D19^{PDE} erfolgte zur CpG-DNA D19^{chimäre} im Vergleich in einer anderen Woche, deshalb befindet sich der basale Level der unbehandelten Zellen hier nur bei $0,8 \pm 0,2$ ng IL-8/mg Protein. Bei keiner der gewählten Konzentrationen kommt es zu einer nennenswerten Steigerung oder Senkung von IL-8. CpG-DNA D19^{PDE} zeigt hier also keinen Effekt (s. Abb. 3-12)

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei den voraktivierten Zellen, auch hier ist keine wesentliche IL-8 Änderung über die verschiedenen Konzentrationen nachzuweisen (s. Abb. 3-12).

Insgesamt ist die CpG-DNA ohne Thioatbindungen also nicht in der Lage den IL-8 Spiegel in Überständen aus MM6 Kulturen zu verändern.

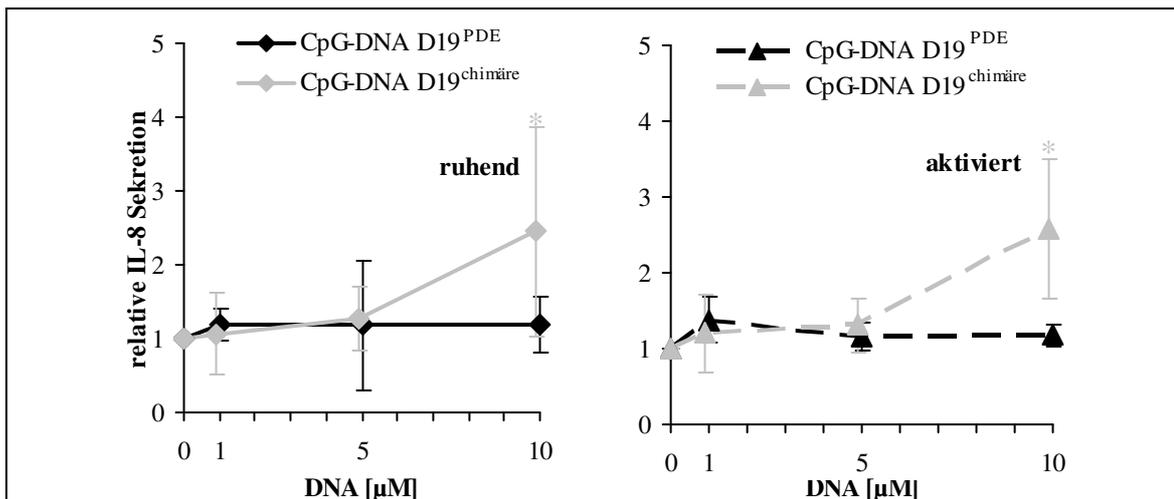


Abb. 3-12: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten MM6 nach CpG-DNA D19^{chimäre} und CpG-DNA D19^{PDE}.

Hier entsprechen die Versuchsbedingungen ebenfalls den oben bereits beschriebenen. Der IL-8 steigernde Effekt der CpG-DNA D19^{chimäre} auf MM6 mit derselben Sequenz aber ausschließlichen Phosphodiesterbindungen ist nicht reproduzierbar (n=3).

3.3.1.3 THP-1

Die nicht vorbehandelten THP-1 starten wieder bei sehr geringen IL-8 Werten von 0,006 ng IL-8/mg Protein. Nach Zugabe von 10 μM CpG-DNA D19^{PDE} ist zwar eine Steigerung auf 0,03 ng IL-8/mg Protein, entsprechend einem Faktor 5, zu beobachten. Dies ist allerdings nicht vergleichbar mit der Steigerung um das 100fache bei Zugabe von CpG-DNA D19^{chimäre} (s. Abb. 3-13).

Voraktivierte Zellen sezernieren, wie oben bereits beschrieben, wesentlich höhere basale IL-8 Mengen. Bei weiterer Zugabe von CpG-DNA D19^{PDE} findet keine signifikante Änderung der IL-8 Freisetzung statt. Nach Voraktivierung ist CpG-DNA D19^{PDE} also nicht mehr in der Lage einen signifikant stimulatorischen Effekt hervorzurufen (s. Abb. 3-13).

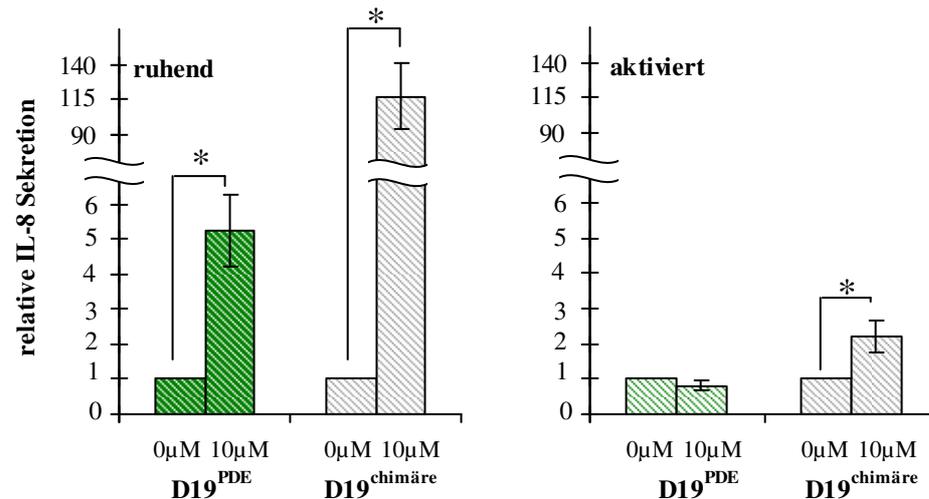


Abb. 3-13: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten THP-1 nach CpG-DNA D19^{chimäre} und CpG-DNA D19^{PDE}.

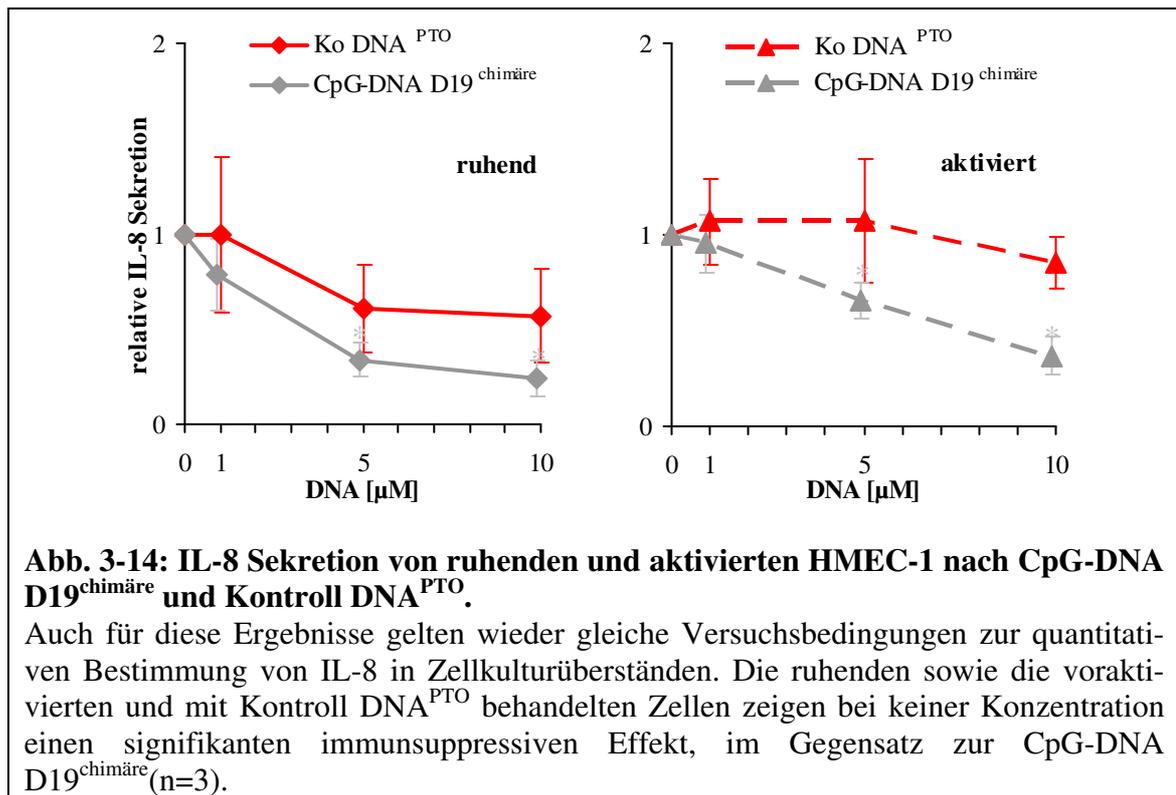
Die Versuchsbedingungen entsprechen den bereits vorher beschriebenen. Auch hier zeigt - zumindest bei den voraktivierten Zellen - die CpG-DNA D19^{PDE} (nur Phosphodiesterbindungen) keinen signifikanten Effekt mehr, im Gegensatz zu der CpG-DNA D19^{chimäre} (n=2). Bei den ruhenden THP-1 zeigt sich allerdings ein signifikant steigernder Effekt, dieser ist aber um ein Vielfaches niedriger als bei CpG-DNA D19^{chimäre}.

3.3.2 Kontrolle DNA^{PTO}

3.3.2.1 HMEC-1

Nach gleichem Reaktionsansatz wurden HMEC-1 auch mit der Kontroll DNA^{PTO} behandelt, um zu untersuchen welche Wirkung die PTO Bindungen der CpG-DNA D19^{chimäre} auf den suppressiven Effekt haben. Bei ähnlichem, bereits oben beschriebenem basalem Spiegel kommt es ohne Voraktivierung zu einer sinkenden Tendenz, allerdings ohne Signifikanz. Bei einer Behandlung mit 10 µM fällt die IL-8 Produktion um einen Faktor 1,8 (s. Abb. 3-14).

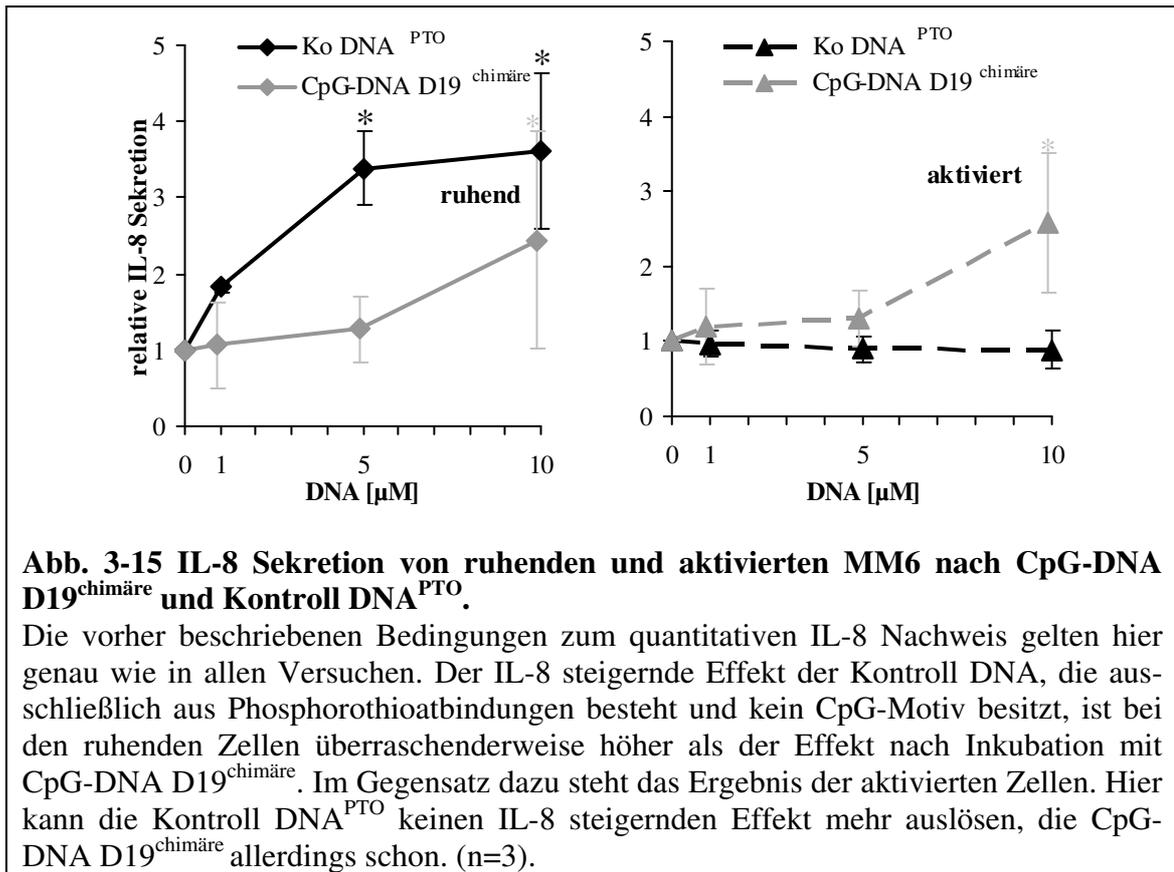
Nach Voraktivierung mit den Zytokinen ist diese leichte Tendenz aufgehoben. Auch hier wird keine Signifikanz erreicht (s. Abb. 3-14).



3.3.2.2 MM6

Auch die Mono Mac 6 (MM6) wurden mit dieser Kontrolle behandelt. Hier zeigt sich, zumindest bei den ruhenden Zellen, ein überraschender Effekt. Vom basalen Spiegel $1,6 \pm 0,7$ ng IL-8/mg Protein steigert sich die IL-8 Freisetzung mit steigender DNA Konzentration auf $5,5 \pm 2,5$ ng IL-8/mg Protein signifikant. Dieser Faktor 3,4 übersteigt sogar die Steigerung durch CpG-DNA D19^{chimäre} (s. Abb. 3-15).

Die mit Zytokinen vorbehandelten MM6 zeigen im Gegensatz dazu keine Reaktion der IL-8 Sekretion auf die Kontroll DNA^{PTO}. Die CpG-DNA D19^{chimäre} konnte hier einen signifikant IL-8 Sekretionssteigernden Effekt auslösen (s. Abb. 3-15).



3.3.2.3 THP-1

Weiterhin interessant war zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei der anderen humanen Makrophagenzelllinie zu beobachten ist. Die basale IL-8 Freisetzung ist wieder sehr gering, mit Kontroll DNA^{PTO} ist allerdings eine Steigerung von $0,006 \pm 0,001$ ng IL-8/mg Protein auf $0,083$ ng IL-8/mg Protein messbar, dieser Faktor 14 übersteigt die anderen Kontrollen um ein Vielfaches. Die Sekretionssteigerung durch diese Kontroll DNA liegt aber wieder weit unter den gut 100fachen der CpG-DNA D19^{chimäre} (s. Abb. 3-16).

Bei den voraktivierten Zellen verhält es sich wie die Linie MM6 beschrieben. Auch hier ist die Kontroll DNA^{PTO} im Gegensatz zur CpG-DNA D19^{chimäre} nicht in der Lage eine signifikante Steigerung zu erreichen (s. Abb. 3-16).

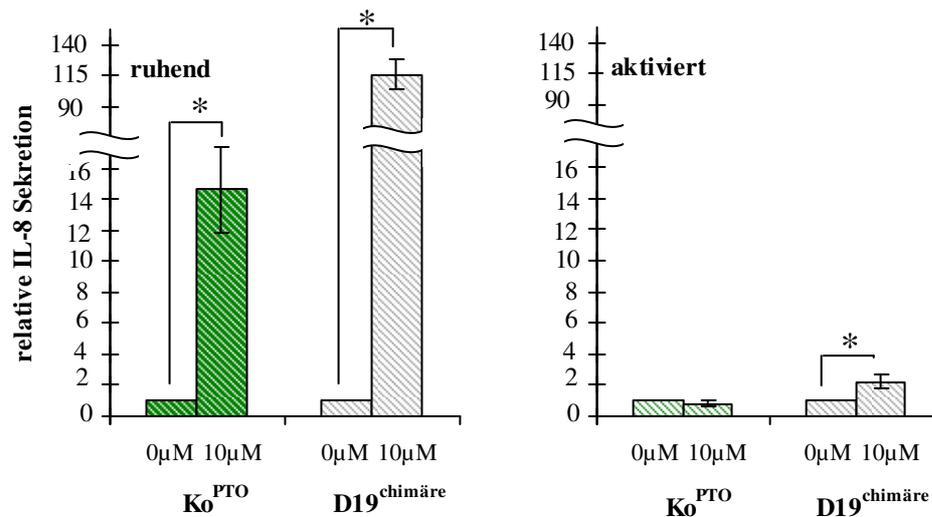


Abb. 3-16: IL-8 Sekretion von ruhenden und aktivierten THP-1 nach CpG-DNA D19^{chimäre} und Kontroll DNA^{PTO}.

Die Versuchsbedingungen gleichen den oben bereits beschriebenen. Auf die ruhenden THP-1 hat auch diese Kontrolle wieder einen IL-8 steigernden Effekt, der allerdings nicht mit dem Effekt der CpG-DNA D19^{chimäre} auf ruhende THP-1 vergleichbar ist. Bei eingesetzten 10 μM der Kontroll DNA mit Phosphorothioatbindungen wird nach Voraktivierung kein signifikanter Effekt mehr erreicht (n=2).

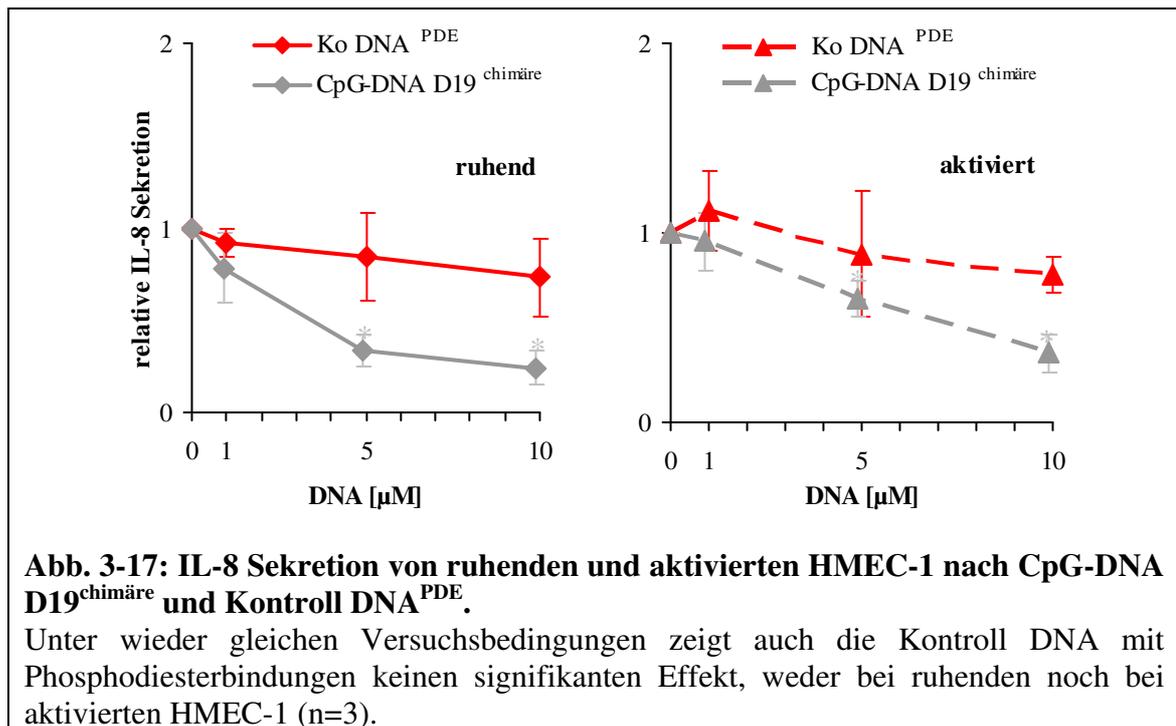
3.3.3 Kontroll DNA^{PDE}

Zuletzt wurde überprüft, welche Wirkung die Kontroll DNA ohne jegliche als stimulatorisch beschriebene Merkmale, weder CpG Motiv noch Phosphorothioatbindungen, auf die humane Endothelzelllinie sowie die humanen Makrophagenzelllinien hat.

3.3.3.1 HMEC-1

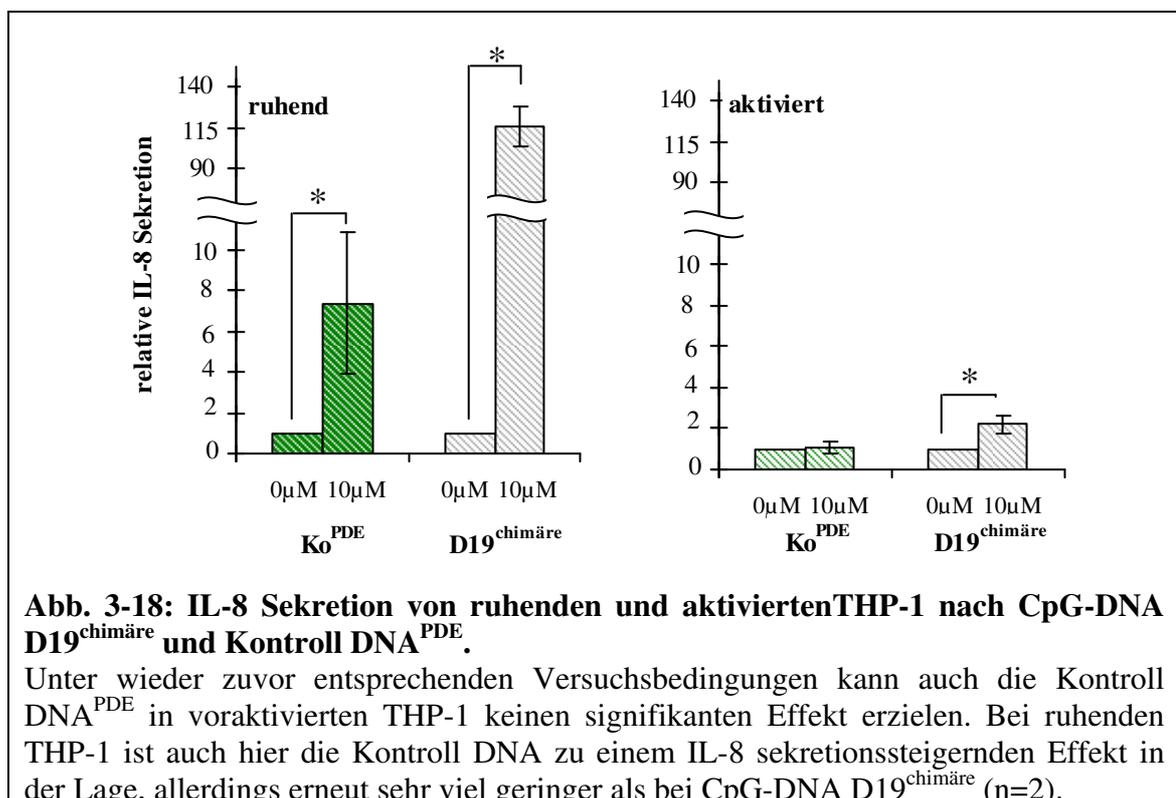
Die ruhenden HMEC-1 reagieren auf diese Kontrolle ganz ähnlich wie auf die übrigen mit einer fallenden Tendenz, aber ohne nachgewiesene Signifikanz. Über einen Faktor 1,5 geht der Effekt nicht hinaus (s. Abb. 3-17).

Auch bei den Voraktivierten ergibt sich bei dieser Kontrolle nichts Neues. Die Tendenz ist im Vergleich zu den Ruhenden wieder schwächer, von $83,5 \pm 29$ ng IL-8/mg Protein geht es bei 10 μM nur auf $65,4 \pm 22,7$ ng IL-8/mg Protein herunter. Dieses Ergebnis ist nicht vergleichbar mit dem Faktor 2,5 den CpG-DNA D19^{chimäre} unter gleichen Versuchsbedingungen bewirkt (s. Abb. 3-17).



3.3.3.2 THP-1

Die Wirkung dieser Kontrolle auf THP-1 Makrophagen ist vergleichbar mit der von CpG-DNA D19^{PDE}. Die ruhenden Zellen schaffen auch hier einen Faktor 6, bei den Aktivierten kann von keiner Tendenz gesprochen werden (s. Abb. 3-18).



Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Kontrollen zwar bei einigen ruhenden Zellen signifikante Effekte zeigen, der Effekt von CpG-DNA D19^{chimäre} aber stets größer ist. Nach Voraktivierung durch proinflammatorische Zytokine kann keine der Kontroll DNA mehr einen signifikanten Effekt hervorrufen. Eine Ausnahme bilden die ruhenden MM6, bei denen die Kontroll DNA mit Thioatbindungen eine effektiv höhere IL-8 Sekretionssteigerung als CpG DNA D19^{chimäre} erreichte. Die THP-1 Makrophagen sind aufgrund ihrer schwachen basalen IL-8 Freisetzung schwer mit den anderen Zellen zu vergleichen. Aber auch hier schafft nach Voraktivierung nur CpG-DNA D19^{chimäre} einen signifikant IL-8 steigernden Effekt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Reaktion der primären humanen Endothelzelllinie HDMEC, sowie der immortalisierten humanen Linie HMEC-1 auf unterschiedliche stimulierende und nicht stimulierende DNAs untersucht.

Wie bereits erwähnt, kommen auch auf humanen Makrophagen alle zehn bisher bekannten TLRs vor (Hume et al., 2001; Nau et al., 2003), als Vertreter dieser Immunzellen wurden Mono Mac 6 (MM6) und THP-1, beides humane Makrophagenzelllinien, untersucht.

Die vier Zelltypen wurden jeweils in zwei verschiedenen Aktivitätsstadien untersucht. Einerseits in zuvor unbehandeltem, also ruhendem Zustand, andererseits nach vorheriger Aktivierung durch 24-stündige Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IFN- γ , IL1- β), in dieser Arbeit als voraktivierte Zellen bezeichnet. Diese Unterteilung ermöglicht es zwischen der initialen Zellantwort auf ein Pathogen und der Antwort auf dieses in einer bereits laufenden Entzündung zu unterscheiden und so zu differenzieren welche DNA auch in der laufenden Immunreaktion noch in der Lage ist, einen signifikanten Effekt zu erzielen.

Die Zellen in den zwei unterschiedlichen Aktivitätsstadien wurden mit 4 verschiedenen DNAs behandelt. (1) CpG-DNA D19^{chimäre}, eine CpG-DNA vom Typ A mit zentralem CpG-Motiv und einem poly G Segment, die in der Literatur als immunstimulatorisch beschrieben wird (Hoene et al., 2006). (2) CpG-DNA D19^{PDE}, entspricht der vorigen DNA mit dem Unterschied, dass keine Phosphorothioatbindungen sondern nur Phosphodiesterbindungen vorkommen. (3) Kontroll DNA^{PTO} ist eine DNA, die in vorherigen Experimenten keinen immunogenen Effekt gezeigt hat und nur über Phosphorothioatbindungen verbundene Basen besitzt. (4) Kontroll DNA^{PDE} entspricht (3), mit dem Unterschied, dass die Basen hier nur über Phosphodiesterbindungen verknüpft sind. Ziel der Behandlung mit den unterschiedlichen DNAs war es herauszufinden ob die künstlich hergestellten Phosphorothioatbindungen selbst einen immunogenen Effekt aufweisen oder dieser nur auf dem CpG-Motiv beruht. Alle 4 DNAs wurden jeweils als Oligodesoxynukleotide (ODNs) eingesetzt. Diese werden künstlich hergestellt und ausschließlich bei Versuchen mit CpG-DNA eingesetzt. Der Vorteil besteht in den oft verwendeten, aber in der Natur nicht vorkommenden, Phosphorothioatbindungen, die vor einem Abbau durch Nucleasen schützen, was zu einer längeren Wirkdauer der

DNA auf die Zelle führt. Die folgende Reaktion der Zelle ist dadurch aber auch nicht zwingend die natürliche Reaktion auf bakterielle oder virale DNA.

Um die Immunantwort auf die verschiedenen ODNs zu untersuchen, wurde die Sekretion bzw. Expression drei verschiedener Marker für eine Immunantwort untersucht. Zunächst, über Einsatz der Zellkulturüberstände im ELISA nach 6-stündiger Inkubation, das früh sezernierte Zytokin IL-8 mit der Hauptfunktion der Leukozyten Rekrutierung. Weiterhin das später freigesetzte IL-6 mit einer entscheidenden Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Jones et al., 2005), ebenfalls über den Einsatz der Zellkulturüberstände im ELISA nach 48-stündiger Inkubation. Außerdem wurde noch mittels Real Time PCR die Expression des zum IFN Typ I gehörenden IFN- β untersucht, da CpG-DNA zumindest in Immunzellen eine hohe Sekretion von Typ I Interferonen bewirkt (Hoene et al., 2006; Guzylack-Piriou et al., 2004).

Meine Ergebnisse lassen sich in insgesamt drei Hauptaussagen zusammenfassen. (1) CpG-DNA D19^{chimäre} löst in Endothelzellen eine Suppression der Zytokinsekretion aus. (2) CpG-DNA D19^{chimäre} bewirkt in Makrophagen eine Steigerung der Zytokinsekretion. (3) Alle eingesetzten DNAs ohne Phosphorothioatbindungen, mit ausschließlich über Phosphodiesterbindungen verknüpften Basen, zeigen keine signifikanten Effekte.

4.1 CpG-DNA D19^{chimäre} Wirkung auf humane Endothelzellen

- (1) stimulatorische CpG-DNA D19^{chimäre} (Hoene et al., 2006) supprimiert signifikant die IL-8 und IL-6 Sekretion sowie meist signifikant die IFN- β Genexpression in ruhenden humanen Endothelzellen.
- (2) CpG-DNA D19^{chimäre} senkt die IL-6 und IL-8 Sekretion und die IFN- β Genexpression in aktivierten humanen Endothelzellen signifikant.

Diese Ergebnisse legen nahe anzunehmen, dass die allgemein sinkende Zytokinsekretion mit einer ebenfalls sinkenden Zellzahl zusammenhängt. In diesem Fall hätte CpG-DNA eine toxische Wirkung auf Endothelzellen. Der durchgeführte Vitalitätsassay zeigt allerdings ein deutliches Zellwachstum über steigenden CpG-DNA Konzentrationen, sodass davon ausgegangen werden muss, dass insgesamt mehr Zellen weniger Zytokin exprimieren bzw. sezernieren.

Dorn et. al haben für Keratinozyten ebenfalls eine sinkende IL-8 Sekretion nach CpG-DNA Inkubation beobachtet. Dieser antiinflammatorische Effekt, der im Gegensatz zu

der in anderen Zellen proinflammatorischen Antwort auf CpG-DNA steht, wird in dieser Arbeit mit einem TLR9 unabhängigen Weg erklärt. Auch Zellen ohne TLR9, oder dem für den Signalweg wichtigen Adapterprotein MyD88, reagierten hier auf den Reiz CpG-DNA mit einer IL-8 Suppression. Pivarsci nimmt in seinem Kommentar zu dieser Arbeit an, es gäbe eine TLR9 abhängige Reaktion auf CpG-DNA, die einer steigenden Immunantwort entspricht, sowie einen TLR9 unabhängigen Signalweg, bei dem es zur Immunsuppression kommt. In der Arbeit von Fitzner et al., die sich mit der sinkenden IL-8 Sekretion von Endothelzellen nach CpG-DNA Inkubation beschäftigt, ist allerdings eine deutliche Anreicherung von MyD88 in endosomalen Strukturen 10 min nach CpG-DNA Inkubation sichtbar. Hier muss also zumindest bei Endothelzellen von einem antiinflammatorischen TLR9 abhängigen Weg ausgegangen werden. Zudem haben Wingender et al. im *in vivo* Maus-Modell festgestellt, dass die Aktivität der cytotoxischen T-Zellen (CTL) vom Applikationsweg der CpG-DNA abhängt. Appliziert man CpG-DNA intravenös, was einem direkten Endothelzellkontakt entspricht, so wird die Aktivität der CTL deutlich supprimiert, es kommt also zu einem antiinflammatorischen Effekt. Nach subkutaner Injektion kommt es hingegen zur Aktivierung der CTL. Diese Beobachtung ist in TLR9 Knockout Mäusen nicht reproduzierbar. Daraus folgt im Wesentlichen, dass auch für diese Downregulation des Immunsystems von einem TLR9 abhängigen Weg ausgegangen werden muss.

Dorn et al. diskutieren weiterhin die Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation für die IL-6 und IL-8 Suppression in Keratinozyten. Zumindest die Suppression der IFN- β Expression in aktivierten HMEC-1 spricht gegen eine solche Regulation. Diese Möglichkeit ist für IL-8 und IL-6 allerdings nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen, da für diese Zytokine die direkte Sekretion mittels ELISA untersucht wurde.

Insgesamt hat CpG-DNA D19^{chimäre} nach Endothelzellkontakt also eine immunsuppressive Wirkung, sodass gerade der Einsatz und der Applikationsweg von CpG-ODN in klinischen Studien neu überdacht werden müsste. CpG-ODN wirken nach Bindung an TLR9 nachweislich nicht auf alle Zellen des Körpers immunstimulatorisch.

4.2 CpG-DNA D19^{chimäre} Wirkung auf humane Makrophagen

- (1) CpG-DNA D19^{chimäre} steigert signifikant die IL-8 Sekretion in ruhenden humanen Makrophagen sowie tendenziell die IFN- β Genexpression.
- (2) Auch in aktivierten humanen Makrophagen steigert CpG-DNA D19^{chimäre} die IL-8 Sekretion und IFN- β Genexpression.

Wie oben bereits erwähnt, injizierten Wingender et al. CpG-DNA auch subkutan. Hier ist der Effekt - genau gegenteilig zu dem der intravenösen Injektion - eine deutliche Aktivierung der CTL. Eine subkutane Injektion trifft nicht primär auf Endothelzellen, sondern auf die in der Unterhaut vorkommenden Immunzellen, also im Wesentlichen Makrophagen und Dendriten.

Makrophagen wurden in dieser Arbeit unter weitgehend identischen Bedingungen wie Endothelzellen untersucht und zeigten *in vitro* eine deutliche inflammatorische Antwort in Form von signifikant gesteigerter Zytokinsekretion und -expression.

Werden ruhende MM6 für 24 Stunden mit CpG-DNA D19^{chimäre} inkubiert, so zeigt sich eine deutlich gesteigerte IL-8 Freisetzung unter steigender DNA Konzentration. Auch die, auf gleiche Weise wie die HMEC-1, untersuchte IFN- β Expression zeigt in ruhenden MM6 eine steigende Tendenz über steigende DNA Konzentrationen.

Die weiterhin untersuchten THP-1 zeigen ein ähnliches Ergebnis. Hier wird die IL-8 Sekretion durch CpG-DNA D19^{chimäre} allerdings sehr viel höher gesteigert als bei den MM6. Diese Tatsache kann damit zusammenhängen, dass unbehandelte THP-1 nur eine sehr geringe basale IL-8 Sekretion aufweisen.

Nach Voraktivierung mit proinflammatorischen Zytokinen ist in MM6 sowie in THP-1 die CpG-DNA D19^{chimäre} immer noch in der Lage eine signifikante IL-8 Sekretionssteigerung hervorzurufen (ca. Faktor 3). Nach Voraktivierung kann also bei beiden Makrophagenzelllinien nur die DNA mit CpG Motiv und umgebenden Phosphorothioatbindungen nennenswerte IL-8 Sekretionssteigerungen erzielen.

Unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei den Endothelzellen zeigten als Beispiel für Immunzellen Makrophagen, bei denen bereits eine immunstimulatorische Reaktion auf CpG-DNA beschrieben ist (Stacey et al., 2000), eine Sekretions- bzw. Genexpressionssteigerung aller in dieser Arbeit untersuchten Zytokine.

Diese Ergebnisse gleichen denen in der aktuellen Literatur und stehen im Gegensatz zur immunsuppressiven Reaktion der Endothelzellen auf CpG-DNA D19^{chimäre}. Somit ist nachgewiesen, dass die Downregulation der inflammatorischen Zytokine und damit der Immunantwort zellspezifisch für die Endothelzellen ist.

4.3 Wirkungen der Kontroll-DNAs

Die Kontroll DNAs ohne Thioatbindungen zeigten im Wesentlichen keinen signifikanten Effekt auf die Zytokinsekretion. So konnte weder bei ruhenden HMEC-1 noch bei ruhenden MM6 eine DNA ohne PTO Bindung, egal ob mit oder ohne CpG Motiv, eine signifikante IL-8 Sekretionsänderung auslösen. Ein überraschendes Ergebnis zeigte bei den ruhenden MM6 die Kontroll DNA^{PTO} (ohne CpG Motiv mit ausschließlichen Phosphorothioatbindungen). Nach 24-stündiger Inkubation kam es zu einer deutlichen IL-8 Sekretionssteigerung bereits bei geringerer Konzentration als bei CpG-DNA D19^{chimäre}. Außerdem kam es bei den maximal eingesetzten 10µM zu einer relativ höheren IL-8 Freisetzung im Vergleich zur CpG-DNA D19^{chimäre}.

Bei den ruhenden THP-1 zeigt sich ein ganz ähnliches Ergebnis. Allerdings sind im ruhenden Zustand in dieser Makrophagenzelllinie alle Kontroll DNAs in der Lage einen IL-8 steigernden aber nicht signifikanten Effekt hervor zu rufen. Gegenüber der CpG-DNA D19^{chimäre} sind diese Effekte aber so gering, dass sie vernachlässigt werden können. (s. Abb.3-13, 3-16, 3-18).

Bei voraktivierten HMEC-1, MM6 und THP-1 konnte keine der Kontroll DNAs eine IL-8 Sekretionsänderung bewirken. Im proinflammatorischen Stadium scheinen also das CpG-Motiv und die zusätzlich umgebenden PTO Bindungen der CpG-DNA D19^{chimäre} eine entscheidende Rolle in der immunsuppressiven Wirkung zu spielen.

Sester et al. haben sich mit der Frage beschäftigt, welchen Unterschied die „künstliche“ Phosphorothioatbindung gegenüber der „natürlichen“ Phosphodiesterbindung in ODNs hat. Zum einen werden die Diesterbindungen zytosolisch sehr viel schneller durch Nucleasen gespalten, die Thioatbindungen sind also stabiler und die ODNs folglich länger intakt. Zum anderen zeigte sich eine erheblich schnellere Aufnahme der ODNs mit Thioatbindungen in die Zelle. Bei den ruhenden MM6 passt diese Annahme insofern als die Kontroll DNA mit ausschließlichen PTO Bindungen eine wesentlich schnellere (raschere Aufnahme) sowie eine signifikant höhere (länger stabil) IL-8 Sekretion im Gegensatz zu der, zumindest teilweise über Phosphodiester verbundenen, CpG-DNA D19^{chimäre} bewirkt. Die voraktivierten MM6 zeigen keine signifikante IL-8 Sekretionsänderung nach Inkubation mit Kontroll DNA^{PTO}. Diese Tatsache spricht dafür, dass es nicht nur auf die höhere Stabilität und die schnellere Aufnahme von PTO Bindungen, sondern - zumindest in der Entzündungsreaktion - auch auf das unmethylierte CpG Motiv, geschützt von umgebenden Thioatbindungen, ankommt. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Voraktivierung die Stabilität und/oder Aufnahme der ODNs

beeinflusst. Zu dieser Annahme passen auch die ähnlich ausgefallenen Ergebnisse der THP-1.

In den Endothelzellen kann auch die Kontroll DNA^{PTO}, analog zu allen anderen Kontroll DNAs, weder raschere noch länger anhaltende Effekte als die CpG-DNA D19^{chimäre} hervor rufen. Bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden könnte der von Sester et al. beschriebene Effekt der längeren Stabilität von Thioatbindungen beeinträchtigt sein. Bei längerer Inkubation könnte die Kontroll DNA^{PTO} also eventuell noch einen Effekt zeigen. Die von Sester et al. beschriebene schnellere Aufnahme ist hingegen unwahrscheinlich, da CpG DNA D19^{chimäre} bei gleicher Inkubationszeit im Gegensatz zur Kontroll DNA^{PTO} eine signifikante IL-8 Suppression bewirken kann

Ein Zusammenhang zwischen der suppressiven und stimulierenden Wirkung von CpG-DNA und der jeweiligen ODN Länge nehmen Dorn et al. an. So sollen kurze ODN Sequenzen weniger suppressiv wirken als lange, die kritische Länge wird mit 16 Basenpaaren angegeben. Alle in dieser Arbeit verwendeten DNAs liegen oberhalb dieser Grenze. Eine signifikante Suppression der IL-8 Antwort in Endothelzellen war nur mit CpG-DNA D19^{chimäre} möglich. Die anderen, ebenso langen Kontroll ODNs, hatten keinen signifikanten Effekt, sodass diese antiinflammatorische Wirkung – zumindest in Endothelzellen - nicht allein mit der ODN Länge zusammenhängen kann. Vielmehr zeigte sich, insbesondere in der proinflammatorischen Phase, dass die Kombination zwischen unmethyliertem CpG-Motiv und umgebenden PTO-Bindungen entscheidend ist.

Diese Ergebnisse sprechen bei Endothelzellen gegen eine CpG-Motiv unabhängige IL-8 Suppression.

Die immunsuppressive Reaktion der Endothelzellen auf CpG-DNA D19^{chimäre} ist demnach wie oben beschrieben nicht nur zellspezifisch, sondern vor allem bei voraktivierten Zellen auch sequenzspezifisch für diese Typ A CpG-DNA.

		Ruhend				Aktiviert			
		D19 ^{chimär}	D19 ^{PDE}	Ko ^{PTO}	Ko ^{PDE}	D19 ^{chimär}	D19 ^{PDE}	Ko ^{PTO}	Ko ^{PDE}
IL-6	HMEC-1	-				↓			
	HDMEC	↓				↓			
	MM6	-				-			
	THP-1	-				-			
IL-8	HMEC-1	↓	→	→	→	↓	→	→	→
	HDMEC								
	MM6	↑	→	↑		↑	→	→	
	THP-1	↑↑↑	↑	↑	↑	↑	→	→	→
IFN-β	HMEC-1	→				↓			
	MM6	→				→			
		- nicht detektierbar	↑	signifikante Steigerung					
		↓	signifikante Senkung		↑↑↑	hochsignifikante Steigerung			
			→	kein Effekt					

Tab. 4-1: Übersicht Ergebnisse

5 Zusammenfassung

Toll like Rezeptoren (TLRs) gehören zu den Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) und erkennen Teile von Bakterien, Viren oder Pilzen als körperfremd. TLR9 erkennt speziell bakterielle CpG-DNA. Auf fast allen Zellen des menschlichen Organismus kommen TLRs vor. In Immunzellen lösen sie folgerichtig eine Aktivierung des Immunsystems aus. Überraschenderweise führt die Inkubation mit CpG-DNA der humanen immortalisierten Endothelzellreihe HMEC-1 zu einer verminderten Freisetzung von IL-8 (Fitzner et al., 2008), was eine Suppression des Immunsystems bedeutet.

Ziel dieser Arbeit war es nachzuweisen, dass der immunsuppressive Effekt von CpG-DNA in Endothelzellen zellspezifisch nur in diesen zu beobachten ist und sequenzspezifisch auf CpG-DNA D19^{chimäre} (Typ A CpG-DNA) begrenzt ist.

Zunächst wurde ein zytotoxischer Effekt der CpG-DNA ausgeschlossen, indem über eine Alamar Blue Färbung nachgewiesen wurde, dass die Endothelzellen bei steigender CpG-DNA Konzentration nicht absterben, sondern vielmehr gesteigertes Wachstum zeigen.

Ruhende und mit proinflammatorischen Zytokinen voraktivierte Zellen wurden verglichen um den Unterschied der Reaktion auf CpG-DNA während und außerhalb der Entzündungsreaktion dar zu stellen.

Ruhende sowie aktivierte HMEC-1 zeigten in 3 voneinander unabhängigen Versuchen eine signifikante IL-8 Sekretionssenkung auf den Stimulus steigender Konzentration von CpG-DNA D19^{chimäre}.

Auch eine Suppression der IL-6 Sekretion in aktivierten HMEC-1 konnte nachgewiesen werden. Die ruhenden Zellen sezernierten insgesamt zu wenig IL-6.

Zur weiteren Bestätigung wurden die primären Endothelzellen HDMEC auf die IL-6 Sekretion nach CpG-DNA D19^{chimäre} Inkubation untersucht. Hier zeigte sich bei ruhenden und aktivierten Zellen ebenso eine supprimierte IL-6 Sekretion nach Inkubation. Der immunsuppressive Effekt ist also nicht auf IL-8 begrenzt.

Zum Nachweis der Zellspezifität dieser immunsuppressiven Reaktion von humanen Endothelzellen auf CpG-DNA wurden bei gleichen Versuchsbedingungen auch die humanen Makrophagenzelllinien MM6 und THP-1 auf ihre IL-8 Sekretion nach CpG-DNA Inkubation untersucht. Die IL-8 Freisetzung war hier bei steigender DNA Konzentration durchgängig steigend, die Wirkung von CpG-DNA also immunsteigernd.

Um diesen Unterschied zwischen den zwei verschiedenen Zellarten zu bestätigen wurde mittels Real Time PCR die Expression von IFN- β nach CpG-DNA Inkubation untersucht. Zumindest die Tendenzen gleichen den oben beschriebenen Ergebnissen. In HMEC-1 kommt es nach CpG-DNA Inkubation eher zu einer geringeren IFN- β Expression, die Makrophagen steigern ihre IFN- β Expression tendenziell.

Zum Nachweis der Sequenzspezifität wurden neben der CpG-DNA D19^{chimäre} weitere DNAs in Form von ODNs untersucht. CpG DNA D19^{PDE}, mit gleicher Sequenz wie CpG-DNA D19^{chimäre} allerdings ohne Phosphorothioatbindungen, zeigte in keinem Versuch einen immunrelevanten Effekt. Eine als nicht stimulierend beschriebene Kontroll DNA (kein CpG-Motiv) wurde mit ausschließlichen Phosphodiesterbindungen eingesetzt (Kontroll DNA^{PDE}) sowie nur mit Phosphorothioatbindungen (Kontroll DNA^{PTO}). Erstere zeigte ebenso keine immunogenen Effekte wie CpG-DNA D19^{PDE}. Kontroll DNA^{PTO} konnte als einzige Kontrolle in ruhenden MM6 eine Steigerung der IL-8 Freisetzung erreichen. Dieser Effekt war bei aktivierten MM6 im Gegensatz zur CpG-DNA D19^{chimäre} allerdings aufgehoben. Eine Ausnahme bildeten die ruhenden THP-1 die auf alle Kontroll DNAs eine gesteigerte IL-8 Sekretion zeigten.

Insgesamt reagierten beide humanen Endothelzellarten auf die Inkubation mit CpG-DNA D19^{chimäre} immunsupprimierend, beide humanen Makrophagenzellarten immunsteigernd, was ein Nachweis für die Zellspezifität der immunsupprimierenden Reaktion von Endothelzellen auf CpG-DNA darstellt. Bei fast allen eingesetzten Kontrollen ergab sich in den ruhenden Zellen kein immunrelevanter Effekt, die aktivierten Zellen reagierten nur auf CpG-DNA D19^{chimäre} mit signifikanter Zytokinsekretionssteigerung oder Senkung. Der immunrelevante Effekt ist also im Wesentlichen auf die Typ A CpG-DNA D19^{chimäre} begrenzt.

6 Literaturverzeichnis

Ahlqvist J. (2000)

Swelling of synovial joints – An anatomical, physiological and energy metabolic approach.

Pathophysiology. Apr;7(1):1-19.

Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. (2002)

Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.

Eur J Immunol. Jul;32(7):1958-68

Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. (2006).

Pathogen recognition and innate immunity.

Cell. Feb 24;124(4):783-801

Assier E, Marin-Esteban V, Haziot A, Maggi E, Charron D, Mooney N. (2007)

TLR7/8 agonists impair monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation.

J Leukoc Biol. 81(1):221-8.

Cieslak M, Niewiarowska J, Nawrot M, Koziolkiewicz M, Stec WJ,

Cierniewski CS. (2002)

DNAzymes to beta 1 and beta 3 mRNA down-regulate expression of the targeted integrins and inhibit endothelial cell capillary tube formation in fibrin and matrigel.

J Biol Chem. Mar 1;277(9):6779-87.

Dorn A, Ludwig RJ, Bock A, Thaci D, Hardt K, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R,

Bernd A, Kippenberger S. (2007)

Oligonucleotides suppress IL-8 in skin keratinocytes in vitro and offer anti-inflammatory properties in vivo.

J Invest Dermatol. 846-54.

Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. (2008)

Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands.

Clin Vaccine Immunol. Jan;15(1):138-46

Friedl P, Weigelin B. (2008)

Interstitial leukocyte migration and immune function.

Nat Immunol. Sep;9(9):960-9.

Guzylack-Piriou L, Balmelli C, McCullough KC, Summerfield A. (2004)

Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12.

Immunology. May;112(1):28-37

Häcker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. (2000)

Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6.

J Exp Med. Aug 21;192(4):595-600.

Hartmann G, Krieg AM. (2000)

Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells.

J Immunol. Jan 15;164(2):944-53

Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, 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. Jun;33(6):1633-41.

Hemmrich K, Suschek CV, Lorzynski G, Kolb-Bachofen V. (2003)

iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protecting against oxidative damage.

J Appl Physiol. Nov;95(5):1937-46

Hoene V, Peiser M, Wanner R (2006)

Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19.

J Leukoc Biol. 2006 Dec;80(6):1328-36. Epub 2006 Sep 25.

Hof H., Dörries R. (2005)

Medizinische Mikrobiologie 3. Auflage

S. 62; 100-103

Horner AA, Widhopf GF, Burger JA, Takabayashi K, Cinman N, Ronaghy A, Spiegelberg HL, Raz E. (2001)

Immunostimulatory DNA inhibits IL-4-dependent IgE synthesis by human B cells.

J Allergy Clin Immunol. Sep;108(3):417-23.

Hu J, Jacinto R, McCall C, Li L. (2002)

Regulation of IL-1 receptor-associated kinases by lipopolysaccharide.

J Immunol. Apr 15;168(8):3910-4.

Hume DA, Underhill DM, Sweet MJ, Ozinsky AO, Liew FY, Aderem A. (2001)

Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state.

BMC Immunol.;2:11. Epub 2001 Oct 12.

Jones SA. (2005)

Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6.

J Immunol. Sep 15;175(6):3463-8

Kaisho, T., and S. Akira. (2006).

Toll-like receptor function and signalling.

J Allergy Clin Immunol 117:979

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R,

Koretzky GA,

Klinman DM. (1995)

CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.

Nature. Apr 6;374(6522):546-9.

Krieg AM. (2006)

Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation.

Nat Rev Drug Discov. Jun;5(6):471-84.

Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT. (2004)

Mechanisms of TLR9 activation.

J Endotoxin Res. 2004

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF,

Lien E,

Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. (2004)

TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.

Nat Immunol. 5(2):190-8.

Liu X, Yao M, Li N, Wang C, Zheng Y, Cao X (2008).

CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages.

Blood. 112(13):4961-70.

Moussian B, Roth S. (2005)

Dorsoventral axis formation in the Drosophila embryo-shaping and transducing a morphogen gradient.

Curr Biol.;15(21):R887-99.

Nau GJ, Schlesinger A, Richmond JF, Young RA. (2003)

Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria.

J Immunol. May 15;170(10):5203-9.

Pivarcsi A. (2007)

Toll-like receptor 9-independent suppression of skin inflammation by oligonucleotides.

J Invest Dermatol. Apr;127(4):746-8.

Razin A, Friedman J (1981)

DNA methylation and its possible biological roles.

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.;25:33-52

Reimer T, Schweizer M, Jungi TW.(2007)

Type I IFN induction in response to *Listeria monocytogenes* in human macrophages: evidence for a differential activation of IFN regulatory factor 3 (IRF3).

J Immunol. Jul 15;179(2):1166-77

Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. (2000)

Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA.

J Immunol. 2000 Oct 15;165(8):4165-73.

Stacey KJ, Sester DP, Sweet MJ, Hume DA. (2000)

Macrophage activation by immunostimulatory DNA.

Curr Top Microbiol Immunol;247:41-58. Review.

Takeda, K., and S. Akira. (2005).

Toll-like receptors in innate immunity.

Int Immunol 17:1.

Wingender G, Garbi N, Schumak B, Jüngerkes F, Endl E, von Bubnoff D, Steitz J, Striegler J, Moldenhauer G, Tüting T, Heit A, Huster KM, Takikawa O, Akira S, Busch DH, Wagner H, Hämmerling GJ, Knolle PA, Limmer A. (2006)

Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO.

Eur J Immunol. Jan;36(1):12-20.

Yamada H, Ishii KJ, Klinman DM. (2004)

Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit CpG-induced inflammation of the mouse lung.

Crit Care Med. Oct;32(10):2045-9

7 Danksagung

Ich danke Fr. Prof. Victoria Kolb-Bachofen für die Überlassung dieses aktuellen Themas und die in allen Belangen optimale Betreuung.

Außerdem danke ich der Forschungsgruppe Immunbiologie der Universität Düsseldorf für die angenehme Arbeitsatmosphäre und hier besonders Fr. Dr. Nicole Fitzner für das Anlernen im Labor und eine ebenso optimale Betreuung bei der Versuchsdurchführung und dem Schreiben dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die bedingungslose, nicht nur finanzielle, Unterstützung, meiner Schwester für mühevollen Korrekturen und Dominik zum einen für die nie endende Hilfsbereitschaft bei Problemen mit Excel und der Formatierung dieser Arbeit und zum anderen für unersetzliche Unterstützung im gesamten Studium und Leben.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Lisa Zahner

Geburtsdatum: 09.05.1984

Geburtsort: Solingen

Adresse: Unterhaunstädter Weg 6, 85055 Ingolstadt

Schule

08/1990 – 08/1994

Grundschule Yorckstr, Solingen

08/1994 – 06/2003

Gymnasium Vogelsang, Solingen

Studium

10/2003 – 06/2010

Studium der Humanmedizin,
Heinrich Heine Universität Düsseldorf

10/2005

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

02/2009 – 02/2010

PJ Sana Kliniken Gerresheim, Düsseldorf

Wahlfach: Radiologie

06/2010

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Wissenschaftliche Arbeit

10/2007-06/2010

Erstellen der Doktorarbeit in der
Forschungsgruppe Immunbiologie
unter Fr. Prof. Dr. Viktoria Kolb-Bachofen