

**Neue Wirkprinzipien im Bereich  
Immunmodulation / Anti-Irritation an  
epidermalen Zellen**

Untersuchungen zur IL-8-Suppression und Induktion anti-  
mikrobieller Peptide durch Oligodeoxynukleotide in  
humanen Keratinozyten

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
in den Naturwissenschaften**



vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Annette Dorn  
aus Frankfurt / Main

Frankfurt am Main 2008

(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. V. Müller

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn

2. Gutachter: Herr PD Dr. S. Kippenberger

Datum der Disputation: 02.06.2008

Die vorliegende Dissertation wurde unter Betreuung von  
Herrn Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn, Arbeitskreis Kinematische Zellforschung,  
extern im Biochemischen Labor des Zentrums der  
Dermatologie und Venerologie  
am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Bernd  
und Herrn PD Dr. S. Kippenberger,  
im Rahmen der Arbeitsgruppe „Anti-inflammatorische Biopolymere“ der  
Firma Phenion GmbH & Co. KG (Henkel KGaA) in Düsseldorf  
unter der Leitung von Frau Dr. A. Sättler  
durchgeführt.

Jede Form ist das erstarrte Momentbild eines Prozesses.

Also ist das Werk Haltestelle des Werdens.

Und nicht erstarrtes Ziel.

El Lissitzky 1924

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Immunabwehr des Menschen.....	1
1.1.1 Immunmodulatorische Oligodeoxynukleotide .....	6
1.2. Aufbau und Funktion humaner Haut .....	13
1.2.1 Hauteigene anti-mikrobielle Substanzen .....	17
1.2.2 Wichtige Inflammations-Mediatoren der Haut.....	23
1.3 Arbeitshypothese .....	28
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
2.1 Oligodeoxynukleotide.....	30
2.1.1 Methylierung von CpG-1-PTO .....	31
2.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Darstellung kleiner DNA-Fragmente .....	31
2.2 Zellkultur .....	33
2.2.1 Material und Geräte der Zellkultur .....	33
2.2.2 Lösungen und Medien der Zellkultur .....	33
2.2.3 Verwendete Zellen in Mono- und Multilayern.....	34
2.2.4 Isolierung primärer Keratinozyten .....	37
2.2.5 Passagieren und Aussäen der Zellen .....	38
2.2.6 UVB-Bestrahlung der Zellen .....	40
2.3 Interleukin – ELISA .....	40
2.4 Transformation und Plasmid-Extraktion .....	42

---

2.5 Transfektion .....	44
2.6 Western Blot Analyse.....	46
2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli)....	47
2.6.2 Western Blot .....	49
2.7 Analyse der Zellproliferation .....	51
2.8 Analyse der Zytotoxizität.....	53
2.9 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	54
2.9.1 Gewinnung nuklearer Extrakte .....	55
2.9.2 Proteinbestimmung nach Lowry .....	56
2.9.3 Vorbereitung der Proben und Gelelektrophorese .....	56
2.10 Herstellung histologischer Präparate .....	59
2.10.1 Fixierung der Proben und HE-Färbung.....	59
2.10.2 Immunhistochemie .....	60
2.11 Quantitative Real-Time-PCR.....	62
2.11.1 RNA-Isolierung .....	62
2.11.2 Reverse Transkriptions-PCR .....	63
2.11.3 <i>Real-time</i> PCR.....	64
2.12 Luciferase – Reporter – Assay.....	65
2.13 Aufnahme fluoreszierender ODN in Keratinozyten- Monolayer.....	67
2.14 Topische Applikation von ODN auf 3D-Hautmodelle .....	68
2.15 Induktion einer Kontakt-Dermatitis im Maus-Modell.....	70
2.16 Hemmhofstest zur Bestimmung anti-mikrobiell wirksamer Peptide .....	71
2.17 Weitere Substanzen.....	72
2.18 Statistik .....	72
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>73</b>
3.1 ODN mit und ohne CpG-Motiv bewirken eine IL-8- Suppression <i>in vitro</i> .....	73

---

3.2 ODN-Aufnahme, -Penetration und -Transport.....	77
3.3 CpG- und Non-CpG-ODN vermitteln ihre IL-8- suppressive Wirkung unabhängig von TLR9 .....	84
3.4 ODN-vermittelte Effekte auf DNA-Synthese und LDH-Ausschüttung .....	90
3.5 Non-CpG-5-PTO übt einen anti-inflammatorischen Effekt <i>in vivo</i> aus.....	91
3.6 ODN bewirken eine Induktion hauteigener anti-mikrobieller Peptide mittels NFκB-Aktivierung .....	93
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>102</b>
4.1 ODN mit und ohne CpG-Motiv bewirken eine IL-8- Suppression <i>in vitro</i> .....	102
4.2 ODN-Aufnahme, -Penetration und -Transport.....	105
4.3 CpG- und Non-CpG-ODN vermitteln ihre IL-8- suppressive Wirkung unabhängig von TLR9 .....	107
4.4 ODN-vermittelte Effekte auf DNA-Synthese und LDH-Ausschüttung .....	112
4.5 Non-CpG-5-PTO übt einen anti-inflammatorischen Effekt <i>in vivo</i> aus.....	112
4.6 ODN bewirken eine Induktion hauteigener anti-mikrobieller Peptide mittels NFκB-Aktivierung .....	114
4.7 Ausblick .....	121
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>7. Index verwendeter ODN-Sequenzen (ausfaltbar).....</b>	<b>157</b>
<b>8. Publikationen .....</b>	<b>158</b>

<b>9. Danksagung .....</b>	<b>160</b>
<b>10. Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>162</b>
<b>11. <i>Curriculum vitae</i>.....</b>	<b>163</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Mechanismen der CpG-DNA-vermittelten angeborenen und erworbenen Immunantwort. ....	8
Abbildung 1.2: CpG-ODN in möglichen immun-therapeutischen Ansätzen.....	11
Abbildung 1.3: Schematische Gliederung der Epidermis .....	14
Abbildung 1.4: Signalwege und wichtige Inflammations-Mediatoren bei Hautreizungen.....	24
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung eines IL-8-Homodimers und Struktur eines typischen Chemokin-Rezeptors .....	26
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des elektrostatischen Potentials von IL-8 .....	27
Abbildung 2.1: Histologischer Vergleich zwischen Phenion-Vollhautmodell und menschlicher Haut.....	37
Abbildung 2.2: Versuchsaufbau zur Penetration Fluoreszenzgekoppelter ODN in 3D-Hautmodelle .....	69
Abbildung 3.1: Oligonukleotide mit und ohne CpG-Motiv bewirken die Suppression sowohl basaler als auch TNF $\alpha$ -induzierter IL-8 Level .....	74
Abbildung 3.2: Keine Beeinflussung der CpG-1-PTO- und Non-CpG-5-PTO- vermittelten IL-8-Suppression durch ineffektive Hexamere. ODN-Rückgrat-Modifizierungen verändern den IL-8-supprimierenden Effekt von CpG-1-PTO .....	75
Abbildung 3.3: Immunhistochemische Färbung gegen IL-8 am Phenion <sup>®</sup> 3D-Hautmodell .....	76
Abbildung 3.4: Der intrazelluläre Transport der ODN ist längenabhängig .....	78
Abbildung 3.5: Der intrazelluläre Transport der ODN ist sequenzabhängig .....	79
Abbildung 3.6 (a): Penetration von Cy3-markiertem CpG-1-PTO und CpG-9-PTO in das Phenion <sup>®</sup> 3D Hautmodell.....	81
Abbildung 3.6 (b): Penetration von Cy3-markiertem Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-5G-PTO in das Phenion <sup>®</sup> 3D Hautmodell.....	82
Abbildung 3.6 (c): Keine Penetration von Cy3-markiertem Non-CpG-6-PTO in das Phenion <sup>®</sup> 3D Hautmodell und unbehandelte Kontrolle .....	83

---

Abbildung 3.7: Keine Beeinflussung der ODN-vermittelten IL-8-Suppression durch veränderte Endosomen-Ansäuerung .....	84
Abbildung 3.8: TLR9 ist an der CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO vermittelten IL-8-Suppression nicht beteiligt.....	86
Abbildung 3.9: ODN-vermittelte IL-8-Suppression tritt auch bei Behandlung von konditioniertem Medium in Abwesenheit von Zellen auf.....	88
Abbildung 3.10: ODN-induzierte IL-6-Suppression tritt bei Inkubation von HaCaT-Keratinocyten deutlich auf, bei der Behandlung von konditioniertem Medium nur marginal ...	89
Abbildung 3.11: ODN zeigen leichte Sequenz-spezifische Effekte auf den 5-Bromodeoxyuridin-Einbau, jedoch keinen Einfluss auf die LDH-Freisetzung von HaCaT-Keratinocyten .....	90
Abbildung 3.12: Non-CpG-5-PTO reduziert die Ohrschwellung und Neutrophileninfiltration in DNFB-sensibilisierten Mäusen.....	92
Abbildung 3.13: ODN-stimulierte HaCaT-Keratinocyten sind in der Lage, anti-mikrobielle Peptide zu synthetisieren.....	94
Abbildung 3.14: Induktion von Psoriasin, HbD2 und HbD3 im Phenion® 3D-Hautmodell nach topischer Applikation verschiedener ODN.....	96
Abbildung 3.15: Induktion des HbD2-Promotors durch ODN .....	98
Abbildung 3.16: Induktion der NFkB-Aktivität in HaCaT-Keratinocyten durch ODN .....	100
Abbildung 3.17: Eine NFkB-Inhibition verhindert eine ODN-vermittelte Induktion der HbD2-Promoteraktivität .....	101
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung einer G-Tetrade und G-Quadruplexen .....	106
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des elektrostatischen Potentials von IL-8 und eine mögliche Wechselwirkung mit DNA .....	111
Abbildung 4.3: Regulation von basaler und induzierter IL-8-Transkription .....	119

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems im Vergleich.....	4
Tabelle 2: Eigenschaften der verschiedenen CpG-ODN-Klassen.....	9
Tabelle 3: Herkunft und Synthese einiger $\alpha$ - und $\beta$ -Defensine.....	22
Tabelle 4: Zellzahl und Mediumvolumina zur Aussaat bei Versuchen.....	39

## Abkürzungsverzeichnis

Ali	<i>Air liquid interface</i>
AMP	anti-mikrobielle Peptide
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BPE	<i>bovine pituitary extract</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CCR6	C-Chemokin-Rezeptor 6
Cif	<i>colostrom inhibitory factor</i>
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
Cy	Carbocyanin
DC	<i>dendritic cell</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonucleicacid
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol

---

EDTA	Ethylendiamintetraaceticacid-Disodium
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoassay</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HaCaT	<i>Human adult high Calcium high Temperature</i>
HbD	Human $\beta$ -Defensin
HBSS	<i>Hanks Basal Sodium Saline</i>
HD	Human $\alpha$ -Defensin
H&E	Hämatoxilin & Eosin
HNP	<i>Human Neutrophil Peptide</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
IFN- $\alpha\beta$ R	IFN- $\alpha\beta$ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	inhibitorische $\kappa$ B
IKK	inhibitorische $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1-R	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK	<i>Interleukin-1-Receptor Associated Kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
IRG	<i>immunoresponsive gene</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminale Kinase</i>
kDa	Kilodalton
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LDH	Laktat Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucin-Rich Repeats</i>
LZ	Langerhans-Zellen
MAPKKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant Protein-1</i>

---

MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MIP-3 $\alpha$	<i>macrophage inflammatory protein 3<math>\alpha</math></i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i>
NK	<i>Natural Killer (cell)</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NRF	<i>NF<math>\kappa</math>B-repressing factor</i>
OCT-1	Oktamer-1
ODN	Oligodeoxynukleotide
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDC	<i>plasmacytoid Dendritic Cells</i>
PDE	Phosphodiester
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKC	Protein Kinase C
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
pIDNA	Plasmid-DNA
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMN	polymorphonukleare Zellen (Neutrophile)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PTO	Phosphorothioat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleicacid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkultur-Medium)
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )

STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math> activated kinase 1</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
T/E	Trypsin/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th	T-Helfer
TIR	Toll / Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Treg	regulierende T-Zelle(n)
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonalaureat
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Immunabwehr des Menschen

Um sich gegen eindringende Mikroorganismen verteidigen zu können, besitzt der menschliche Körper zwei unterschiedliche immunologische Systeme. Man unterscheidet zwischen dem phylogenetisch konservierten, schnell reagierenden angeborenen Immunsystem des Menschen und einem langsamer reagierenden, spezifischeren, erworbenen Immunsystem, bei dessen Aktivierung durch Gen-Rearrangement Antikörper gegen nahezu jedes erdenkliche Antigen entstehen (Janeway und Medzhitov 2002; Staros 2005, Borghesi und Milcarek 2007). Wurden angeborenes und erworbenes Immunsystem früher isoliert und unabhängig voneinander gesehen, weiß man heute, dass sie kompliziert miteinander verwoben arbeiten und dass das erworbene Immunsystem wichtige Informationen über das *Ob*, *Wann*, *Wie* und *Wo* einer Reaktion durch das angeborene Immunsystem vermittelt bekommt.

Eingedrungene Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen werden zuerst vom angeborenen Immunsystem als „fremd“ erkannt und lösen eine relativ unspezifische Aktivierung von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) und natürlichen Killerzellen (*natural killer cells*, NKs) – den Zellen des angeborenen Immunsystems – aus (Mosdósi et al. 2002). Das angeborene Immunsystem stellt somit die erste Verteidigungslinie dar, die den Körper gegen eingedrungenes „Fremdes“ schützt. Als „fremd“ werden verschiedene mikrobielle Produkte erkannt, die man als *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) bezeichnet. Der Erkennungsprozess wird über die in der Keimlinie kodierten *pattern recognition receptors* (PRRs) vermittelt (Pasare und Medzhitov 2003), die im Gegensatz zu Rezeptoren des erworbenen Immunsystems kein Gen-Rearrangement benötigen (Janeway und Medzhitov, 2002). Tabelle 1 stellt die Komponenten des angeborenen und erworbenen Immunsystems zum Vergleich gegenüber.

Die am Besten untersuchte Familie der PRRs stellt die Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) dar, die in Säugern aus derzeit 13 identifizierten Rezeptoren besteht, die jeweils unterschiedliche PAMPs erkennen. Diese Rezeptor-Familie ist evolutionär von dem Wurm *Caenorhabditis elegans* bis zu höheren Vertebraten konserviert (Janeway und Medzhitov 2002; Hoffmann 2003; Akira und Takeda 2004; Beutler 2004, Albiger et al. 2007). Obwohl TLRs ursprünglich im Zusammenhang embryonaler Morphogenese entdeckt wurden (Anderson et al. 1985), zeigte sich bald, dass diese Rezeptoren ein großes Spektrum an mikrobiellen Produkten wie zum Beispiel Lipopeptide, Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykan sowie bakterielle und virale DNA detektieren (Medzhitov et al. 1997). TLRs gehören zu Typ I Transmembran-Rezeptoren, die aus einer extrazellulären Domäne mit Leucin-reichen Wiederholungen (*leucine-rich-repeats*, LRR) und einer zytoplasmatischen Signaldomäne bestehen. Die zytoplasmatische Domäne ist homolog zu der des Interleukin-1-Rezeptors (IL-1-R), weshalb diese Domäne Toll/IL-1-R (TIR) Domäne genannt wird (Bowie und O'Neill 2000). Aufgrund ihrer Primärsequenz werden die TLRs in verschiedene Unterfamilien eingeteilt, dessen Mitglieder ähnliche oder verwandte PAMPs erkennen: TLR1, TLR2 und TLR6 detektieren Lipide wie zum Beispiel das Lipoprotein, und Peptidoglykan; die homologen Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR9 erkennen Nukleinsäuren wie einzelsträngige (*single stranded*, ss) RNA, unmethylierte DNA und Nukleinsäurehomologe wie Imidazoquinoline (Tonkinson und Stein 1994; Hemmi et al. 2000) (siehe „1.1.1 Immunmodulatorische Oligodeoxynukleotide“). TLR3 bindet doppelsträngige (*double stranded*, ds) RNA, welche im Lebenszyklus von RNA-Viren gebildet wird. Nur TLR4 ist in der Lage, verschiedene strukturell nicht verwandte Liganden wie LPS, das Fusionsprotein des *respiratory syncytial virus* (RSV), Fibronectin und Hitzeschock-Proteine zu erkennen. Während die meisten TLRs an der Zelloberfläche lokalisiert vorliegen, sind die TLRs 3, 7, 8 und 9 in der endosomalen Membran verankert. Dies führt dazu, dass erst eine Liganden-Internalisierung und ein Liganden-Transport zum Rezeptor stattfinden müssen, bevor es zu einer Rezeptor-Liganden-Bindung

kommen kann (Krieg et al. 1995). Der genaue Mechanismus dieses Prozesses ist bislang unbekannt.

Bei einer Rezeptor-Liganden-Bindung wird in den meisten Fällen die „MyD88-abhängige Signalkaskade“ aktiviert, die mit der Bindung des Adapterproteins *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) an die TIR-Domäne des Rezeptors beginnt (Schnare et al. 2000; Janeway und Medzhitov 2002). Dies löst die Aktivierung der *IL-1-R associated kinase* (IRAK) aus (Suzuki et al. 2002), was wiederum zu einer Aktivierung des *tumour necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF-6) führt. Letzterer interagiert mit dem zytoplasmatischen Ende von CD40 (Ishida et al. 1996), was eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor κB* (NFκB) und somit letztlich die Expression pro-inflammatorischer Gene bewirkt. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Verteidigung gegen eingedrungene Mikroorganismen (van den Broek et al. 1995; Pfeffer et al. 1998) und verbinden das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem (van den Broek et al. 1995; Pfeffer et al. 1998; Biron 2001) (siehe auch „1.1.1 Immunmodulatorische Oligodeoxynukleotide“).

Bei dem „MyD88-unabhängigen Signalweg“, den zum Beispiel TLR3 und TLR4 zusätzlich einschlagen können, werden TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon-β*) und IKKε (inhibitorische κB Kinase ε) aktiviert, was dazu führt, dass der Komplex aus IKKε und TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) zerfällt. Dies wiederum führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *interferon regulatory factor 3* (IRF-3), der Gene wie Interferon-β (IFN-β) und *immunoresponse gene 1* (IRG-1) aktiviert, deren Produkte einen zweiten Aktivierungsschritt auslösen: IFN-β wird über den IFN-αβ-Rezeptor (IFN-αβR) erkannt, der den Transkriptionsfaktor STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) aktiviert, was eine Expression von Interferon-induzierbaren Genen wie *interferon inducible protein 10* (IP-10) und *glucocorticoid attenuated response gene 16* (GARG16) bewirkt (Yamamoto et al. 2004). In Folge kommt es zur Reifung dendritischer Zellen und einer verzögerten Aktivierung (im Vergleich zum MyD88-abhängigen Signalweg) von NFκB und MAPK (Kaisho et al. 2001; Kawai et al. 2001). Es zeigte sich, dass dieser Signalweg in MyD88-defizienten Mäusen beschränkt wird (Kawai et al. 1999) und zusätzlich

zum MyD88-abhängigen Signalweg bei TLR-Aktivierung durch zum Beispiel LPS.

**Tabelle 1:** Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems im Vergleich (Modifiziert nach Janeway und Medzhitov 2002).

	<b>Angeborenes Immunsystem</b>	<b>Erworbenes Immunsystem</b>
<b>Rezeptoren</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- im Genom fixiert</li> <li>- kein Rearrangement nötig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- in Gensegmenten kodiert,</li> <li>- Rearrangement nötig</li> </ul>
<b>Einteilung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nicht-klonal</li> <li>- die Zellen einer Klasse sind identisch</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- klonal</li> <li>- die Zellen einer Klasse sind verschieden</li> </ul>
<b>Erkennung</b>	konservierte molekulare Muster (PAMPs wie z. B. LPS, CpG-DNA, etc.)	Details von molekularen Strukturen, wie Proteine und Peptide
<b>„selbst“- und „fremd“-Differenzierung</b>	perfekt (über evolutionäre Entwicklung herausselektiert)	nicht perfekt (in individuellen somatischen Zellen herausselektiert)
<b>Aktivierungszeit</b>	sofortige Aktivierung der Effektorzellen	verzögerte Aktivierung der Effektorzellen
<b>Antwort</b>	Co-stimulierende Moleküle wie zum Beispiel <ul style="list-style-type: none"> <li>- Zytokine (IL-1<math>\beta</math>, IL-6)</li> <li>- Chemokine (IL-8)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- klonale Expansion</li> <li>- IL-2</li> <li>- Effektorzytokine (IL-4, IFN<math>\gamma</math>)</li> </ul>

CpG, Cytidin-phosphat-Guanosin; IFN, Interferon; IL, Interleukin; LPS, Lipopolysaccharid; PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*.

In der Haut führt eine NF $\kappa$ B-Aktivierung zur Expression von Zytokinen und Chemokinen, von anti-mikrobiellen Peptiden (siehe auch „1.2.1 Hauteigene anti-mikrobielle Substanzen“), Adhäsionsmolekülen, Matrix-Metalloproteasen und anderen Substanzen, die zu einer inflammatorischen, anti-mikrobiellen Antwort beitragen (Madsen et al. 1991; Medzhitov und Janeway 1997; Schitteck et al. 2001; Ganz 2003).

Die TLR-Liganden-Bindung führt in jedem Falle zu einer Aktivierung von Phagozyten, was wiederum eine direkte Vernichtung der Pathogene und einen Ausstoß von pro-inflammatorischen Zytokinen und anti-mikrobiellen Peptiden (siehe auch „1.2.1 Hauteigene anti-mikrobielle Substanzen“) bewirkt (Takeda et al. 2003). Diese pro-inflammatorischen Zytokine und

anti-mikrobiellen Peptide sorgen für die Aktivierung von DCs (Yang et al. 1999), die das Bindeglied zwischen angeborenen und erworbenen Immunsystem darstellen.

Die zellulären Komponenten des erworbenen Immunsystems stellen hauptsächlich die im Blut zirkulierenden T- und B-Lymphozyten dar, die sich dadurch auszeichnen, dass sie erstens flexibel auf nahezu alle erdenklichen Antigene reagieren können und zweitens in verschiedenen Gedächtnis-Zellen Antigene für eine schnellere spezifische Immunantwort bei Re-Infektion speichern (Sallusto et al. 2004). Die Flexibilität, auf beinahe alle erdenklichen Antigene reagieren zu können, wird mittels Rekombination von Antigen-Rezeptor-Genen, was zu flexibel neu gestalteten Rezeptoren führt, gewährleistet. Das erworbene Immunsystem besitzt nicht wie das angeborene ein konstantes Repertoire an fixen Rezeptoren. Antikörper, die von leichten und schweren Immunglobulin (Ig)-Genen kodiert werden, sind die Antigen-Rezeptoren der B-Zellen. Sie liegen sowohl an der Zelloberfläche gebunden vor oder werden sekretiert und werden aufgrund ihrer schweren Kette klassifiziert: IgM, IgG, IgE oder IgA. Sie erkennen die Tertiärstruktur von Proteinen (zusammengefasst in Clark und Kupper 2005). T-Zell-Rezeptoren dagegen sind an der Zelloberfläche gebundene Heterodimere und erkennen Peptide, die zuvor proteolytisch gespalten wurden, oder die Primärstruktur von Proteinen (Aminosäuresequenzen). Zudem müssen Antigene den T-Zell-Rezeptoren präsentiert werden, da eine Erkennung nur stattfinden kann, wenn sie an der Zelloberfläche an *major histocompatibility complex* (MHC) der Klasse I oder II gebunden sind (Rescigno et al. 1998; Guermonprez et al. 2003).

DCs als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem übertragen bei Aktivierung durch das angeborene Immunsystem (mittels Sekretion verschiedener Zytokine und Gewebefaktoren) (Chain 2003) Informationen an T-Zellen, ob, wie und wo im Körper sie zu reagieren haben (Kapsenberg 2003). Zuerst erscheint das Signal Antigen, gebunden an MHC auf der DC-Zelloberfläche, zusammen mit einem zweiten (Co-) Signal, das aktivierend oder inhibierend wirkt. Diese Kombination entscheidet darüber, ob das

Immunsystem reagiert oder nicht. Ein drittes Signal, das von den DCs ausgesendet wird, vermittelt den T-Zellen, wie sie zu reagieren haben: als T-Helfer 1 (Th1), Th2 oder als regulierende T-Zellen (Treg) (Sakaguchi et al. 2001). Zudem erhalten T-Zellen ein viertes Signal von DCs oder ihrer Umgebung, das sie veranlasst, *homing*-Rezeptoren zu synthetisieren, die sie zu den Geweben dirigieren, wo sie wirken sollen (Campbell und Butcher 2002, Kupper und Fuhlbrigge 2004).

Das angeborene Immunsystem ist somit in der Lage, eine ganze Reihe an Informationen an das erworbene Immunsystem zu übertragen, es zu aktivieren, aber auch zu inaktivieren (Toleranz) und sehr spezifische Informationen zu Wirkungsweise und Wirkungsort weiter zu geben.

### **1.1.1 Immunmodulatorische Oligodeoxynukleotide**

Im Jahr 1944 fanden Oswald Theodor Avery und sein Forscherteam heraus, dass Desoxyribonukleinsäure, *deoxyribonucleic acid* (DNA) als Träger der genetischen Erbinformation dient (Avery 1944). Mittlerweile sind jedoch weitere biologische Funktionen der DNA bekannt. So wurde 1893 erstmals entdeckt, dass ein Hitze-inaktiviertes Extrakt von Streptokokken – heute als „Coley’s Toxin“ bekannt – zu einer immunologischen Reaktion in Krebspatienten führt (Coley 1893, 1894). Erst hundert Jahre später wurde erkannt, dass dieser Effekt auf die im Extrakt enthaltene bakterielle DNA zurückzuführen ist, da eine Prä-Inkubation des Extrakts mit DNase dazu führte, dass keine immunologische Antwort mehr erzielt werden konnte (Tokunaga et al. 1984). Weitere Tests zeigten, dass der immunstimulierende Effekt bakterieller DNA und synthetischer Oligodeoxynukleotide (ODN) durch das angeborene Immunsystem vermittelt wird (Tokunaga et al. 1992; Yamamoto et al. 1994; Krieg et al. 1995).

Bakterielle DNA kann aufgrund verschiedener charakteristischer Merkmale als „fremd“ im Vergleich zur eigenen Säuger-DNA unterschieden werden. So liegt bakterielle DNA am Cytidin-Rest unmethyliert vor, wohingegen Säuger-DNA zu 60 – 90% an dieser Stelle methyliert ist (Bird 1985). Des

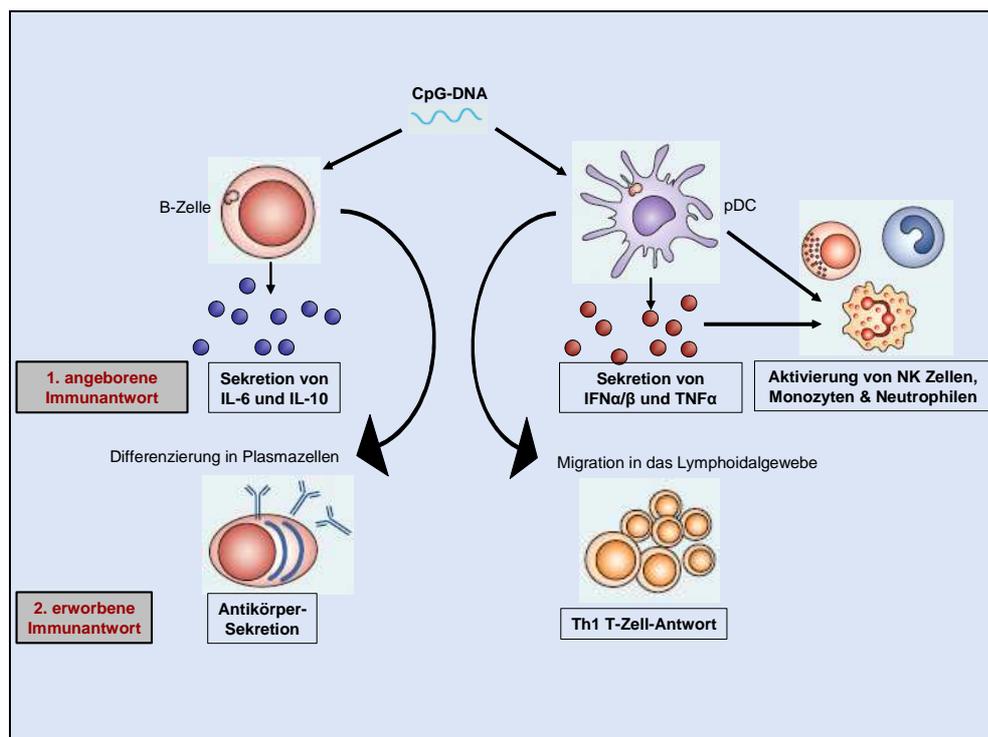
Weiteren besitzt bakterielle DNA charakteristischer Weise eine zentrale palindromische Sequenz, die ein oder mehrere unmethylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) Motive aufweist. Säuger-DNA weist einen wesentlich geringeren Anteil dieser CpG-Motive auf als man aufgrund normaler stochastischer Verteilung annehmen würde (Bird 1987, Hergersberg 1991). Diese charakteristischen Merkmale der bakteriellen DNA dienen dem Immunsystem zur Differenzierung gegenüber körpereigener DNA.

Als Rezeptor für CpG-DNA wurde, wie bereits erwähnt, TLR9 identifiziert (Hemmi et al. 2000) und die für humane Zellen effektivste Sequenz (in Bezug auf die Immunstimulation) lautet: GTCGTT (Hartmann et al. 2000; Bauer et al. 2001). TLR9 ist in der endosomalen Membran lokalisiert, was eine Liganden-Internalisierung und einen Liganden-Transport zum Rezeptor voraussetzt (Krieg et al. 1995). Dies trägt ebenfalls zur Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA bei, da eigene DNA – im Gegensatz zu mikrobieller DNA – normalerweise nicht im Endosom zu finden ist (Barton et al. 2006). Das exakte Trafficking ist noch unklar, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine zelluläre Aufnahme der CpG-DNA über Endozytose stattfindet (Shi und Hoekstra 2004).

TLR9 wird hauptsächlich in humanen B-Zellen und in plasmazytotischen dendritischen Zellen (*plasmacytoid dendritic cells*, pDCs) exprimiert (Bernasconi et al. 2002, 2003; Liu 2005; Abel et al. 2005). Sie wurde jedoch auch in humanen Keratinozyten nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass auch in der Haut die Präsenz des angeborenen Immunsystems eine Rolle spielt (Mempel et al. 2003; Miller et al. 2005; Lebre et al. 2007; Dorn et al. 2007).

Bindet CpG-DNA an TLR9, wird die bereits erwähnte MyD88-abhängige Toll-Signalkaskade aktiviert, was zur Expression von pro-inflammatorischen Genen führt. Hierzu gehören *tumour necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL-6), IL-1 $\beta$ , IL-12p40 (Yamamoto et al. 2004), IL-8 (József et al. 2006), IL-10 und Typ I Interferone wie IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  und IFN $\omega$  (Asselin-Paturel et al. 2005). Diese Zytokine üben eine anti-virale Aktivität aus, sowie eine Reihe weiterer biologischer Effekte auf die Makrophagen-Aktivität, NK-Zell-Aktivität, Th1-Differenzierung, *cytotoxic T lymphocyte*

(CTL) Bildung und Aktivierung, sowie T-Zell-Überleben und Vermehrung (Gursel et al. 2001, Ahmad-Nejad et al. 2002). Sie spielen also eine wichtige Rolle in der Verteidigung des Wirts gegen virale oder bakterielle Infektionen (van den Broek et al. 1995; Pfeffer et al. 1998; Biron 2001). Abbildung 1.1 verdeutlicht den Einfluss, den CpG-DNA auf das angeborene – und mittels pDCs und B-Zellen auch auf das erworbene – Immunsystem ausübt.



**Abbildung 1.1: Mechanismen der CpG-DNA-vermittelten angeborenen und erworbenen Immunantwort.** CpG-DNA aktiviert TLR9 in B-Zellen und plasmazytotoxischen dendritischen Zellen (pDC) und löst damit die schnelle angeborene Immunantwort aus. Diese bewirkt bei B-Zellen die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie das Interleukin (IL) 6, wohingegen IL-10 als Immunregulator zur Begrenzung der inflammatorischen Antwort dient. Im zweiten Schritt wird die Sensitivität gegenüber einer Antigenstimulierung erhöht, was eine Differenzierung der B-Zellen in Antikörper-sekretierende Plasmazellen zur Folge hat. In pDCs wird als Folge einer TLR9-Aktivierung die Sekretion von Tumor Nekrose Faktor (TNF)  $\alpha$  und Typ I Interferonen (IFN) induziert. Diese Mediatoren bewirken eine Aktivierung von natürlichen Killer- (NK) Zellen, Monozyten, Neutrophilen und Th1 T-Zellen. Des Weiteren migrieren stimulierte pDCs in sekundäre lymphoidale Gewebe und erhöhen ihre Expression von co-stimulierenden Faktoren, die wiederum deren Fähigkeit, naive und Gedächtnis- (*memory*) B-Zellen zu aktivieren, erhöhen. (Modifiziert nach Krieg 2006)

Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass der immunstimulierende Effekt synthetischer ODN von der Länge und Sequenz abhängt, sondern auch von den Bindungen des Rückgrats. Während Phosphodiester (PDE) - Bindungen im DNA-Rückgrat relativ schnell durch zelluläre Nukleasen

abgebaut werden, schützen Phosphorothioat (PTO) - Bindungen davor und verlängern somit die Halbwertszeit der ODN. Bei PTO-Bindungen wird in den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats jeweils ein Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt.

Aufgrund ihrer Eigenschaft, höher-geordnete Multimere bilden zu können, teilt man CpG-ODN in drei Gruppen ein: CpG-A- (ehemals CpG-D), CpG-B- (ehemals CpG-K) und CpG-C-ODN, deren Eigenschaften in Tabelle 2 gelistet sind.

**Tabelle 2:** Eigenschaften der verschiedenen CpG-ODN-Klassen (Modifiziert nach Klinman 2004 und Krieg 2006).

ODN Klasse	Beispiel ODN / strukturelle Eigenschaften	Immunmodulierende Eigenschaften
<b>CpG-A</b> (auch CpG-D)	CpG 2216 5'-GGgggacgatcgtcGGGGG-3' - CpG-Motive (blau) mit PDE-Bindungen (kleingeschrieben) und im Palindrom - 3'-Poly-G-Ende	- starke Induktion von pDC zur Sekretion von IFN $\alpha$ - APC Reifung (durch IFN $\alpha$ ) - moderate pDC Reifung - schwache Induktion von B-Zell-Proliferation
<b>CpG-B</b> (auch CpG-K)	PF-3512676 5'-TCGTCTTTTTGTCTTTTTGTCTT-3' - PTO-Rückgrat - mehrere CpG-Motive (blau)	- starke Induktion von B-Zell-Proliferation und pDC Reifung - schwache Induktion von IFN $\alpha$ Sekretion
<b>CpG-C</b>	CpG 2395 5'-TCGTCTTTTTCGGCGCGCGCCG-3' 3'-GCCGCGCGCGCTTTTTGCTGCT-5' - PTO-Rückgrat - mehrere CpG-Motive (blau) - 3'-Palindrom bildet Duplexe (grün)	Kombinierte Effekte aus CpG-A und CpG-B: - B-Zell-Stimulation zur Produktion von IgM und IL-6 - Aktivierung von pDCs zur IFN $\alpha$ -Sekretion

APC, *antigen-presenting cells*; IFN, Interferon; IgM, Immunglobulin M (*mature*); IL, Interleukin; ODN, Oligodeoxynukleotid; pDC, *plasmacytoid dendritic cells*; PDE, Phosphodiester; PTO, Phosphorothioat.

ODN der CpG-A-Klasse sind in der Lage, durch mehrfaches Aneinanderlagern ihrer PTO-geschützten Poly-G-Enden Aggregate zu bilden, die man G-Tetraden nennt (siehe auch „4. Diskussion“). Im

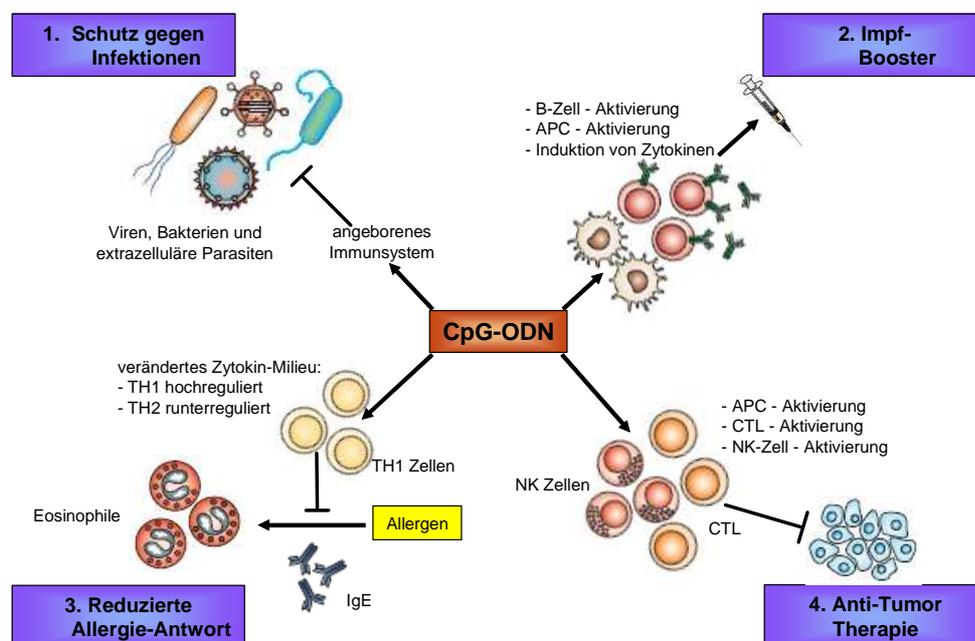
Zentrum dieser ODN liegt meist ein CpG-Motiv, welches von komplementären palindromischen Sequenzen flankiert ist (Ballas et al. 1996; Krug et al. 2001; Verthelyi et al. 2001). Man nimmt an, dass eine mehrfache Faltung der ODN zur Bildung von Nanopartikeln führt (Kerkmann et al. 2005). CpG-A-ODN induzieren vor allem pDCs zur Sekretion von IFN $\alpha$ ; sie bewirken weniger die Reifung der pDCs und sind nur schwache Stimulatoren für B-Zellen (Krug et al. 2001).

CpG-ODN der Klasse B zeichnen sich durch ein durchgehendes PTO-Rückgrat aus und bilden normalerweise keine höheren Aggregate. Diese ODN induzieren die Reifung von naiven und Gedächtnis- (*memory*) B-Zellen in Plasmazellen und bewirken eine Sekretion von TNF $\alpha$ . Des Weiteren induzieren sie Überleben und Differenzierung von pDCs, wohingegen sie nur sehr schwach die Sekretion von IFN $\alpha$  anregen. Die von CpG-B-ODN aktivierte Signalkaskade führt, wie bereits oben erwähnt, zur Aktivierung von NK-Zellen und CTL, was letztlich in der Sekretion von Zytokinen wie IFN $\gamma$  und IL-12 mündet, die ein Th1-Milieu hervorrufen (Klinman et al. 1996; Ballas et al. 1996; Halpern et al. 1996). Dies macht CpG-B-ODN zu effizienten Th1-Milieu-Induktoren mit einem Anti-Tumor-Effekt (Hartmann et al. 2000; Gursel et al. 2002).

CpG-C-ODN weisen ein PTO-Rückgrat und 3'-palindromische Sequenzen auf, welche zur Bildung von Duplexen führen. ODN dieser Klasse scheinen kombinierte immunologische Eigenschaften der Klassen A und B zu besitzen, da sie zu einer mittelmäßigen Induktion von IFN $\alpha$  in pDCs und zu einer starken Aktivierung von B-Zellen führen (Hartmann et al. 2003; Marshall et al. 2003; Vollmer et al. 2004).

Die verschiedenen biologischen Effekte, die von den unterschiedlichen CpG-ODN-Klassen hervorgerufen werden, hängen vermutlich eng mit der Ausbildung von Sekundär- oder Tertiär-Strukturen zusammen, die einen unterschiedlichen Transport und ein unterschiedliches *Signalling* in den Zellen hervorrufen (Kerkmann et al. 2005). Die verschiedenen Eigenschaften der CpG-ODN werden in unterschiedlichen immuntherapeutischen Ansätzen genutzt (zusammengefasst in Dorn und Kippenberger 2008). Bislang werden CpG-ODN in vier Therapiebereichen experimentell erprobt, die in Abbildung 1.2 schematisch

dargestellt sind. Zum einen dient die Stimulierung des angeborenen Immunsystems dem Schutz gegen infektiöse Pathogene (Krieg et al. 1998; Klinman et al. 1999-1; Elkins et al. 1999). Des Weiteren verstärken CpG-ODN die humorale und zellvermittelte Immunantwort gegen Proteine wie beispielsweise Antigenen in Impfstoffen (Davis et al. 1998; Klinman 1998; Klinman et al. 1999-2; Gursel et al. 2001; Cong et al. 2007; Linghua et al. 2007). Dies führt bei CpG-ODN-versetzten Impfstoffen zu einer deutlich erhöhten Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und somit zu einer signifikant gesteigerten Aktivierung des erworbenen Immunsystems. CpG-ODN fungieren hier als so genannte Impf-Booster.



**Abbildung 1.2: CpG-ODN in möglichen immun-therapeutischen Ansätzen.** Erstens simulieren CpG-ODN eingedrungenes „Fremdes“ und induzieren somit das angeborene Immunsystem als Schutz vor Infektionen durch mögliche Pathogene. Zweitens unterstützen CpG-ODN die Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) und führen zu einem Zytokin/Chemokin-Milieu, das eine Reaktion des angeborenen Immunsystems auf co-applizierte Vaccine verstärkt. Drittens stimulieren CpG-ODN in Kombination mit Allergenen eine Antigen-spezifische T-Helfer 1 (Th1) – Zell-Antwort während das Allergie- und Asthma-typische Th2-Zytokin-Milieu unterdrückt wird. Viertens bewirken CpG-ODN eine Aktivierung von natürlichen Killer (NK) – Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL), die auf Tumorgewebe gerichtet sind. (Modifiziert nach Klinman 2004)

Weiterhin stimulieren CpG-ODN in Kombination mit Allergenen eine Antigen-spezifische Th1-Zellantwort, die das Entstehen einer Th2-Zell-vermittelten allergischen Reaktion verhindert (Sur et al. 1999). Dies ist in

der Therapie von allergischen und asthmatischen Erkrankungen wünschenswert. Des Weiteren aktivieren CpG-ODN NK-Zellen und CTLs mit einem Anti-Tumor-Effekt, was neue Perspektiven in der Krebstherapie eröffnet (Hartmann et al. 2000; Gursel et al. 2002; Inoue und Aramaki 2007).

Interessanterweise konnte außerdem gezeigt werden, dass auch ODN, die kein klassisches CpG-Motiv beinhalten und ursprünglich als Kontroll-ODN zu CpG-ODN mitgeführt wurden, einen Effekt auf das Immunsystem ausüben. Diese Stimulierung ist nicht so stark ausgeprägt wie die CpG-ODN vermittelte, jedoch ebenfalls signifikant (Vollmer et al. 2002). In humanen B-Zellen ist der stimulierende Effekt abhängig vom ODN-Rückgrat, der Anzahl der Thymidin-Nukleobasen und der Moleküllänge (Hutcherson und Glover 1998; Vollmer et al. 2002, 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass diese so genannten Non-CpG-ODN eine Th2-Immunstimulation ohne Th1-Milieu-Zytokinen und -Chemokinen anregen (Sano et al. 2003; Vollmer et al. 2004). Überraschenderweise scheint auch bei der Erkennung von Non-CpG-ODN TLR9 – der Rezeptor verantwortlich für die CpG-Erkennung – eine Rolle zu spielen, wie an TLR9-defizienten Mäusen untersucht wurde (Vollmer et al. 2004). Neben der Stimulierung des Immunsystems konnte für Non-CpG-ODN auch eine anti-tumorale Wirkung gezeigt werden, da sechs Basen lange Nukleotide der Sequenz 5'-G<sub>3</sub>xG<sub>2</sub>-3' (x steht für eine beliebige Base) eine Induktion von IL-12 hervorriefen (Filion et al. 2003). IL-12 ist in der Lage, die Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen und T-Zellen zu induzieren und Tumor-Angiogene durch IFN $\gamma$ -abhängige Synthese des Chemokins IP-10 zu inhibieren. (Kozar et al. 2003; Mazzolini et al. 2003; Portielje et al. 2003). Zudem zeigte sich, dass diese Guanin-reichen Sequenzen synthetischer ODN sowohl anti-proliferativ als auch Apoptose-induzierend wirken, was ebenfalls in der Krebs-Therapie von Bedeutung ist (Filion et al. 2004).

Im Gegensatz zu dem immunstimulierenden Effekt von CpG-ODN und den meisten Non-CpG-ODN wurden jedoch auch einige Non-CpG-ODN identifiziert, die einen immunsuppressiven Effekt ausüben. Darunter befinden sich Sequenzen, die folgende Hexanukleotide in Wiederholungen

aufweisen: TTAGGG. Dieses Motiv kommt in Säugern vermehrt in der Telomer-Region vor und wird bei Verletzungen der Zellen mit der genomischen DNA ausgeschüttet (de Lange und Jacks 1999; Blasco et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Sequenzen, die dieses Motiv beinhalten, die Synthese von pro-inflammatorischen und Th1- Zytokinen herunterregulieren (Yamada et al. 2002; Zeuner et al. 2002; Gursel et al. 2003). Der Mechanismus, wie diese ODN zellulär wirken, ist noch unklar, es scheint jedoch, dass sie direkt an die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT4 binden und deren Phosphorylierung verhindern. Als Konsequenz daraus werden Gene, die inflammatorische und auto-immune Bedingungen schaffen, supprimiert (Shirota et al. 2004, 2005).

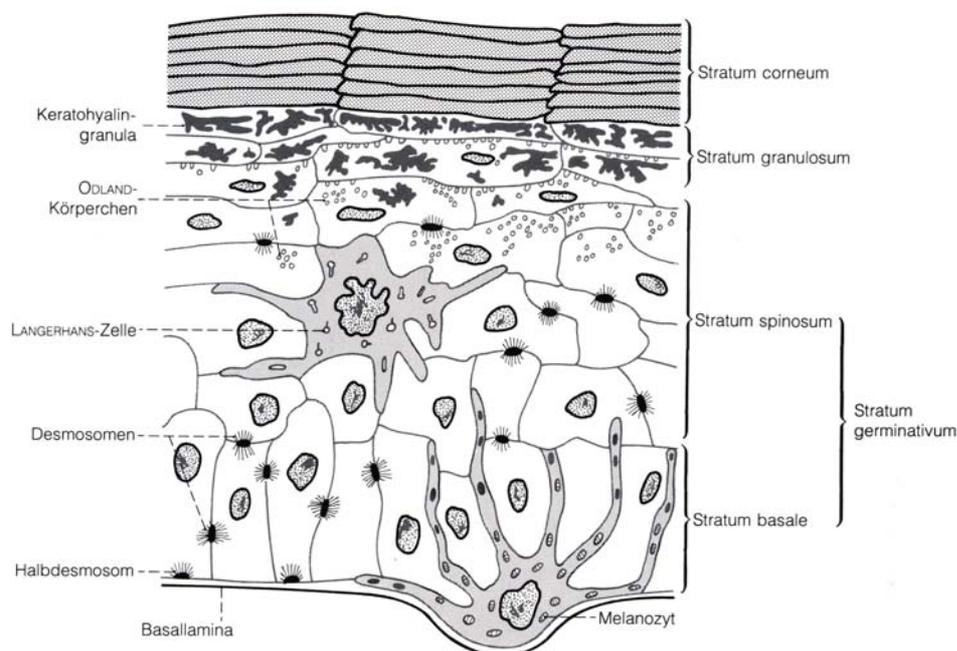
## **1.2. Aufbau und Funktion humaner Haut**

Die Haut ist morphologisch aus drei Schichten aufgebaut: die äußere Epidermis, die Dermis und die Subkutis. Epidermis und Dermis werden oft unter dem Begriff Kutis zusammengefasst.

Die Epidermis ist das äußere, geschichtete und verhornte Plattenepithel, welches zu 90% aus Keratinozyten besteht, die sich am Ende ihres Differenzierungsweges zu toten Hornzellen (Korneozyten) entwickeln und den Körper schließlich als Hornschuppen verlassen. Die übrigen 10% der epidermalen Zellpopulation setzen sich aus Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und eingewanderten humoralen Zellen zusammen (Fritsch 1998). Die Epidermis gliedert sich in verschiedene Schichten auf, die unterschiedliche Funktionen haben: das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum (Abbildung 1.3). Die innerste Schicht der Epidermis wird durch das Stratum basale (Matrixschicht) gebildet, die aus einer einlagigen Zellschicht aus zylindrischen Zellen besteht, die direkt der Basallamina aufsitzen. Innerhalb dieser Schicht befinden sich Zellen, die nicht der terminalen Differenzierung der übrigen Keratinozyten unterliegen, sondern aus Stammzellen, aus denen sowohl weitere Stammzellen als auch so genannte Amplifikationszellen hervorgehen. Diese sind ihrerseits noch zu

wenigen Mitosen befähigt, wobei die daraus entstehenden Zellen sich terminal differenzieren und sich nicht mehr teilen.

Der Matrixschicht der Epidermis liegt das Stratum spinosum (Stachelzellenschicht) auf, das aus etwa zwei bis fünf Zelllagen besteht. In dieser Schicht erfolgt die allmähliche horizontale Umorientierung der Keratinozyten-Zellachse, die Zellen nehmen die Form eines Polyeders ein und gewinnen an Volumen. In dieser Schicht findet die Profilaggrin-Synthese statt, welches als Vorläuferprotein des hochmolekularen Filaggrins mit Keratinfilamenten zusammen klumpige Aggregate bildet, die Keratohyalin granula, die vor allem für das Stratum granulosum charakteristisch sind. Ebenfalls im Stratum spinosum wird das unlösliche Protein Involukrin synthetisiert, das später bei der Bildung der *cornified envelopes* im Stratum corneum beteiligt ist (siehe unten) (Fritsch 1998). Stratum basale und Stratum spinosum werden auch unter dem Begriff Stratum germinativum zusammengefasst (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Schematische Gliederung der Epidermis.**

(Quelle: Benninghoff, Anatomie, Band 2, Urban & Schwarzenberg-Verlag, Seite 795)

Auf das Stratum spinosum folgt das Stratum granulosum (Körnerschicht), welches etwa ein bis drei Zelllagen umfasst. Das in den Keratohyalin granula enthaltene Profilaggrin wird in dieser Schicht zu dem

hochreaktiven Filaggrin dephosphoryliert, welches ins Cytoplasma gelangt. Dort bewirkt es eine irreversible Aggregation der Keratinfilamente, was zur Verhornung der Keratinozyten führt. Ein weiterer Differenzierungsschritt der Keratinozyten ist die Bildung der *cornified envelopes*, wobei sich das im Stratum spinosum gebildete Involukrin mit anderen Proteinen, wie Loricrin, Keratolinin und Pancornuline, an die Innenseite der Zellmembran anlagert. Dort werden diese Proteine mit Hilfe einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen, membranständigen Transglutaminase in hohem Maße quervernetzt, was nicht nur zu einer Versteifung der Zellen führt, sondern auch zu chemischer Resistenz gegen beispielsweise alkalische Substanzen, einige Detergenzien und reduzierende Substanzen. Zusätzlich werden in dieser Schicht die Keratinozyten weiter abgeflacht, die Zellkerne und die meisten anderen Zellorganellen abgebaut und die Zellen dehydriert. Des Weiteren befinden sich in dieser Schicht die Odland-Körperchen, bei denen es sich um Lamellarkörperchen handelt, die bereits im oberen Bereich des Stratum spinosum gebildet werden, hier im Stratum granulosum mit der Zellmembran verschmelzen und ihre Inhaltsstoffe in den Interzellularraum exozytieren. Dabei handelt es sich zum Beispiel um hydrolytische Enzyme, Glycosylceramide, Sterolester und Phospholipide, die im sauren Milieu zum „Barrierelipid“ umgewandelt und zu breiten, parallel gerichteten Lipidlamellen angeordnet werden. Sie bilden somit die zementartige Kitsubstanz des Stratum corneum, das den Interzellularraum relativ dicht verschließt (Fritsch 1998). Die Zellen werden immobil und in einer streng geometrischen Anordnung fixiert. Die Einwanderung der Keratinozyten in das Stratum corneum findet somit nicht mehr einzeln, sondern im Zellverband statt (Benninghoff 1994).

Die äußere Schicht der Epidermis wird durch das Stratum corneum (Hornschicht) gebildet, welches etwa 15-25 Zellschichten umfasst und die Barrierefunktion der Haut übernimmt. Bei Zerfall der Zementsubstanz des Interzellularraums, zerbröckelt die Hornschicht in der äußersten Zellschicht (Stratum disjunctum) in Einzelzellen oder Hornzellaggregate, die dann als Schuppen die Haut verlassen.

In der Epidermis befinden sich außerdem noch Melanozyten, die dem UV-Schutz der Haut durch Melaninsynthese dienen, und Langerhans-Zellen

(Fritsch 1998) (Abbildung 1.3). Die dendritischen Langerhans-Zellen liegen im Stratum spinosum mit etwa 500 bis 1000/mm<sup>2</sup> relativ gleichmäßig verteilt vor und können nach Antigen-Kontakt ruhende T-Helfer-Lymphozyten der umliegenden Gefäße stimulieren, woraus die Einleitung einer primären Immunantwort folgt. Sie bilden somit einen wichtigen Teil des erworbenen, spezifischen Immunsystems (siehe unten). Die Epidermis ist mit der darunter liegenden Dermis (Lederhaut) über die dermoepidermale Verbindungszone verankert. Die komplexe Grenzfläche der beiden Hautschichten wird Basalmembranzzone oder dermoepidermale Junktionszone genannt. Sie besteht aus der 25-50 nm dicken Lamina lucida und der etwa gleich dicken Basallamina (Lamina densa). Die Ausstülpungen der Epidermis in die Dermis werden Retezapfen genannt; die Fortsätze der Dermis in die Epidermis dermale Papillen (Fritsch 1998). Diese „Verzahnung“ der Epidermis mit der Dermis dient einer verbesserten mechanischen Verankerung und einer erhöhten Dehnbarkeit der Haut.

Die Dermis (Korium) ist ein fibroelastisches Gewebe, das die Reißfestigkeit und Elastizität der Haut ausmacht. Sie ist wiederum aus zwei Schichten aufgebaut, welche sich im Aufbau ihres Kollagenfasergeflechts unterscheiden: der papillären Dermis und der darunter liegenden retikulären Dermis. Die papilläre Dermis ist im Vergleich zur retikulären Dermis aus lockerer vernetzten und dünneren Kollagenfasern aufgebaut. Zusätzlich ist das Vernetzungsmuster der elastischen Fasern in beiden Schichten umgekehrt. Neben den Maschen des Fasernetzes in der gelartigen extrazellulären Matrix, die hauptsächlich aus Glukosaminoglykanen und Proteoglykanen besteht, befinden sich in der Dermis überwiegend Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen. In der Dermis liegen zudem die Gefäße und Nerven, welche die Haut versorgen, sowie Schweiß- und Talgdrüsen und andere Hautanhangsgebilde, die noch teilweise in der Subkutis verankert sind (Benninghoff 1994).

Von der Dermis ziehen Bindegewebs-Septen in die darunter liegende Subkutis (Unterhaut) und teilen diese dadurch in „Läppchen“ auf. Die Subkutis besteht hauptsächlich aus Fettzellen, auch subkutanes

Fettgewebe, deren Hauptaufgaben in der Wärmeisolation, dem Schutz vor mechanischen Einwirkungen und der Energiespeicherung liegen.

Die Haut fungiert als erste Barriere, die ein aus der Umwelt eindringender Mikroorganismus überwinden muss. Neben der physikalischen Abwehr von Infektionen mittels der nahezu undurchdringlichen Hornschicht und einem keimfeindlichen, sauren Milieu, gibt die Haut auch immunologischen Schutz. Einerseits einen angeborenen mittels Synthese und Sekretion hauteigener anti-mikrobiell wirksamer Peptide durch Keratinozyten und Sebozyten (siehe dazu „1.2.1 Hauteigene anti-mikrobielle Substanzen“), andererseits einen erworbenen immunologischen Schutz über Langerhans-Zellen, welche einen peripheren Teil des Immunsystems ausmachen und der Antigen-Verarbeitung und -Präsentation dienen (Benninghoff 1994). Wird diese erste Barriere trotzdem überwunden und Mikroorganismen dringen in tiefere Hautschichten ein, führt dies zu einer akuten pro-inflammatorischen Reaktion (Gallin et al. 1988) (siehe auch „1.2.2 Wichtige Inflammations-Mediatoren der Haut“).

### **1.2.1 Hauteigene anti-mikrobielle Substanzen**

Die menschliche Haut stellt wie bereits erwähnt nicht nur eine passive, physikalische Barriere gegen Pathogene dar, sie ist außerdem in der Lage, eindringende Mikroorganismen aktiv zu bekämpfen (siehe auch „1.2.2 Wichtige Inflammations-Mediatoren der Haut“).

Dies geschieht unter anderem über die Sekretion verschiedener anti-mikrobieller Substanzen wie Immunglobuline, Antikörper, Enzyme wie beispielsweise das Lysozym, und anti-mikrobielle Peptide (AMP) (Wershil und Walker 1992). Erstmals wurden körpereigene AMP in den 1970er Jahren bei Pflanzen entdeckt, als man feststellte, dass diese in der Lage sind, Peptide zu synthetisieren, welche die Zytoplasmamembran von Mikroorganismen zerstören und somit die Pflanzen vor Infektionen schützen (Fernandez de Caleyá 1972). Weiterführend konnten AMP auch in Tunikaten (Manteltieren), Insekten, Fischen, Amphibien und

Säugetieren nachgewiesen werden (Diamond und Bevins 1998). Heute sind mittlerweile mehr als hundert verschiedene AMP in Menschen und Tieren bekannt und werden als wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems angerechnet, da sie genkodiert vorliegen, schnell exprimiert und schnell zur Verfügung gestellt werden können; ihre Expression musste nicht erlernt oder anderweitig angeeignet werden (Hancock et al. 1995; Lehrer und Ganz 1996; Boman 1995, 1998). Die regulierte Aktivierung dieser Gene wurde erstmals 1992 beschrieben, als Sun und Faye entdeckten, dass AMP in *Cecropia* (Ameisenbaum) über den Transkriptionsfaktor Cif (*colostrum inhibitory factor*) reguliert werden (Sun und Faye 1992), der verwandt zu dem - erst sechs Jahre zuvor entdeckten - Säuger-Transkriptionsfaktor NFκB ist (Sen und Baltimore 1986). Spätere Studien bestätigten dies, indem sie zeigen konnten, dass allen Genen, die für induzierbare anti-biotische Peptide kodieren – außer α-Defensinen (siehe unten) – die Promotor-Sequenz für den humanen NFκB 5'-GGGRNNYYCC-3' (wobei R für eine Purinbase, N für jede beliebige Nukleobase und Y für eine Pyrimidinbase steht), oder die verwandte Sequenz 5'-GGG A/G AYYYYYY-3' in Insekten vorgeschaltet ist (Baldwin 1996).

Ferner gelang der Nachweis, dass verschiedene Epithelien in der Lage sind, auf Kontakt mit Mikroorganismen die Menge der AMP zu regulieren; ein Kontakt von Vertebraten-Haut, Tracheen oder Zungenepithel mit Mikroorganismen führt zu einer erhöhten Ansammlung von anti-mikrobiell wirksamen Peptiden (Zasloff 1987; Schonwetter et al. 1995). Außerdem fand man bei Patienten mit Psoriasis eine geringere Infektionsrate der betroffenen Hautpartien als erwartet, was zu der Annahme führte, dass auch läsionale psoriatische Haut in der Lage ist, anti-mikrobielle Substanzen zum Schutz vor Infektionen zu synthetisieren (Henseler und Christophers 1995).

In der Haut sind inzwischen mehrere AMP bekannt, die zu den Effektormolekülen des angeborenen Immunsystems der Haut gezählt werden. Sie werden von gesunden Keratinozyten der Epidermis (Klenha und Krs 1967; Wiedow et al. 1998; Harder und Schröder 2002) oder Schweißdrüsen (Schitteck et al. 2001) konstitutiv synthetisiert. Hierzu zählt

das Lysozym (Klenha und Krs 1967), der sekretorische Leukoprotease-Inhibitor oder Antileukoprotein (Wiedow et al. 1998), die RNase7 – eine anti-mikrobielle Ribonuklease, deren Expression zusätzlich induziert werden kann, das Dermicidin (Schittek et al. 2001) und das Psoriasin (S100A7), welches ebenfalls auch induziert werden kann (Gläser et al. 2005). Es schützt, neben einigen Defensinen, die Haut (und auch andere Körperepithelien) vor Infektionen mit *Escherichia coli* (Madsen et al. 1991; Gläser et al. 2005).

Dieses 11 Kilodalton (kDa) kleine Metall-Ionen bindende S100 Protein Psoriasin (S100A7) wurde erstmals bei einem Vergleich der Verteilung anti-mikrobieller Peptide in gesunder gegenüber psoriatischer Haut entdeckt (Celis et al. 1990), wobei auffiel, dass dieses Protein in psoriatischer Haut deutlich hochreguliert vorliegt, was ihm den Namen „Psoriasin“ gab. Erst später zeigte sich, dass dieses Protein auch bei Nicht-Psoriatikern auf der gesamten Hautoberfläche des Körpers zu finden ist, vor allem in Bereichen, die einer erhöhten Bakterien-Kolonialisierung ausgesetzt sind (Noble 1992) wie beispielsweise die perianale Region. Psoriasin schützt diese somit gegen *E. coli* – Infektionen (Gläser et al. 2005). Exprimiert wird Psoriasin hauptsächlich in Keratinozyten, jedoch auch in Sebozyten, was zu der Annahme führt, dass Psoriasin mit den von Sebozyten sekretierten Lipiden ausgeschüttet wird (Gläser et al. 2005).

Zusätzlich zu den konstitutiv exprimierten AMP befinden sich in der Haut eine Reihe von anti-mikrobiellen Substanzen, die von vorneherein einer Regulation oder Induktion bedürfen, um exprimiert zu werden. Hierzu zählt das humane  $\beta$ -Defensin-2 (HbD2) (Harder et al. 1997), das humane  $\beta$ -Defensin-3 (HbD3) (Harder et al. 2001) und Cathelicidin LL-37 (Frohm et al. 1997). Eine lokale Induktion dieser Peptide wird zum Beispiel durch eine Infektion oder Inflammation ausgelöst (Gläser et al. 2005). Studien zeigen, dass beispielsweise eine fehlende Expression von HbD3 und Cathelicidin LL-37 in Hautläsionen von Patienten mit Atopischer Dermatitis zu einem erhöhten Vorkommen von Hautinfektionen durch Gram-positive Bakterien führt (Ong et al. 2002).

Eine Hauptgruppe der anti-mikrobiellen Peptide, die in Säuger-Epithelien gefunden wurde, ist die Gruppe der bereits angesprochenen Defensine. Hierbei handelt es sich um kleine (28 – 42 Aminosäuren lange) kationische, Cystein-reiche Peptide mit einem breitgefächerten anti-mikrobiellen Effekt gegen sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien, Pilze und Viren (Ganz et al. 1990; Ganz und Weiss 1997; Ganz 2003; Lehrer 2004; Yang et al. 2004). Kationische Peptide besitzen außerdem die Eigenschaft, dass sie eine hohe Affinität zu ihren Target-Bakterien besitzen und diese fest binden können (Harder et al. 1997). Defensine sind hoch konservierte Moleküle, deren Struktur, Regulation und Funktion von *Drosophila* bis zu höheren Säugetieren verwandt ist (Bevins et al. 1996; Boman 1998; Lehrer und Ganz 1999). Zudem lösen Defensine eine erhöhte zelluläre Immunantwort bei Infektionen aus, indem sie einen chemotaktischen Reiz auf Phagozyten und DCs, sowie *Memory*-T-Zellen auslösen (Territo et al. 1989, Yang et al. 1999). Außerdem induzieren sie eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, was zu einem erhöhten Einwandern von umgebenden Zellen führt (Clark und Kupper 2005).

Die Defensin-Familie wird in drei Untergruppen eingeteilt:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine, die sich in Vorhandensein und Verteilung der Disulfidbrücken zwischen den sechs konservierten Cysteinresten unterscheiden (Tang et al. 1999; Diamond und Bevins 1998).

$\alpha$ -Defensine (HDs) werden aus Vorläufer-Peptiden, so genannten Prepropeptiden zusammengesetzt, welche erst später zu funktionellen Peptiden geschnitten werden. Sie enthalten eine aminoterminal Signalsequenz und ein carboxyterminales reifes Protein, das aus 30 Aminosäuren besteht (Daher et al. 1986; Valore und Ganz 1992; Ganz 2003). Einige der humanen  $\alpha$ -Defensine (1 bis 4) werden auch „*human neutrophil peptides*“ (HNP) genannt, da sie hauptsächlich in Neutrophilen synthetisiert werden (siehe auch Tabelle 3) (Ganz et al. 1985; Lehrer et al. 1989), jedoch auch in verschiedenen epithelialen Geweben (Jones und Bewins 1992; Ouellette und Selsted 1996; Quayle et al. 1998).

$\beta$ -Defensine bestehen aus 38 – 42 Aminosäureresten (Selsted et al. 1993) und obwohl mittlerweile 28 verschiedene  $\beta$ -Defensine auf genetischer

Ebene identifiziert wurden (Schutte et al. 2002), sind bislang erst sechs humane bekannt, die in Epithelzellen exprimiert werden (HbD-1 bis -6) (Ganz 2003; Yang et al. 2004). Auch sie werden wie die  $\alpha$ -Defensine aus inaktiven Vorläufer-Peptiden (Prepropeptiden) zusammengesetzt und erst später mittels noch unbekannter proteolytischer Faktoren zu bioaktiven Peptiden prozessiert (Liu et al. 1997; Harder et al. 1997; Bals et al. 1998; Mathews et al. 1999).

Während HbD-1 konstitutiv exprimiert wird, unterliegt die Expression von HbD2 und -3 einer Induktion durch Viren, Bakterien und anderen mikrobiellen Produkten (wie zum Beispiel Endotoxine) und pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-1 $\beta$  (Yang et al. 2001; Ganz 2003; Duits et al. 2003; Proud et al. 2004; Sorensen et al. 2005). Die Regulation von HbD2 während solch einer Infektion oder Inflammation ist NF $\kappa$ B-abhängig; es wurde zudem herausgefunden, dass neben vier Konsensus-Sequenzen für NF $\kappa$ B auch solche für das *activator protein 1* (AP-1) und *nuclear factor interleukin-6* (NF-IL-6) in der Promoterregion des *HbD2*-Gens vorhanden sind (Liu et al. 1997, 1998). HbD1 und HbD2 scheinen hauptsächlich effektiv gegen Gram-negative Bakterien und einige Pilze zu wirken, weniger gegen Gram-positive Bakterien (Harder et al. 1997; Goldman et al. 1997; Bals et al. 1998; Schulz et al. 2005). HbD3 dagegen ist ein hoch wirksames AMP gegen Hefe sowie Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Garcia et al. 2001; Harder et al. 2001). Neben der anti-mikrobiellen Wirkung konnte noch eine weitere wichtige Aktivität der  $\beta$ -Defensine im komplexen Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem gezeigt werden: einen chemotaktischen Effekt. 1999 gelang Yang et al. der Nachweis, dass humane DCs und *Memory-T*-Zellen einem Konzentrationsgradienten von HbD1 und HbD2 folgen (Yang et al. 1999). Später konnte diese chemotaktische Aktivität von HbD2, -3 und -4 auch an anderen humanen Blutzellen nachgewiesen werden (Garcia et al. 2001; Niyonsaba et al. 2002, 2004). Das „Anlocken“ von DCs und *Memory-T*-Zellen durch HbD2 und HbD3 wird durch den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) CCR6 (C-Chemokin-Rezeptor 6) vermittelt (Yang et al. 1999; Zlotnik und Yoshie 2000; Niyonsaba 2004). Eine direkte Konkurrenz zwischen HbD2 und dem Chemokin *macrophage*

*inflammatory protein 3 $\alpha$*  (MIP-3 $\alpha$ ), welches als Ligand für CCR6 identifiziert ist, konnte später demonstriert werden (Pernet et al. 2003).

Tabelle 3 gibt einen Überblick über Herkunft und Synthese einiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine.

Die letzte Gruppe der Defensine, die zyklischen  $\theta$ -Defensine werden aus zwei  $\alpha$ -Defensin-ähnlichen Vorgänger-Peptiden mit einer Länge von jeweils neun Aminosäuren post-translational zusammengesetzt (Tang et al. 1999; Leonova et al. 2001; Tran et al. 2002). Ihre Präsenz und genaue Aufgabe scheint jedoch noch unklar (Wang W et al. 2003; O'Neil 2003), denn obwohl bislang sechs Gene im humanen Genom gefunden wurden, welche für  $\theta$ -Defensine kodieren, verhindern frühe Stopcodons innerhalb der Gene eine korrekte Translation und somit eine Peptidsynthese (Tang et al. 1999; Nguyen et al. 2003; Cole et al. 2004; Selsted 2004).

**Tabelle 3:** Herkunft und Synthese einiger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine (Modifiziert nach Klotman und Chang 2006).

Defensin	Synthetisierende Zellen	Regulation
<b>HNP-1, -2, -3</b>	Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, B-Zellen und einige T-Zellen	konstitutiv
<b>HNP-4</b>	Neutrophile	konstitutiv
<b>HD-5, -6</b>	Zellen des Darms und des Urogenital-Traktes	konstitutiv und induziert (bei zum Beispiel sexuell übertragenen Infektionen)
<b>HbD-1</b>	Epitheliale Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Keratinozyten	konstitutiv und induziert
<b>HbD-2, -3</b>	Epitheliale Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Keratinozyten	induziert in Folge von Kontakt mit Zytokinen, Viren, Bakterien oder anderen PAMPs
<b>HbD-4</b>	Epitheliale Zellen	konstitutiv und induziert in Folge von PMA- oder Bakterien-Kontakt

HbD, human- $\beta$ -defensin; HD, human- $\alpha$ -defensin; HNP, *human neutrophil peptide*; NK, *natural killer*; PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*; PMA, Phorbol 12-Myristat 13-Acetat.

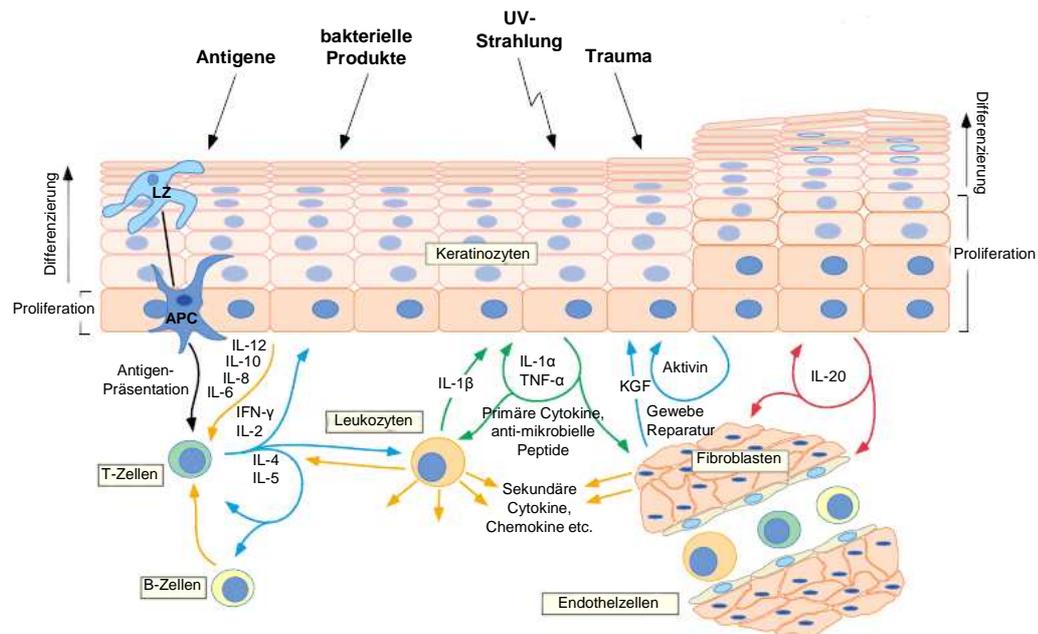
Die korrekte Zusammensetzung der Peptide und die Verteilung der Disulfidbrücken-Bindungen ist wichtig für die chemotaktische und antibakterielle Wirkung der Defensine (Wu et al. 2003).

### 1.2.2 Wichtige Inflammations-Mediatoren der Haut

Wie bereits beschrieben stellt die Epidermis die erste Barriere dar, die den Körper vor der Invasion von Pathogenen schützt; dabei ist sie in der Lage, sich selbst zu heilen. Einige Umweltbedingungen, die auf die Haut einwirken, wie zum Beispiel physikalischer Stress, UV-Strahlung oder bakterielle Produkte, entfalten ihre Wirkung direkt auf Keratinozyten und die darunter liegenden Fibroblasten. Andere dagegen, wie beispielsweise eine Antigen-Präsentation, wirkt sekundär durch andere Zellen vermittelt (zum Beispiel Zellen des erworbenen Immunsystems) auf Keratinozyten. Dabei kann sich die Relation zwischen den basalen proliferierenden Keratinozyten und den sich (hauptsächlich) differenzierenden Keratinozyten höherer Schichten verschieben. Diese Homöostase ist durch ein ausbalanciertes Zusammenspiel von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise der *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) und Aktivin, gewährleistet (Fuchs und Raghavan 2002), was in der Wundheilung eine wichtige Rolle spielt (Beer et al. 2000). Abbildung 1.4 stellt einige der komplexen Signalwege, die bei einer Haut-Inflammation ablaufen, schematisch dar.

Bei einer Inflammationsreaktion der Haut werden Keratinozyten aktiviert, verschiedene Signalmoleküle zu sekretieren. Dazu gehören unter anderem  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-3}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-7}$ ,  $\text{IL-8}$ ,  $\text{IL-10}$ , *Transforming Growth Factor  $\alpha$*  ( $\text{TGF}\alpha$ ),  $\text{TGF}\beta$ ,  $\text{IFN}\gamma$  und *Monocyte chemoattractant Protein-1* (MCP-1) (Harada et al. 1994; Rennekampff et al. 2000; Gillitzer und Goebeler 2001; Rich und Kupper 2001). Diese Faktoren führen unter anderem zu einer parakrinen Signalübermittlung vor allem auf Leukozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer akuten Inflammation polymorphonukleare Zellen (PMNs, auch Neutrophile), gefolgt von Monozyten / Makrophagen, durch  $\text{IL-8}$

chemotaktisch angelockt werden und bereits kurze Zeit nach Auftreten der Inflammation 50% der Zellen des entzündeten Bereichs ausmachen (Engelhardt et al. 1998; Rennekampff et al. 2000). Makrophagen ihrerseits schütten wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren aus und spielen damit ebenfalls eine wichtige Rolle im Inflammations-Ablauf (Sunderkötter et al. 1994; Riches 1996).



**Abbildung 1.4: Signalwege und wichtige Inflammations-Mediatoren bei Hautreizungen.** Basale Keratinocyten proliferieren, während obere Schichten differenzieren, um die äußere Barriere, die Hornschicht, auszubilden. Externe Signale wie Antigene, bakterielle Produkte, UV-Strahlung oder physikalische Traumata bewirken eine Verschiebung der Relation zwischen Proliferation und Differenzierung. Zudem führen sie zu einer Sekretion von primären Zytokinen und Chemokinen, sowie anti-mikrobieller Peptide durch Keratinocyten. Dies bewirkt eine erhöhte Sekretion weiterer primärer Mediatoren sowie sekundärer Zytokine und Chemokine durch Keratinocyten, Fibroblasten und Leukozyten. Physikalische Traumata führen zur Expression von *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) und Aktivin, welche eine Gewebe-Reparatur induzieren. Fremde Antigene werden von Langerhans-Zellen (LZ) aufgenommen und präsentiert, wodurch sich die LZ zu Antigen präsentierenden Zellen (APCs) wandeln. Sie migrieren in die Lymphbahnen und interagieren mit T-Zellen. Aktivierte T-Zellen, die durch sekundäre Zytokine zusätzlich induziert werden, proliferieren und schütten Zytokine aus, die eine zelluläre (Th1, mit IFN- $\gamma$ ) oder humorale (Th2, mit IL-4) Immunantwort auslösen. Die Signale, welche die Expression und Sekretion von IL-20 kontrollieren, sind bislang weitestgehend unbekannt. (Modifiziert nach Rich und Kupper 2001; Clark und Kupper 2005).

Des Weiteren dienen die verschiedenen Signalmoleküle auch der autokrinen Aktivierung der Keratinocyten selbst. TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  werden auch primäre Zytokine genannt, da sie in der Lage sind, über einen autokrinen Signalweg, in Keratinocyten NF $\kappa$ B und *c-Jun N-terminale*

*Kinase* (JNK) zu aktivieren (Ghosh und Karin 2002; Varfolomeev und Ashkenazi 2004), welche eine wichtige Rolle in der dermalen Inflammation und bei der Entstehung von Hautkrebs spielen (Makris et al. 2000; Schmidt-Supprian et al. 2000; Pasparakis et al. 2002; Lind et al. 2004; van Hogerlinden et al. 2004; Zhang et al. 2005). Zudem werden durch die Aktivierung von NF $\kappa$ B erneut pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und anti-mikrobiell wirksame Peptide induziert (Baldwin 1996). Ein weiterer wichtiger Inflammations-Mediator der Haut, der durch sekretierte pro-inflammatorische Zytokine aktiviert wird, ist die *Transforming growth factor  $\beta$  activated kinase 1* (TAK1), die zu den *mitogen activated protein kinase kinase kinases* (MAPKKK) gehört. Zu den TAK1-aktivierenden Zytokinen gehören zum Beispiel IL-1 und TNF $\alpha$ , sowie einige TLR-Liganden (Ninomiya-Tsuji et al. 1999; Akira und Takeda 2004).

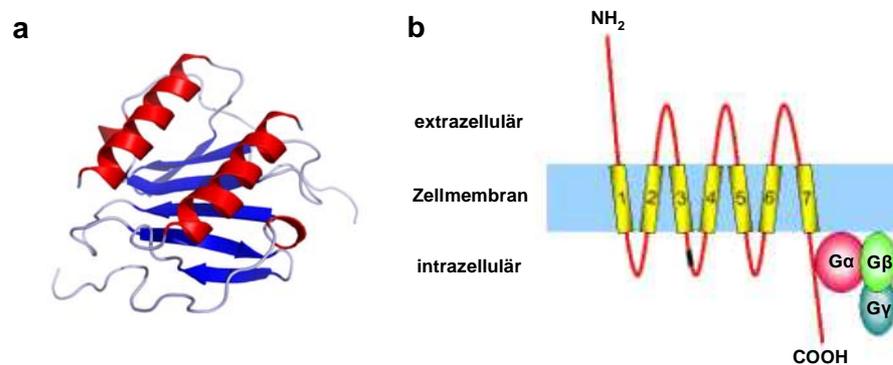
Es zeigte sich, dass TAK1 im Signalweg vor der inhibitorischen  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) Kinase (IKK) ihre Wirkung entfaltet (Takaesu et al. 2003; Sato et al. 2005; Shim et al. 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass TAK1 ein wichtiger Mediator im TNF-Signalweg der Keratinozyten darstellt, der sowohl IKK als auch JNK aktivieren kann (Omori et al. 2006).

### Interleukin-8

Da sich die vorliegende Promotionsarbeit hauptsächlich mit IL-8, einem zentralen Inflammations-Parameter in der Haut, beschäftigt, soll hier vertieft auf die Struktur und Funktion dieses Chemokins eingegangen werden.

Das 8 kDa kleine, 72 Aminosäuren lange IL-8 gehört zu den CXC Chemokinen, wobei C für einen Cysteinrest und X für eine einzelne beliebige Aminosäure steht. IL-8-Monomere besitzen einen NH<sub>2</sub>-Terminus, der für die Rezeptor-Liganden-Bindung zuständig ist (Hébert et al. 1990; Clark-Lewis et al. 1995; LaRosa et al. 1992), drei anti-parallele  $\beta$ -Faltblätter, die über Loop-Regionen miteinander verbunden sind und eine lange COOH-terminale  $\alpha$ -Helix. Es zeigte sich, dass IL-8 häufig als Homodimer vorliegt, wobei die  $\beta$ -Faltblätter ein sechsseitiges  $\beta$ -Faltblatt

ausbilden und die  $\alpha$ -Helices anti-parallel zueinander auf der Dimer-Oberfläche zu liegen kommen (Cloue et al. 1989, 1990; Baldwin et al. 1991; Harada et al. 1994). Stabilisiert werden die Dimere primär durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den jeweils ersten  $\beta$ -Faltblättern und durch zusätzliche Interaktionen der Seitenketten (Baldwin et al. 1991). Abbildung 1.5 zeigt die schematische Struktur eines IL-8-Dimers und eines typischen Chemokin-Rezeptors.



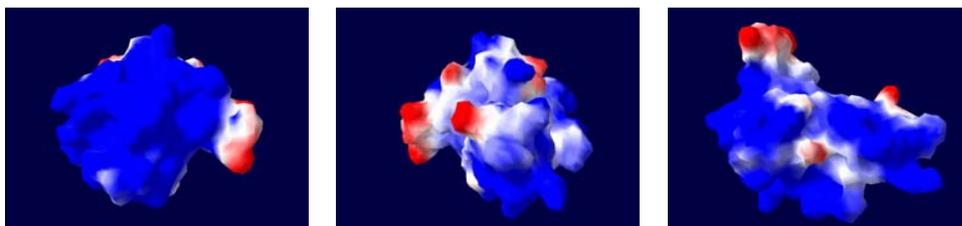
**Abbildung 1.5: (a) Schematische Darstellung eines IL-8-Homodimers**, das aus einem sechseitigen  $\beta$ -Faltblatt, überlagert von zwei anti-parallelen  $\alpha$ -Helices, gebildet wird. **(b) Struktur eines typischen Chemokin-Rezeptors**, der aus einer extrazellulären  $NH_2$ -Domäne für die Liganden-Bindung, sieben Transmembrandomänen und einer intrazellulären  $COOH$ -Domäne besteht. Hier sind die verschiedenen G-Protein-Untereinheiten gekoppelt, die der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle dienen (nach Clore et al. 1990; Burtreau et al. 2007).

Ursprünglich wurden Chemokine als chemoattraktive Substanzen für Neutrophile beschrieben (***chemoattractant cytokine***), es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie auch auf T- und B- Lymphozyten chemotaktisch wirken (Larsen et al. 1989; White et al. 1989). Sekretiert wird IL-8 von vielen verschiedenen Zelltypen, zu denen unter anderem Monozyten, T-Lymphozyten, Neutrophile, dermale Fibroblasten, Keratinozyten und Hepatozyten gehören (Strieter et al. 1989; Thornton et al. 1990); induziert durch pro-inflammatorische Stimuli wie  $IL-1\alpha$  und  $TNF\alpha$ , sowie durch TLR-Liganden wie beispielsweise LPS (Yoshimura et al. 1987; Matsushima et al. 1988; Thomas et al. 1990, 1991; Oppenheim et al. 1991).

Derzeit sind zwei Rezeptoren für IL-8 identifiziert: CXCR1 (auch A-Typ), der die höchste Affinität für IL-8 aufweist, und CXCR2 (auch B-Typ), der IL-8 und andere, strukturverwandte Chemokine mit ähnlicher Affinität

bindet (Holmes et al. 1991; Murphy und Tiffany 1991; LaRosa et al. 1992; Lee et al. 1992; Prado et al. 1994). Chemokin-Rezeptoren gehören zu den G Protein-gekoppelten Rezeptoren, die aus einer extrazellulären NH<sub>2</sub>-Domäne für die Liganden-Bindung, sieben Transmembranhelices und einer intrazellulären COOH-Domäne mit Serin- und Threonin-Resten, die als Phosphorylierungsstellen im *Signalling* dienen, aufgebaut sind. Intrazellulär ist diese Domäne an verschiedene G-Protein-Untereinheiten (G $\alpha$ , G $\beta$ , G $\gamma$ ) gekoppelt, die für eine Signalweiterleitung innerhalb der Zelle zuständig sind. Abbildung 1.5 (b) zeigt die Struktur eines typischen Chemokin-Rezeptors.

IL-8 weist über die Oberfläche verteilt ein unterschiedliches elektrostatisches Potential auf. Der Großteil der Oberfläche zeigt ein positives elektrostatisches Potential, welches mittels „Swiss-Pdb Viewer“ (Guex und Peisch 1997) sichtbar gemacht werden kann. Das elektrostatische Potential der Oberfläche von IL-8 ist der schematischen Darstellung in Abbildung 1.6 zu entnehmen, wobei eine blaue Färbung für ein positives elektrostatisches Potential steht, eine rote Färbung für ein negatives und weiß für ein neutrales.



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des elektrostatischen Potentials von IL-8.** Mittels „Swiss-Pdb Viewer“ (Guex und Peisch 1997) kann das Potential grafisch dargestellt werden; eine blaue Färbung steht für ein positives elektrostatisches Potential, eine rote Färbung für ein negatives und weiß für ein neutrales. (Abbildung mit freundlicher Unterstützung von Dr. Andreas Bock).

### 1.3 Arbeitshypothese

Bislang wurden die meisten Studien mit CpG- und Non-CpG-ODN an Zellen des Immunsystems durchgeführt, um deren aktivierende Wirkung auf das Immunsystem – also den inflammatorischen Effekt – zu untersuchen. Daraus konnten Therapie-Ansätze, wie unter „1.1.1 Immunmodulatorische ODN“ beschrieben, für CpG-ODN abgeleitet werden. Wenig ist dagegen bislang über die Wirkung von CpG- und Non-CpG-ODN an epidermalen Zellen bekannt. Einige Veröffentlichungen zeigen, dass der Rezeptor für CpG-DNA TLR9 auch in Hautzellen exprimiert wird (Mempel et al. 2003; Miller et al. 2005; Lebre et al. 2007; Dorn et al. 2007), was darauf hindeutet, dass CpG-ODN auch in Hautzellen als Informations- und Signalträger eine Funktion ausüben.

Im Rahmen der vorangegangenen Diplom-Arbeit konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass sowohl CpG- als auch Non-CpG-ODN eine Suppression von IL-8 in Keratinozyten bewirken, was für einen anti-inflammatorischen Effekt der ODN an epidermalen Zellen spricht.

Daraus folgt die Hypothese, dass CpG- und Non-CpG-ODN an epidermalen Zellen über einen anderen Mechanismus wirken als an den Zellen des Immunsystems.

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollte erarbeitet werden, über welchen Mechanismus CpG- und Non-CpG-ODN ihre IL-8-supprimierende Wirkung auf epidermale Zellen ausüben. Zusätzlich sollte die *in vitro* gezeigte IL-8-Suppression an einem *in vivo*-System, dem CHS (*Contact hypersensitivity*)-Maus-Modell, bestätigt werden, um einen funktionellen Nachweis einer anti-inflammatorischen Wirkung topisch auf die Haut applizierter ODN zu erhalten.

Zudem sollte geklärt werden, ob eine Internalisierung von CpG- und Non-CpG-ODN in die Zellen und ein ODN-Transport innerhalb der Zellen stattfindet. Auch die Penetrationseigenschaften topisch applizierter ODN in mehrschichtige Gewebe sollten überprüft werden, da es für einen

therapeutischen Ansatz wichtig ist, dass bei topischer Applikation die Moleküle bis in die vitalen Hautschichten gelangen. Diese Frage sollte an einem Vollhautmodell untersucht werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob CpG- und Non-CpG-ODN in der Lage sind, hauteigene anti-mikrobielle Peptide, die zum angeborenen Immunsystem der Haut zählen, zu induzieren. Dies wäre neben einer anti-inflammatorischen Wirkung der CpG- und Non-CpG-ODN eine weitere Funktion bei der Abwehr von Pathogenen. Bislang liegen auf diesem Gebiet noch keine publizierten Forschungsergebnisse vor.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Oligodeoxynukleotide

Die verwendeten Oligodeoxynukleotide (ODN) wurden von der Firma Biospring (Frankfurt/Main) synthetisiert und nach Bedarf am 5'-Ende mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Cy3 oder Cy5 markiert. In der folgenden Darstellung stehen Großbuchstaben für ein PTO-Rückgrat, Kleinbuchstaben für PDE-Bindungen. Zum leichteren Lesen der Arbeit befindet sich diese Liste auch im Anhang zum Herausfalten.

<b>CpG-1-PTO:</b> 5'- TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT -3'	(20-mer)
<b>CpG-1-PDE „reverse“:</b> 5'- AAC GTC AGG AAC GTC ATG GA -3'	(20-mer)
<b>Deletionsmutanten zu CpG-1-PTO:</b>	
5'- TCC ATG ACG TTC CTG ACG T -3'	(19-mer)
5'- TCC ATG ACG TTC CTG ACG -3'	(18-mer)
5'- TCC ATG ACG TTC CTG A -3'	(16-mer)
5'- CAT GAC GTT CCT -3'	(12-mer)
<b>CpG-9-PTO:</b> 5'- GAC GTT -3'	(6-mer)
<b>CpG-14C-1:</b> 5'- tcc tcg acg tcc ctg a -3'	(16-mer)
<b>CpG-14C-2:</b> 5'- Tcc tcg acg tcc ctg A -3'	(16-mer)
<b>CpG-14C-3:</b> 5'- TCc tcg acg tcc ctG A -3'	(16-mer)
<b>CpG-14C-4:</b> 5'- TCC tcg acg tcc cTG A -3'	(16-mer)
<b>CpG-14C-5:</b> 5'- TCC Tcg acg tcc CTG A -3'	(16-mer)
<b>CpG-14C-6:</b> 5'- TCC TCg acg tcC CTG A -3'	(16-mer)
<b>CpG-14C-7:</b> 5'- TcC tCg AcG tCc CtG A -3'	(16-mer)
<b>Non-CpG-3-PTO:</b> 5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT -3'	(20-mer)
<b>Non-CpG-4-PTO:</b> 5'- AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA -3'	(20-mer)
<b>Non-CpG-5-PTO:</b> 5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC -3'	(20-mer)
<b>Non-CpG-5A-PTO:</b> 5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC -3'	(18-mer)
<b>Non-CpG-5B-PTO:</b> 5'- CCC CCC CCC CCC CCC C -3'	(16-mer)
<b>Non-CpG-5C-PTO:</b> 5'- CCC CCC CCC CCC CC -3'	(14-mer)
<b>Non-CpG-5D-PTO:</b> 5'- CCC CCC CCC CCC -3'	(12-mer)
<b>Non-CpG-5G-PTO:</b> 5'- CCC CCC -3'	(6-mer)
<b>Non-CpG-6-PTO:</b> 5'- GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG -3'	(20-mer)

### 2.1.1 Methylierung von CpG-1-PTO

#### Material:

CpG-1-PTO: 5'- TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT -3'

CpG-1-PDE *reverse*: 5'- AAC GTC AGG AAC GTC ATG GA -3'

	(Fa. Biospring, Frankfurt/Main)
Trio Thermocycler	(Fa. Biometra, Göttingen)
Aqua ad injectabilia	(Fa. Braun, Melsungen)
CpG Methylase (M. Sssl)	(Fa. NEB, Frankfurt / Main)
S-Adenosylmethionin (SAM)	(Fa. NEB, Frankfurt / Main)
NE-Buffer 2	(Fa. NEB, Frankfurt / Main)
Restriktionsendonuklease ( <i>Hpa</i> II)	(Fa. NEB, Frankfurt / Main)

Zur Methylierung von CpG-1-PTO wurde die CpG Methylase M. Sssl verwendet, die spezifisch doppelsträngige CG-Motive erkennt. Durch Hybridisierung von äquivalenten Mengen von CpG-1-PTO und CpG-1-PTO *reverse* in wässriger Lösung (im Thermocycler bei 95°C für 5 min, langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur, RT) wurde ein Doppelstrang erzeugt. Die Methylierung durch M. Sssl mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donor wurde bei 37°C für 16 Stunden im Thermocycler durchgeführt, worauf eine Inaktivierung des Enzyms durch 30-minütiges Erhitzen auf 65°C folgte. Um die Methylierung zu kontrollieren, wurde eine Restriktion der methylierten CpG-ODN mittels *Hpa*II durchgeführt. Diese Restriktionsendonuklease schneidet spezifisch methylierte CG-Motive. Der Ansatz wurde bei 37°C für 16 Stunden inkubiert und das Enzym anschließend bei 65°C für 30 min inaktiviert. Der Ansatz der restringierten Fragmente wurde daraufhin auf ein Polyacrylamidgel (siehe Material und Methoden 2.1.2) aufgetragen.

### 2.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Darstellung kleiner DNA-Fragmente

#### Material:

##### 5 x TBE-Puffer (1 Liter)

- 450 mM Tris 54 g (Fa. USB, Cleveland, USA)
- 450 mM Borsäure 28 g (Fa. GATC, Konstanz)

---

• 10 mM EDTA	3,72 g	(Fa. Merck, Darmstadt)
• ad 1 Liter Aqua ad injectabilia		
▶ pH 8,3 einstellen		
Harnstoff		(Fa. GATC, Konstanz)
TE-Puffer		(Fa. Qiagen GmbH, Hilden)
Formamid		(Fa. Merck, Darmstadt)
Bromphenolblau-Na-Salz		(Fa. Merck, Darmstadt)
Rotiphorese-Gel (Acrylamid-Lösung)		(Fa. Roth, Karlsruhe)
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin)		(Fa. Merck, Darmstadt)
APS (Ammoniumperoxidsulfat)		(Fa. Roth, Karlsruhe)
Gel Casting System Joey™		(Fa. Owl Scientific, USA)
Penguin™ Doppelgelsystem P8DS		(Fa. Owl Scientific, USA)
Perfect Blue™ Doppelgelsystem Twin S		(Fa. Peqlab, Erlangen)
Glasplatten, Spacer, Kämmе		(Fa. Peqlab, Erlangen)
Ethidiumbromid		(Fa. Calbiochem, Darmstadt)
Transilluminator		(Fa. AGS, Heidelberg)

Zur Überprüfung der sehr kurzen Fragmente aus dem Methylierungsansatz (siehe Material und Methoden 2.1.1) wurde ein 12%-iges Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung verwendet:

- 12,0 ml Rotiphorese Gel
- 7,5 ml 1 x TBE + 8 M Harnstoff
- 10,5 ml Aqua ad injectabilia
- 20 µl TEMED
- 200 µl 10% APS

Die Proben wurden mit gleichen Mengen an TE-Puffer und Formamid versetzt, um eine Ausbildung sekundärer Strukturen zu verhindern und die Proben leichter in die Geltaschen pipettieren zu können. Zur Kontrolle der Lauffront wurde ein Gemisch aus TE-Puffer und Formamid zu gleichen Teilen verwendet, das mit Bromphenolblau-Na-Salz angefärbt wurde.

Das Gel wurde für 30 min an eine Spannung von 200 V angeschlossen und anschließend mit einer Ethidiumbromid-Lösung angefärbt, wodurch die DNA-Banden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden konnten.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Material und Geräte der Zellkultur

4-well Labtek	(Fa. Nunc, Wiesbaden)
12-well Platten	(Fa. Nunc, Wiesbaden)
24-well Platten	(Fa. Nunc, Wiesbaden)
Autoklav	(Fa. WEBECO, Ober-Ramstadt)
Axiovert, Mikroskop	(Fa. Zeiss, Oberkochen)
Begasbare Brutschränke	(Fa. Heraeus, Hanau; Fa. Nunc, Wiesbaden; Fa. Thermo Life Science)
Biofuge fresco	(Fa. Heraeus, Hanau)
Einmalpipetten	(Fa. Corning, Wiesbaden)
Ethanol	(Fa. Riedel de Hæn, Seelze)
Mikro-Schraubröhren (1,5 ml / 2 ml)	(Fa. Sarstedt, Nürtingen)
Multipette	(Fa. Eppendorf, Hamburg)
Multipetten-Spitzen (Combitips)	(Fa. Eppendorf, Hamburg)
Pasteurpipetten	(Fa. Brandt, Wertheim)
Pipetten (1000 µl – 0,5 µl)	(Fa. Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitzen (1000 µl – 0,5 µl)	(Fa. Sarstedt, Nürtingen)
Reaktionsgefäße (2 ml / 1,5 ml)	(Fa. Sarstedt, Nürtingen)
Sterile Werkbank	(Fa. Heraeus, Hanau Fa. Slee, Mainz)
Sterilfilter	(Fa. Millipore, Bedford, Ma, USA)
Sterilisator	(Fa. Heraeus, Hanau)
Zählkammer nach Neubauer	(Fa. Brandt, Wertheim)
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	(Fa. Greiner, Frickenhausen)
Zellkulturflaschen (150 cm <sup>2</sup> )	(Fa. BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
Zellkulturflaschen mit Filterdeckel (175 cm <sup>2</sup> )	(Fa. Greiner BioOne, Frickenhausen)
Zentrifugationsgefäße (50 ml / 15 ml)	(Fa. Sarstedt, Nürtingen)

### 2.2.2 Lösungen und Medien der Zellkultur

#### EDTA-Lösung

- 0,2% EDTA-Disodium 2 g / 1 Liter PBS<sup>-</sup> (Fa. Gerbu Biotechnik, Gaiberg)
- ▶ steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

Trypsin/EDTA-Lösung

- 0,125% Trypsin 50 ml 2,5% / 1 Liter PBS<sup>-</sup> (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- 0,1% EDTA 50 ml 2% / 1 Liter PBS<sup>-</sup>
- ▶ pH 7,1, steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

PBS mit Ca<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup> (PBS<sup>++</sup>) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

PBS ohne Ca<sup>2+</sup> / Mg<sup>2+</sup> (PBS<sup>-</sup>) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Hank's-Medium (HaCaT-Medium) (5 Liter)

- 400 ml Hanks-Salzlösungen (HBSS) ohne NaHCO<sub>3</sub> (Fa. Biochrom KG, Berlin)
- 160 ml MEM-Vitamine (100x) (Fa. Biochrom KG, Berlin)
- 318 ml MEM essentielle Aminosäuren (Fa. Biochrom KG, Berlin)
- 160 ml MEM nicht-essentielle Aminosäuren (Fa. Biochrom KG, Berlin)
- 166 ml Natriumbicarbonat 7,5% (Fa. Biochrom KG, Berlin)
- 3600 ml Aqua ad injectabilia (Fa. Braun, Melsungen)
- ▶ pH 6,8 – 7,2, steril filtrieren
- 1% Penicillin / Streptomycin - Lösung (Fa. Biochrom KG, Berlin)
- 1% L-Glutamin (100x) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- 5% FKS (Fetales Kälber Serum) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Kultivierungs-Medium für primäre Keratinozyten

- Keratinocyte-Growth-Medium 2 (KGM-2) (Fa. PromoCell, Heidelberg)
- Supplement Pack (in 500 ml) (Fa. PromoCell, Heidelberg)
  - 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 2 ml BPE-15 (bovine pituitary extract)
  - 0,15 ng/ml EGF (epidermal growth factor)
  - 5,0 µg/ml Insulin
  - 0,33 µg/ml Hydrocortison
  - 10,0 µg/ml Transferrin
  - 0,39 µg/ml Epinephrine

**2.2.3 Verwendete Zellen in Mono- und Multilayern**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde hauptsächlich mit der HaCaT-Zelllinie gearbeitet. Des Weiteren wurden primär gewonnene

Keratinocyten verwendet, sowie das *3D-Full-Thickness Skin Model* der Firma Phenion.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen, wie Kultivieren, Passagieren, sowie das Aussäen und Behandeln der Zellen für Versuchsansätze wurden unter sterilen Werkbänken durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen durch Bakterien oder Pilze zu vermeiden. Für die Zellkultivierung wurden sterile Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 150 cm<sup>2</sup> verwendet.

Alle in der Zellkultur verwendeten Glasgeräte, wurden im Heißluft-Sterilisator über Nacht bei 180°C trockensterilisiert, während Laborgeräte aus Kunststoff im Autoklaven für 45 min unter Wasserdruck auf 121°C dampfsterilisiert wurden. Flüssigkeiten, die nicht im Autoklaven zu sterilisieren waren, wurden mit Hilfe einer Peristaltikpumpe oder Spritze über einen Filter sterilfiltriert.

#### HaCaT-Zelllinie

Die HaCaT-Zelllinie ging 1988 aus der Forschergruppe um Norbert E. Fusenig (Deutsches Krebs-Forschungszentrum, Heidelberg) hervor. Es handelt sich hierbei um eine spontan immortalisierte humane Keratinocytenzelllinie, die aus der Haut eines 62-jährigen männlichen Patienten gewonnen wurde. Sie besitzt einen transformierten Phänotypen *in vitro*, verhält sich jedoch nicht Tumor-induzierend (Boukamp et al. 1988) und weist als wichtigstes Merkmal die nahezu vollständige Fähigkeit zur epidermalen Differenzierung auf (Breitkreutz et al. 1989). Die optimalen Wachstumsbedingungen der HaCaT-Zellen liegen bei Verwendung von ME-Medium (*minimal essential medium*) bei einer niedrigen Calciumionen-Konzentration von 0,2 mM und einer relativ hohen Umgebungstemperatur von 38,5°C. Aus diesen Bedingungen leitete sich der Name (HaCaT = **H**uman **a**dult **l**ow **C**alcium **h**igh **T**emperature) ab (Boukamp et al. 1988). Da die HaCaT-Zelllinie keine individuellen Unterschiede aufweist, wie sie bei primären Keratinocyten zu finden sind, handelt es sich hierbei um gute Versuchszellen zur Untersuchung von zellbiologischen Vorgängen.

HaCaT-Zellen wurden in Hanks-Medium gehalten, das durch Zugabe von 5% FKS (Fetales Kälber Serum) sowie 1% L-Glutamin-Lösung supplementiert wurde. Die Zugabe von 5 ml Penicillin / Streptomycin-

Lösung pro 500 ml Hanks-Medium erfolgte zum Schutz gegen Mikroorganismen-Kontamination. Als pH-Indikator des Mediums diente der Farbstoff Phenolrot, der im Ausgangsmedium (Hanks-Salzlösung, HBSS) bereits enthalten war. Die Kultivierung der HaCaT-Zellen erfolgte bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in einem begasteten Brutschrank bei locker aufgeschraubtem Zellkulturflaschendeckel.

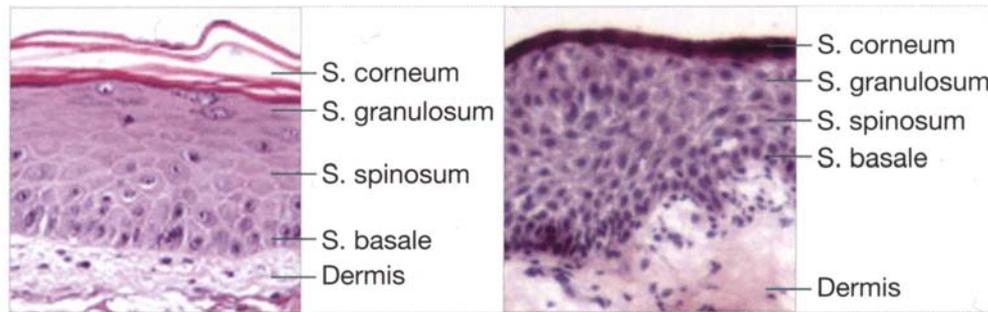
### Primäre Keratinozyten

Primäre Keratinozyten wurden nach ihrer Isolierung aus Vollhautproben (siehe Material und Methoden 2.2.4) in *Keratinocyte Growth Medium 2* (KGM-2) gehalten, das durch Zugabe des Supplement-Packs (siehe oben) vervollständigt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in einem begasteten Brutschrank in speziellen Filterdeckel-Zellkulturflaschen. Es zeigte sich, dass eine permanente Kultivierung primärer Keratinozyten bei 5% CO<sub>2</sub> zu einem verbesserten Wachstum der Zellen führte, was eine Kultivierung in Zellkulturflaschen mit Sterilfilter-Deckel nötig machte, da ein permanentes Begasen der Zellen ohne Sterilfilter-Deckel zu einem erhöhten Kontaminationsrisiko führen könnte.

### 3D-Full-Thickness Skin Model

Das Phenion® 3D-Vollhautmodell ist ein mehrschichtiges Äquivalent zur menschlichen Haut (Mewes et al. 2007; Zöller et al. *in press*). Es besteht aus primär gewonnenen Keratinozyten und Fibroblasten, die auf eine kollagenhaltige Matrix ausgesät werden. Diese wird vorher für 7 Tage in 24-well Multischalen regelmäßig mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Danach folgt die Einsaat von Fibroblasten, die für 14 Tage in der Matrix kultiviert werden. Daraufhin werden auf die Matrix Keratinozyten eingesät und für 7 Tage submers (mit Medium bedeckt) kultiviert. Anschließend wird das Hautmodell an die „Air-Liquid-Interface“ (ALI) (Versorgung der Keratinozyten mit Medium nur noch von unten über die Matrix) angehoben. In dieser Phase beginnen die Keratinozyten, sich zu differenzieren und Stratifikation auszubilden, die der menschlichen Haut *in vivo* sehr nahe kommen. Nach 14 Tagen Kultivierung an der ALI wurde das Hautmodell im Versuch eingesetzt. In Abbildung 2.1 sind histologische

Querschnitte des Vollhautmodells und der menschlichen Haut dargestellt (H&E gefärbt; siehe Material und Methoden 2.10.1).



**Abbildung 2.1: Histologischer Vergleich zwischen Phenion-Vollhautmodell (links) und menschlicher Haut (rechts).** In beiden H&E-gefärbten histologischen Schnitten sind die unterschiedlichen Schichten (Strati) der menschlichen Haut zu erkennen. Zur Schichtung der humanen Haut siehe Einleitung „1.2 Aufbau und Funktion humaner Haut“.

## 2.2.4 Isolierung primärer Keratinozyten

### Material:

### Isolierungsmedium:

- |   |                             |
|---|-----------------------------|
| Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)  | (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) |
| • 10% FKS                               | (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) |
| • 1% L-Glutamin - Lösung                | (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) |
| • 1% Penecillin / Streptomycin - Lösung | (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) |
| • 1% Amphotericin                       | (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) |
| • 20 ml Hapes                           | (Fa. AppliChem, Darmstadt)  |
| ▶ steril filtrieren, Lagerung bei 4°C   |                             |

Die frisch gewonnene Hautprobe wurde in filtriertem Isolierungsmedium in einem großen Zentrifugenröhrchen transportiert und noch am gleichen Tag viermal für jeweils eine Stunde bei RT in frischem Isolierungsmedium gewaschen, um ein Einwirken der Antibiotika zu gewährleisten. Über Nacht wurde die Hautprobe in Isolierungsmedium bei 4°C ruhen gelassen und am nächsten Tag mit dem Trypsinieren begonnen. Dazu wurde die Hautprobe in eine Petrischale überführt und mit 15 – 20 ml HBSS-Trypsin / EDTA bedeckt. Um ein Eindringen des Trypsins zwischen Epidermis und Dermis zu ermöglichen, wurde die Epidermis mit einem

Skalpelli eingeringelt und anschließend die Probe bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in der geschlossenen Petrischale inkubiert. Bereits nach einer Stunde wurde das Ablösen der Epidermis von der Dermis überprüft. Hierfür wurde mit einer stumpfen Pinzette über die Epidermis gestrichen. Sobald sich die Epidermis zu lösen begann (spätestens nach 4,5 Stunden), wurde vorsichtig die komplette Epidermis mittels Pinzette von der Dermis gelöst. Die restliche Hautprobe wurde verworfen und die abgelösten Epidermis-Stückchen mit Inaktivierungsmedium (gleiche Menge zu HBSS-Trypsin) in der Petrischale gut suspendiert und in ein großes Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde dann bei 259 g für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet in KGM-2 resuspendiert und in Zellkulturflaschen mit KGM-2 angesät. Die Flaschen wurden für mindestens zwei Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ruhen gelassen, um den Zellen das Anheften zu ermöglichen.

### **2.2.5 Passagieren und Aussäen der Zellen**

Alle im Folgenden genannten Volumina beziehen sich auf das Passagieren der Zellen in großen Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 150 cm<sup>2</sup>. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt oder, bei Erreichen der Subkonfluenz, gesplittet beziehungsweise für Versuche ausgesät.

Zu Beginn wurde das alte Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Reste durch Spülen mit 10 ml PBS<sup>-</sup> entfernt. Nach Absaugen des PBS<sup>-</sup> wurden bei HaCaT-Zellen 5 ml 0,2% EDTA auf die Zellen gegeben und bei 37°C im unbegasteten Brutschrank für 10 min inkubiert. EDTA ist ein Calcium- und Magnesiumchelator, der die Ionen bindet, welche für die von Cadherinen und Integrinen vermittelte Zelladhäsion notwendig sind. Die Zellen lassen sich dadurch leichter von der Bodenfläche der Zellkulturflaschen lösen. Nach Absaugen der EDTA-Lösung (oder bei primären Keratinozyten: direkt nach Absaugen des PBS<sup>-</sup>) wurden 5 ml Trypsin 0,125% / EDTA 0,1% - Lösung (T/E-Lösung) auf die Zellen gegeben und ebenfalls bei 37°C im unbegasteten Brutschrank inkubiert:

HaCaT-Zellen für 10 min, primäre Keratinozyten für 7 min. Das Ablösen der Zellen, welches durch die Endopeptidase Trypsin ausgelöst wird, wurde mikroskopisch kontrolliert und anschließend die Reaktion mit 5 ml Medium (HaCaT-Zellen) oder 5 ml FKS (primäre Keratinozyten) abgestoppt.

Die Zellsuspension wurde nun für 10 min bei 259 g zentrifugiert und der entstandene Überstand abgesaugt. Zum Splitten der Zellen wurde das Pellet in Medium resuspendiert, definierte Mengen auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und diese mit dem jeweiligen Medium auf 25 ml aufgefüllt. Die HaCaT-Zellkulturflaschen wurden dann über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt im begasten Brutschrank bei lose aufgeschraubtem Deckel inkubiert und am nächsten Tag bei geschlossenem Deckel in einen unbegasten Brutschrank bei 37°C überführt. Die primären Keratinozyten wurden permanent bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in begasten Brutschränken in speziellen Zellkulturflaschen mit Filterdeckel gehalten. Um die Zellen mit einer definierten Zellzahl für Versuche aussäen zu können, wurde der Zelltiter mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zelldichten, die zur Aussaat für Versuche in unterschiedlichen Kulturgefäßen verwendet wurden, sind in Tabelle 4 gelistet.

**Tabelle 4:** Zellzahl und Mediumvolumina zur Aussaat bei Versuchen

	Zellen	
	HaCaT	primäre Keratinozyten
4-well-LabTeks	1,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen/750µl	-
6-well-Multischale	1 x 10 <sup>6</sup> Zellen / 4 ml	-
12-well-Multischale	1 x 10 <sup>5</sup> Zellen / 2 ml	-
24-well-Multischale	2,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen / 1 ml	2,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen/1 ml
96-well-Mikrotiterplatten	2 x 10 <sup>4</sup> Zellen / 100 µl	-

Diese Ansätze wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt im begasten Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag für den Versuch verwendet. Bei allen Versuchsansätzen wurde am nächsten Morgen ein Mediumwechsel mit 500 µl frischem Medium – teilweise mit Stimulatoren

oder Inhibitoren versetzt – durchgeführt, bevor eine ODN-Zugabe (außer zu den Kontrollen) erfolgte. Die Zellen wurden danach 18 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert, worauf die Abarbeitung der Proben für den Einsatz in verschiedenen Tests folgte.

### **2.2.6 UVB-Bestrahlung der Zellen**

Zur Induktion und anschließenden Analyse von IL-6 wurden HaCaT-Keratinocyten auf PBS<sup>++</sup> ohne Zugabe von ODN mit UVB bestrahlt. Dazu wurde eine Waldmann 3003 K Lichtkabine (Waldmann, Villingen-Schurenningen) verwendet, bei der die Zellen mit einer Distanz von 25 cm mit 150 mJ UVB / cm<sup>2</sup> bestrahlt wurden wie bereits von anderen beschrieben (Kippenberger et al. 2001).

## **2.3 Interleukin – ELISA**

Der ELISA („*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*“) dient der Quantifizierung des Interleukins (IL-6 oder IL-8) in Zellüberständen unterschiedlich behandelter Zellen.

Zur Abarbeitung der Proben wurden diese in Zellkultur-Platten nach gewünschter Behandlungsininkubation auf Eis gestellt, um ein gleichmäßiges Abstoppen der Inkubation zu gewährleisten.

Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt, um zu verhindern, dass sezernierte Interleukine abgebaut werden.

Zu Beginn wurde das Medium von den Zellen abgenommen und in 1,5 ml – Reaktionsgefäße überführt. Um zellfreie Überstände zu erhalten wurden die Proben bei 4°C für 5 min bei 150 g zentrifugiert.

Danach folgte eine Aliquotierung der Proben, die entweder direkt in den ELISA eingesetzt oder bei –80°C bis zum Test gelagert wurden.

Material:

IL-8- oder IL-6- Module-Set-ELISA	(Fa. Bender MedSystems, Wien, Österreich)
ELISA-Washer (Wellwash 4MK2)	(Fa. Thermo-Labsystems, Vantaa, Finnland)
ELISA-Reader (Dynatec MR5000)	(Fa. Westshore Technologies, Michigan, USA)
Microwellplatten Maxi Sorp	(Fa. Nunc, Wiesbaden)
PBS <sup>-</sup>	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Waschpuffer:

- 250 µl Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonalaureat)  
(Fa. BioRad, München)
- 500 ml PBS<sup>-</sup>  
(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Blockpuffer:

- 5 g BSA (Bovines Serum Albumin)  
(Fa. Roth, Karlsruhe)
  - 25 g Sucrose (Saccharose)  
(Fa. Roth, Karlsruhe)
  - 250 mg NaN<sub>3</sub>  
(Fa. Merck, Darmstadt)
  - 500 ml PBS<sup>-</sup>  
(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- 3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin (TMB) Liquid Substrate (Fa. Sigma-Aldrich, München)

Stop Solution:

- 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ⇒ 2 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
(Fa. Merck, Darmstadt)
- 16 ml Aqua Dest

Der Interleukin-ELISA, bei dem es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA handelt, wurde nach dem Protokoll der Firma Bender MedSystems durchgeführt:

Zu Beginn wurden die Mikrotiter-Platten mit gereinigten Antikörpern gegen die nachzuweisenden Interleukine (IL-6 oder IL-8) über mehrere Stunden beschichtet. Bevor die Proben zugegeben wurden, erfolgte eine Inkubation mit Blocking-Puffer, um unspezifischen Bindungen vorzubeugen. Daraufhin wurden die zellfreien Überstände, sowie biotinylierter Zweit-Antikörper gegen das jeweilige Interleukin zugegeben. Während der Inkubation über einige Stunden konnten die Interleukine in den Zellüberständen mit den spezifischen Antikörpern eine Bindung (einen „Sandwich“) eingehen. Es folgte daraufhin die Zugabe des Streptavidin-HRPs (HRP = Horseradish Peroxidase), das in Kombination mit dem

später zugegebenen TMB-Substrat eine Farbreaktion von farblos (negativ) zu blau (positiv) katalysierte. Diese Farbreaktion wurde mit 4N Schwefelsäure („Stop-Solution“) abgestoppt und die Färbung sofort im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenz 650 nm) gemessen. Die Farbintensität ist proportional zu dem in den Proben vorhandenen Interleukin.

Da eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen mitgeführt wurde, konnte direkt die Konzentration der Interleukine in den Zellüberständen bestimmt werden.

## 2.4 Transformation und Plasmid-Extraktion

Um Plasmide in größeren Mengen zur Verfügung zu haben, wurden diese in kompetente Bakterienzellen transformiert, dort amplifiziert und mittels Plasmid-Extraktion wieder aus den Zellen gewonnen. Bei den Plasmiden handelte es sich in der vorliegenden Promotionsarbeit um dominant-negative Konstrukte für TLR9 oder das Adapterprotein MyD88, die zur Ermittlung des Signalwegs bei der ODN-vermittelten IL-8-Suppression in HaCaT-Keratinocyten dienen (siehe 2.5 Transfektion). Des Weiteren wurden Luciferase-Reporter-Plasmide verwendet, um die Aktivität des NFκB- beziehungsweise des HbD2-Promoters unterschiedlich stimulierter Zellen zu untersuchen (siehe Material und Methoden 2.5 und 2.12).

### Material:

Kompetente Zellen: One Shot<sup>®</sup> MAX Efficiency<sup>®</sup> DH5α-T1<sup>R</sup> Competent Cells  
(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Gebrauchsfertiges SOC-Medium (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

- 2% Tryptone
- 0.5% Hefe Extract
- 10 mM Natriumchlorid
- 2.5 mM Kaliumchlorid
- 10 mM Magnesiumchlorid

- 10 mM Magnesiumsulfat
- 20 mM Glucose

#### Agarplatten

- 37 g / Liter Luria Agar (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- ▶ autoklavieren, 15 ml pro Petrischale abfüllen, Lagerung bei 4°C

#### LB-Medium

- 20 g / Liter LB Broth Base (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- ▶ autoklavieren, Lagerung bei 4°C

- Selektionsantibiotikum Ampicillin (Fa. Sigma, Taufkirchen)
- Glycerol (Fa. Sigma-Aldrich, München)
- Plasmid-Extraktions-Kit nach Nucleobond (Fa. Macherey-Nagel, Düren)

Die Transformation eines Plasmids in kompetente *E. coli*-Zellen wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut, 12 ng Plasmid zugegeben und vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 Sekunden im Wasserbad bei 42°C erhitzt, um ein Eindringen des Plasmids in die Zellen zu ermöglichen. Durch den Hitzestress kommt es kurzzeitig zur Öffnung von kleinen Poren in der Bakterienzellwand, durch welche die Plasmide in das Bakterium aufgenommen werden können. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt und 250 µl vorgewärmtes SOC Medium zugegeben. Dieses Medium ist ein steriles Vollmedium, das zusätzlich einen hohen Glucose-Anteil zur Energiegewinnung und einige Komponenten zur Zellwand-Reparatur bereitstellt. Es besitzt noch kein Selektionsantibiotikum, da dieses erst mit der Expression des Plasmids den Zellen zur Verfügung steht. Während der nun folgenden Inkubation bei 37°C für eine Stunde bei leichtem Schütteln soll dies geschehen. Anschließend wurden 10 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien gepickt, um Glycerol-Stocks anzulegen oder eine Plasmid-Extraktion vorzubereiten.

Zur Herstellung von Glycerol-Stocks wurde eine Einzelkolonie auf 5 ml LB-Medium (+ 5 µl Selektionsantibiotikum) gegeben und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag folgte das Mischen von 750 µl Bakteriensuspension mit 250 µl Glycerol, gefolgt vom sofortigen Wegfrieren der Kulturen bei -80°C.

Zur Plasmid-Extraktion wurde zuerst eine Vorkultur angelegt. Dazu wurde eine Einzelkolonie auf 5 ml LB-Medium (+ 5 µl Selektionsantibiotikum) bei 37°C im Schüttelinkubator etwa 6-8 Stunden inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Bakteriensuspension aus der Vorkultur in 200 ml LB-Medium (+ 200 µl Selektionsantibiotikum) überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator expandiert. Die Extraktion der Plasmid-DNA (pDNA) erfolgte mittels Nucleobond-Extraktions-Kit der Firma Macherey-Nagel. Dieses Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Isolierung der pDNA durch Bindung an eine mit Diethylaminoethanol equilibrierte Filtermembran. Während die pDNA an den Filter gebunden vorliegt, wurden Proteine, RNA und andere Verunreinigungen durch verschiedene Waschschriffe mit niedrig-konzentrierten Salzlösungen aus dem Filter herausgewaschen. Zum Schluss wurde die pDNA durch Waschen mit einer hochkonzentrierten Salzlösung aus dem Filter herausgelöst und mit 70% Isopropanol präzipitiert. Das Pellet der pDNA wurde danach erneut in 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Zum Abschluss der Extraktion wurde die pelletierte pDNA in TE-Puffer aufgenommen und mit dem UV-Photometer Ultrospec 2000 bei 260 nm gegen 280 nm Wellenlänge Reinheit und Konzentration der pDNA bestimmt. Die Lagerung der Plasmid-Lösungen erfolgte bei -20°C.

## **2.5 Transfektion**

Mittels Transfektion wurde Plasmid-DNA transient in HaCaT-Zellen eingeschleust, um mittels dominant-negativen Konstrukten Proteine auszuschalten oder die Promotoraktivität von NFκB oder HbD2 in

unterschiedlich stimulierten Zellen mittels Luciferase-Reporter Assay (siehe Material und Methoden 2.12) zu untersuchen.

Material:

TLR9-DN (pcDNA 3.1 Vektor)	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
MyD88-DN (pRK7 Vektor)	(Fa. Tularik, San Francisco, CA, USA)
OptiMem Medium	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Lipofectamin™2000 Reagent	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Das dominant-negative Expressionsplasmid für TLR9 wurde freundlicher Weise von Dr. Stefan Bauer, München bereitgestellt. Der *open-reading frame* (ORF) von TLR9 liegt im pcDNA3.1 Vektor und trägt eine Punktmutation in der TIR-Domäne. Das dominant-negative Expressionsplasmid für MyD88 (pRK7-Vektor) wurde freundlicher Weise von der Firma Tularik in San Francisco, USA bereitgestellt.

HaCaT-Zellen wurden in 12-well-Multischalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 80% wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS<sup>++</sup> gewaschen, um Mediumreste zu entfernen, und danach mit den jeweils vorbereiteten Transfektionslösungen behandelt. Im Fall der dominant-negativen Konstrukte wurden je well 2 µg pDNA eingesetzt und die Plasmide zuerst für 5 min bei RT mit 100 µl pro well OptiMEM inkubiert. Im Fall des Luciferase-Reporter-Assays wurden 0,1 µg Renilla-Thymidin Kinase-Plasmid (zum späteren Abgleich) und 1,0 µg Firefly-Plasmid (für Luciferase-Messung) für 5 min bei RT in 100 µl OptiMem pro well inkubiert. Angaben zu den Plasmiden für den Luciferase-Reporter-Assay siehe Material und Methoden 2.12.

Zeitgleich wurden pro well 3 µl der kationischen Reagenz Lipofectamin™ 2000 mit 100 µl OptiMEM pro well für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Plasmidlösung mit der Lipofectaminlösung vereinigt und für 20 min bei RT inkubiert. Dies diente der Bildung von Lipofectamin-DNA Komplexen. Nach dieser Vorbereitung wurde das alte Medium der Zellen abgesaugt und durch 200 µl Plasmid-Lipofectamin-Lösung je well ersetzt. Zusätzlich wurden in jedes well 800 µl OptiMEM zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde bei Standardbedingungen für 5 Stunden auf den Zellen inkubiert, bevor die Transfektionslösung

abgesaugt und gegen frisches Medium ausgetauscht wurde, damit sich die Zellen über Nacht von der Transfektion erholen konnten.

Am nächsten Morgen folgte ein Mediumwechsel auf Medium –FKS, welches für 3 Stunden auf den Zellen inkubiert wurde. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Zellen nach Standardbedingungen mit ODN und je nach Versuchsbedingungen mit unterschiedlichen Inhibitoren.

Die Transfektionseffizienz der Plasmide TLR9-DN und MyD88-DN wurde mittels Western Blot-Analyse überprüft (siehe Material und Methoden 2.6).

## 2.6 Western Blot Analyse

### Material:

#### 3 x SDS Sample Buffer (100 ml)

- |                                       |        |                                    |
|---------------------------------------|--------|------------------------------------|
| • 187,5 mM Tris-HCl pH 6,8            | 2,27 g | (Fa. USB, Cleveland, USA)          |
| • 6% SDS (Na-dodecylsulfat)           | 6,0 g  | (Fa. INC Biomedicals, Aurora, USA) |
| • 30% Glycerol (wasserfrei)           | 30 ml  | (Fa. Merck, Darmstadt)             |
| • 150 mM DTT (Dithiotreitol)          | 2,3 g  | (Fa. AppliChem, Darmstadt)         |
| • 0,3% Bromphenolblau-Na <sup>+</sup> | 0,3 g  | (Fa. Roth, Karlsruhe)              |

Cell Scraper

(Fa. Renner, Dannstadt)

Ultrathurax

(Fa. Ika, Staufen)

Zur Gewinnung der Proteine wurde nach Versuchs-Inkubationszeit das Medium auf den Zellen abgesaugt und um Medium-Reste zu entfernen, der Zellrasen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Es folgte die Zugabe von 60 µl 3x Sample Buffer pro well, der mit Hilfe eines Zellschabers innerhalb der wells verteilt und etwa 5 min inkubiert wurde. Danach wurden die Zellen durch Kratzen mit dem Zellschaber vom Boden der wells gelöst und die viskose Flüssigkeit in 1,5 ml Mikroschraubröhren überführt. Es folgte ein kurzes Abzentrifugieren sowie eine viermalige kurze Behandlung der Proben mit Ultraschall, wodurch es zur Scherung der DNA kam. Darauf folgte ein Erhitzen der Proben für 5 min auf 95°C, um die Proteine in den Proben zu denaturieren und die Wirkung des Natriumdodecylsulfats (SDS) und Dithiotreitols (DTT) im Sample Buffer zu verstärken. Neben SDS,

dessen Wirkung später erläutert wird (siehe 2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), befindet sich im Sample Buffer noch DTT, um die Disulfidbrücken zwischen den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein zu reduzieren. Weitere Inhaltsstoffe des Sample Buffers dienen der Aufrechterhaltung des pH-Wertes (Tris-HCl), der Erhöhung der Dichte der Proben (Glycerol), sowie der Färbung der Lauffront bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Bromphenolblau-Na<sup>+</sup>).

Vor dem Beladen der Geltaschen (siehe 2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurden die Proben kurz gemischt und abzentrifugiert.

### **2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli)**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) lassen sich Proteine aufgrund ihrer Masse auftrennen. Hierzu müssen sie durch eine inerte Matrix aus stark vernetzten Polyacrylamidketten wandern, dessen Porengröße durch das Verhältnis Acrylamid zu Methylenbisacrylamid variiert werden kann: zur Detektion kleiner Proteine wird ein „engmaschiges“, zur Detektion größerer Proteine ein „grobmaschiges“ Gel verwendet.

Die Proben befinden sich im Sample Buffer, der das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) beinhaltet, das die Proteine durch Bindung an hydrophobe Bereiche denaturiert und somit eine Streckung der Polypeptidketten und eine Dissoziation multimerer Proteine in ihre Untereinheiten bewirkt. Daraus folgt, dass alle Proteine in gestreckter Konformation vorliegen. Zusätzlich veranlasst das stark negativ geladene SDS durch seine Bindung an durchschnittlich jede zweite Aminosäure der Polypeptidketten, dass die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigbar wird, was dazu führt, dass alle Proteine mit einem relativ gleichen Ladung-Masse-Verhältnis vorliegen, so dass die Kettenlänge der Proteine, die ihrer Masse entspricht, alleine für die Wander- geschwindigkeit der Proteine in der Gelmatrix verantwortlich ist.

Material:5 x Laemmli Running Buffer (1 Liter)

- 25 mM Tris                      15,1 g                      (Fa. USB, Cleveland, USA)
- 250 mM Glycerin              94,0 g                      (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 0,1% SDS                        5,0 g                        (Fa. ICN Biomedicals, Aurora, USA)

4 x Tris / HCl / SDS pH 6,8 (100 ml)

- 0,5 M Tris                        6,05 g                      (Fa. USB, Cleveland, USA)
- 0,4% SDS                        0,4 g                        (Fa. ICN Biomedicals, Aurora, USA)
- 5 N HCl                            (Fa. AppliChem, Darmstadt)

4 x Tris / HCl / SDS pH 8,8 (100 ml)

- 1,5 M Tris                        18,0 g                      (Fa. USB, Cleveland, USA)
- 0,4% SDS                        0,4 g                        (Fa. ICN Biomedicals, Aurora, USA)
- 5 N HCl                            (Fa. AppliChem, Darmstadt)

- TEMED (N, N, N', N'-Tetrametylendiamin)    (Fa. Merck, Darmstadt)
- APS (Ammoniumperoxidsulfat)                      (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Rotiphorese-Gel (Acrylamid-Lösung)              (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Gel Casting System Joey™                          (Fa. Owl Scientific, USA)
- Penguin™ Doppelgelsystem P8DS                (Fa. Owl Scientific, USA)
- Perfect Blue™ Doppelgelsystem Twin S        (Fa. Peqlab, Erlangen)
- Glasplatten, Spacer, Kämmen                      (Fa. Peqlab, Erlangen)
- Prestained Protein Molecular Weight Marker    (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot)

In den Versuchen wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele verwendet, die aus zwei verschiedenen Geltypen mit unterschiedlicher Porengröße bestanden: das Sammelgel und das Trenngel (6% bei TLR9 und 12% bei Flag-Tag des MyD88-Plasmids) mit jeweils folgender Zusammensetzung:

	6% Trenngel	12% Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese Gel	3,0 ml	6,0 ml	1,3 ml
4 x Tris/HCl/SDS pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	-
4 x Tris/HCl/SDS pH 6,8	-	-	2,5 ml
Aqua ad injectabilia	8,25 ml	5,25 ml	6,1 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl

In die Geltaschen des Sammelgels wurden 15 µl Proben aufgetragen und 10 µl *Prestained Protein Molecular Weight Marker* pro Gel. Diese Proteinleiter bestand aus Proteinen mit bekannten Molekulargewichten, anhand derer standardisierter Banden die Proteinbanden der Versuchsproben einem bestimmten Molekulargewicht zugeordnet werden konnten.

Die Proteine wurden in dem Sammelgel, welches weniger stark vernetzt ist, bei geringerer Spannung (80 V) als im Trenngel (120 V) laufen gelassen, um die Polypeptidketten am Übergang zum Trenngel gleichmäßig zu sammeln. Anschließend wurden diese dann bei erhöhter Spannung gleichzeitig in das Trenngel überführt und dort nach Masse aufgetrennt. Die SDS-Gelelektrophorese wurde gestoppt sobald die Bromphenolblau-markierte Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

## 2.6.2 Western Blot

Um die mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine sichtbar machen zu können, wurden die Proteinbanden des Gels auf eine poröse PVDF-Membran übertragen. Dies geschah mittels Western Blot-Verfahrens.

### Material:

#### Towbin Blotting Buffer (4 Liter):

- 25 mM Tris                      12,11 g                      (Fa. USB, Cleveland, USA)
- 192 mM Glycin                57,65 g                      (Fa. Roth, Karlsruhe)

- 20% Methanol                      800 ml                      (Fa. Riedel de Hën, Seelze)
- ▶ pH 8,3 einstellen

10 x TBS (1 Liter):

- 0,2 M Tris                              24,2 g                              (Fa. USB, Cleveland, USA)
- 1,37 M NaCl                              80,0 g                              (Fa. Merck, Darmstadt)
- Mit 5 N HCl pH-Wert auf 7,6 einstellen                      (Fa. AppliChem, Darmstadt)

TBS-T:

- 1 x TBS
- 0,1% Tween 20                              (Fa. BioRad, München)

Blocking Buffer:

- 1 x TBS-T
- 5% BSA / 5% Milchpulver                      (Fa. Roth, Karlsruhe)
- PVDF-Transfermembran                      (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Mini Trans Blot<sup>®</sup> Cell                      (Fa. BioRad, München)
- Power Pac 200                              (Fa. BioRad, München)
- Immobilon<sup>™</sup>-P (Transfer Membran)                      (Fa. Millipore, Bedford, USA)
- Hyperfilm ECL                              (Fa. Amersham Pharmacia, Little Chalfont, USA)
- LumiGLO<sup>®</sup> Chemiluminescent Substrate                      (Fa. Cell Signaling, Frankfurt / Main)

Beim Blotten wurden Gel und Membran in eine Art „Transfer-Sandwich“ eingebaut, dessen Komponenten in folgender Abfolge von oben (Kathode) nach unten (Anode) angeordnet waren:

Transfer-Pad	In Transfer-Puffer (Towbin) inkubiert
Filterpapier	In Methanol / Towbin inkubiert
PVDF-Membran	In Methanol / Towbin inkubiert
Gel	In Towbin inkubiert
Filterpapier	In Methanol / Towbin inkubiert
Transfer-Pad	In Transfer-Puffer (Towbin) inkubiert

Dieser “Transfer-Sandwich” wurde dann in eine mit Towbin-Blotting-Buffer gefüllte Blotting-Kammer eingespannt und bei 50 V für 45 min (Flag-Tag) bis 60 min (TLR9) geblottet, wobei die negativ geladenen Proteine vom

Gel (an der Anode gelegen) in die PVDF-Membran (an der Kathode gelegen) wanderten. Anschließend wurde die Membran aus dem „Sandwich“ herausgenommen und für eine Stunde bei RT in 5% BSA-Lösung (TLR9) oder 5% Milchpulver-Lösung (Flag-Tag) inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindestellen der Proteine zu blocken. Zur Spezifizierung der auf die Membran übertragenen Proteine wurden spezifische monoklonale Antikörper eingesetzt und über Nacht bei 4°C in der jeweiligen Blocking-Lösung auf der Membran inkubiert. Folgende Antikörper wurden verwendet:

1. Antikörper	2. Antikörper	Hersteller	Blocking-Lösung
Anti-TLR9	Mouse	Fa. MoBiTec, Göttingen	5% BSA
Anti-Flag-Tag	Mouse	Fa. Sigma-Aldrich, München	5% Milch

Am nächsten Tag wurde die Membran mehrmals mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem *Horseradish Peroxidase* (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper in der jeweiligen Blocking-Lösung für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte erneutes Waschen der Membran mit TBS-T.

Zur Sichtbarmachung der spezifischen Proteinbanden auf der Membran wurde *LumiGLO Chemiluminescent Substrate* benutzt, wodurch die enzymatische Wirkung des HRP unter Austritt von Licht vonstatten ging. Dies konnte mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden: nur dort, wo sich die vom Erstantikörper detektierten Proteinbanden auf der Membran befanden, war eine Schwarzfärbung des Röntgenfilms zu erkennen.

## 2.7 Analyse der Zellproliferation

Die Zellproliferation unter verschiedenen Versuchsbedingungen ist in der Regel proportional zur Synthese der DNA. Diese kann mittels Einbau von 5'-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) in die DNA gemessen werden. BrdU ist ein synthetisches Nukleosid, das analog zum Thymidin in die neu

synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Durch Bindung eines spezifischen Anti-BrdU-Antikörpers entsteht ein Immunkomplex, der mit Hilfe einer Farbreaktion gemessen werden kann. Die Farbintensität ist proportional zur Menge der neu synthetisierten DNA.

Material:

Cell Proliferation ELISA, BrdU-Kit (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

- Lyophilisierter Antikörper mit 1,1 ml Aqua dest auflösen und 10 min bei RT rollern lassen
- Konzentrierter Waschpuffer mit Aqua dest auf 1 Liter auffüllen

Für diesen Test wurden die Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten (eine Spalte pro Versuchsansatz; eine Spalte ohne Label, eine Spalte unbehandelte Zellen) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ruhen gelassen.

Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen und in 100 µl frischem Medium pro well die ODN und das BrdU-Label (insgesamt 1:1000 verdünnt) zugegeben (bei einer 24 Stunden-Messung; sonst Zugabe des BrdU-Labels erst 24 Stunden nach ODN-Zugabe) und unter Standardbedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium erneut verworfen und die Zellen mittels 30-minütiger Inkubation von 200 µl Fix Denat (Aceton-haltige Fixierlösung) pro well auf dem Mikrotiterplatten-Boden fixiert. Danach wurde Fix Denat entfernt und 100 µl Anti-BrdU-Antikörper (1:100 mit zugehöriger Lösung verdünnt) zugegeben, um einen Immunkomplex aus eingebautem BrdU und Antikörper zu generieren. Nach zwei Stunden Inkubation bei RT wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit jeweils 300 µl pro well verdünntem Waschpuffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen und anschließend 100 µl Substrat pro well zugegeben. Die Farbreaktion wurde im Dunkeln bei RT abgewartet (5 – 30 min) und mit 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro well abgestoppt. Die Messung der Absorption wurde sofort im ELISA-Messgerät bei 450 nm durchgeführt.

## 2.8 Analyse der Zytotoxizität

Zytotoxische Reagenzien zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie die Membranintegrität der Zellen zerstören, was zu einer nekrotischen Zellyse führt. Hierbei werden verschiedene zytoplasmatische Enzyme ausgeschüttet, die sich im Zellkultur-Überstand nachweisen lassen. So auch die Laktatdehydrogenase (LDH), welche im folgenden Test quantifiziert wurde. Dabei handelt es sich um eine zweistufige enzymatische Reaktion. Im ersten Schritt wird bei der Oxidation von Laktat in Pyruvat mittels der von den zerstörten Zellen ausgeschütteten LDH  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  reduziert. Im zweiten Schritt wird das gelb gefärbte Substrat Tetrazoliumsalz (Lösung 2) anhand des Katalysators Diaphorase (Lösung 1) und mit Hilfe des  $\text{NADH}+\text{H}^+$  aus Schritt 1 zum rot gefärbten Formazansalz reduziert. Dieser Farbumschlag wird im ELISA-Messgerät bei 490 nm (Referenz 650 nm) gemessen und ist äquivalent zur Menge der zerstörten Zellen und somit ein messbarer Parameter der Zytotoxizität einer Substanz.

### Material:

- Cytotoxicity Detection Kit (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- Lösung 1 (Diaphorase) mit 1 ml Aqua ad injectabilia rekonstituieren und 10 min bei RT rollern
  - Lösung 2 (Tetrazoliumsalz)
- TritonX 100 Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt)

Für diesen Test wurden die Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten (eine Spalte pro Versuchsansatz; eine Spalte als Positivkontrolle möglichst weit entfernt von den anderen Spalten) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  ruhen gelassen.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 200  $\mu\text{l}$  Medium +1% FKS mit oder ohne ODN pro well zugegeben. Als Positivkontrolle diente 2%-ige TritonX-Lösung, die ebenfalls mit Medium +1% FKS (immer frisch) angesetzt wurde. Die Zellen wurden daraufhin über Nacht (bei 24 Stunden Messzeit; ansonsten 48 Stunden) unter Standardbedingungen kultiviert.

Um zellfreie Überstände zu generieren, wurden die Mikrotiterplatten am Messtag abzentrifugiert, 100 µl Überstand pro well in eine frische Mikrotiterplatte überführt und 100 µl Reaktionslösung (Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:45 gemischt) pro well im Dunkeln zugegeben. Alle 5 min wurde nun der Farbumschlag am ELISA-Messgerät bei 490 nm (Referenz 650 nm) gemessen, solange bis der höchste Wert die Nachweisgrenze erreicht hatte.

## 2.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor κB*) nach Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen ODN nachzuweisen. Bei einer Aktivierung des im Zytoplasma vorliegenden Transkriptionsfaktors NFκB löst sich dieser vom inhibitorischen κB-Molekül (IκB) und wandert in den Zellkern, wo er an bestimmte Promoter-Bereiche bindet, um eine Transkription von NFκB-spezifischen Genen zu veranlassen. Im EMSA wurden frisch isolierte nukleare Extrakte der behandelten Zellen gewonnen und diese mit einer radioaktiv markierten NFκB-spezifischen Sonde („heiße Sonde“) inkubiert, um eine Hybridisierung des Transkriptionsfaktors mit der Sonde zu ermöglichen. Je mehr NFκB aktiviert wurde, desto mehr heiße Sonde wurde gebunden, was nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches in einem nativen Gel durch Autoradiographie detektiert werden konnte. Zur Spezifizierung wurden zwei Kontrollen mitgeführt: Bei einer Probe wurde ein Anti-NFκB-Antikörper zugefügt, was zu einer komplexeren Bindung aus Transkriptionsfaktor, heißer Sonde und Antikörper und somit zu einer verzögerten Laufgeschwindigkeit des Komplexes führte („*Supershift*“). Des Weiteren wurde in einer Probe zusätzlich zur heißen Sonde eine sogenannte „kalte Sonde“ zugegeben, bei der es sich ebenfalls um die spezifische NFκB-Sequenz, jedoch nicht radioaktiv markiert, handelte. Da sie im Überschuss zugegeben wurde, verdrängte sie beim

Hybridisierungsvorgang die „heiße Sonde“, wodurch sich das Signal abschwächte.

### 2.9.1 Gewinnung nuklearer Extrakte

#### Material:

#### Puffer A:

- 10 mM HEPES pH 7,9 (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- 10 mM KCL (Fa. Merck, Darmstadt)
- ▶ TritonX 100 (nach Zugabe Protease-Inhibitoren; 0,1%)  
(Fa. Merck, Darmsatdt)

#### Puffer C:

- 20 mM HEPES pH 7,9 (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- 25% Glycerol (Fa. Sigma-Aldrich, München)
- 420 mM NaCl (Fa. Riedel-de Haën, Seelze)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- 0,2 mM EDTA pH 8,0 (Fa. Gebu Biotechnik, Gaiberg)

Protease-Inhibitor Cocktail-Set I (Fa. Calbiochem, Darmstadt)

Zellschaber (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz)

HaCaT-Keratinocyten wurden in 6-well-Multischalen ausgesät, über Nacht bei Standardbedingungen kultiviert und am nächsten Tag mit 40 ng/ml TNF $\alpha$  oder 4  $\mu$ M verschiedener ODN für jeweils 15 und 30 min inkubiert. Zur Gewinnung nuklearer Extrakte wurden die Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l Puffer A ohne TritonX 100 pro well gewaschen, worauf eine Zugabe von 300  $\mu$ l Puffer A mit TritonX 100 pro well folgte. Die Zellen wurden daraufhin auf Eis gestellt und für 5 min auf der Wippe inkubiert. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellyse bevor die Zellen mit einem Zellschaber vom Kulturschalen-Boden entfernt wurden und die Suspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt wurde. Durch

Zentrifugation wurde die cytoplasmatische Fraktion von den Nuklei (im Pellet) getrennt. Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt und die Pellets in 50 µl Puffer C pro well resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Durch erneute Zentrifugation wurden Nuklei-Trümmer vom gewonnenen Extrakt getrennt. Die Überstände wurden in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und nach einer Proteinbestimmung bei -80°C gelagert.

### **2.9.2 Proteinbestimmung nach Lowry**

#### Material:

Protein Assay	(Fa. BioRad, München)
Mikrotiterplatte	(Fa. Nunc, Wiesbaden)

Mit Hilfe des im Protein-Assay-Kit nach Lowry et al. (1951) vorhandenen Standardproteins wurde eine Standardreihe in Puffer C (siehe 2.9.1 Gewinnung nuklearer Extrakte) hergestellt. Sowohl 5 µl Standardreihe als auch 5 µl Probe pro well wurden auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und anschließend mit einer Reagenz-Mischung nach Herstellerangaben vermischt. Hierbei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay für Proteinkonzentrationen mittels löslichem Detergens. Nach Zugabe von 200 µl Substrat pro well für 15 min bei RT im Dunkeln, folgte eine Messung des Farbumschlags am ELISA-Messgerät bei 650 nm.

### **2.9.3 Vorbereitung der Proben und Gelelektrophorese**

Alle Arbeiten mit Radioaktivität wurden im Kontrollbereich hinter Plexiglas-Schutzwänden und mit Pipetten mit Strahlenschutz durchgeführt. Zusätzlich wurden vor, während und nach jedem Arbeitsschritt der Arbeitsplatz und die Handschuhe mit dem Detektor freigemessen, um eine mögliche Kontamination schnellstmöglich zu erkennen und zu beseitigen.

Material:

Sigma-Coat	(Fa. Sigma-Aldrich, München)
Parafilm	(Fa. Pechiney Plastic, Chicago, USA)
10 x Tris-Glycin	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
40% Acrylamid / Bisacrylamid (19/1)	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
Entgasungsfilter	
Ammoniumpersulfat (APS)	(Fa. Roth, Karlsruhe)
TEMED	(Fa. AppliChem, Darmstadt)

4 x DNA Binding Buffer

- 40 % Glycerol (Fa. Sigma-Aldrich, München)
  - 400 mM KCl (Fa. Merck, Darmstadt)
  - 20 mM MgCl<sub>2</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
  - 40 mM TrisCl pH 7,9 (Fa. Roth, Karlsruhe)
  - 4 mM EDTA pH 8,0 (Fa. Gerbu Biotechnik, Gaiberg)
  - 4 mM DTT (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- Lagerung bei -20°C

Proben-Master-Mix (pro Probe):

- 5 µg / µl BSA (1 µl) (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 2 µg Polydeoxyinosinic-deoxycytidylic acid (Poly dI-dC) (1 µl)  
(Fa. Sigma-Aldrich, München)
- 4 x Binding Buffer (5 µl)

NFκB-Sonde ("heiße Sonde") ca. 15 000 cpm/lane (1 µl) doppelsträngig

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (Fa. Biospring, Frankfurt/Main; Fa.  
Hartmann Analytik, Braunschweig)

Trockengerät (Gel Dryer Model 583) (Fa. Biorad, München)

Film Biomax MR (Fa. Kodak, Stuttgart)

Am Vortag der Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel gegossen, um es über Nacht polymerisieren zu lassen. Die kleine Glasplatte wurde für ein späteres besseres Ablösen des Gels mit 200 µl Sigma-Coat beschichtet, und beide Glasplatten mit Seiten- und Boden-Spacern zusammengesteckt. Um ein Auslaufen zu verhindern, wurden die Ränder mit Parafilm und Klammern abgedichtet. In einem 50 ml Zentrifugen-

röhrchen wurden 5 ml 10 x Tris-Glycin, 5 ml 40% Acrylamid / Bisacrylamid und 40 ml Aqua dest miteinander vermischt und alles mit einem Filter anhand einer Wasserstrahlpumpe entgast, was zu einer verbesserten Polymerisierung führte. Anschließend folgte eine zügige Zugabe von 250 µl 30% Ammoniumpersulfat und 50 µl TEMED, was vorsichtig untergemischt wurde. Die Lösung wurde daraufhin blasenfrei zwischen die schräg stehenden Glasplatten geschüttet, der Kamm zur Bildung der Geltaschen eingesteckt und dieser noch mal mit Gelflüssigkeit bedeckt. Nach etwa 20 min Inkubation bei RT konnte das polymerisierte Gel mit Parafilm abgedichtet und über Nacht bei 4°C verwahrt werden.

Am folgenden Tag wurden die Proben zur Hybridisierung mit der „heißen“ Sonde inkubiert. Hierzu wurden 8 µg Nuklearextrakte, eventuell mit Antikörper (2 µg) oder kalter Sonde (2 µl, 100 µM) versetzt, in Aqua dest vorgelegt und erst im Kontrollbereich die „heiße Sonde“ zu dem Proben-Master-Mix zugegeben. Daraufhin wurde der Master-Mix auf die Proben verteilt und 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Gel zur Überprüfung ohne Proben laufen gelassen. Dafür wurde es von Parafilm, Boden-Spacer und Kamm befreit und die Geltaschen mit Aqua dest vorsichtig gespült. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer eingespannt und diese mit 1 x Tris-Glycin als Laufpuffer gefüllt. In die äußersten Geltaschen wurde 10 µl Farbmarder aufgetragen und das Gel bei 130 V in der Kühlkammer bei 4°C etwa 20 min laufen gelassen, um das gleichmäßige Laufverhalten des Gels zu überprüfen.

Nach dieser Inkubation erfolgte das eigentliche Bestücken des Gels. Dazu wurden erneut 10 µl Farbmarder in die äußersten Geltaschen und 20 µl Probe pro Geltasche aufgetragen und das Gel etwa 3 Stunden bei 130 V bei 4°C laufen gelassen.

Um das Gel anschließend zu trocknen, wurde es nach Beenden der Laufzeit (Farbmarder bei etwa  $\frac{3}{4}$  des Gels) aus der Apparatur herausgebaut, von den Glasplatten gelöst, auf ein Filterpapier gelegt und mit Klarsichtfolie bedeckt. Zum Schutz wurde es nochmals in Filterpapier eingebettet und dann in der Trockenvorrichtung bei 45°C und angeschlossener Vakuumpumpe für etwa eine Stunde getrocknet. Dieser

Schritt war wichtig, um später klare unverschwommene Banden auf dem Film zu erhalten. Das trockene Gel wurde schließlich in eine Filmkassette gelegt, in der Dunkelkammer ein Film aufgelegt und für drei Tage in der Filmkassette belassen. Daraufhin wurde der Film entwickelt und die Banden ausgewertet.

## **2.10 Herstellung histologischer Präparate**

### **2.10.1 Fixierung der Proben und HE-Färbung**

Alle histologisch zu untersuchenden Proben wurden in 4,5% Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, am Mikrotom in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Glasobjektträger aufgezogen. Daraufhin folgte - außer bei der Penetrationsanalyse fluoreszierender ODN - eine Entparaffinierung der Schnitte (siehe „2.10.2 Immunhistochemie“), um anschließend verschiedene Färbungen durchführen zu können. Eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde durchgeführt, um den Gewebe- oder Hautmodell-Zustand beurteilen zu können. Bei dieser Färbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxilin angefärbt, sodass Zellkerne blau erscheinen, das Zytoplasma und Kollagen hingegen wird aufgrund des Eosins rot angefärbt.

#### Material:

4,5% Formalin-Lösung	(Fa. Roth, Karlsruhe)
Paraffin	(Fa. Micron International GmbH, Walldorf)
Rotationsmikrotom (Leica RM2125)	(Fa. Leica Microsystems, Wetzlar)
Glasobjektträger	(Fa. Menzel, Braunschweig)
HE-Färbelösung	(Fa. AppliChem, Darmstadt)

## 2.10.2 Immunhistochemie

### Material:

Xylol	(Apotheke des Universitätsklinikums, Frankfurt/Main)
Isopropylalkohol	(Apotheke des Universitätsklinikums, Frankfurt/Main)
96% Ethanol	(Fa. Riedel de Häen, Seelze)
70% Ethanol	(Fa. Riedel de Häen, Seelze)
PBS <sup>-</sup>	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Dako Cytomation EnVision Labelled Polymer-AP	(Fa. DakoCytomation, Zug, Schweiz)
Dako Cytomation Fast Red Substrate-Chromogen	(Fa. DakoCytomation, Zug, Schweiz)
UltraTech HRP (AEC) Kit (Streptavidin-Biotin Universal Detection System)	(Fa. Beckman & Coulter, Marseille, Frankreich)
HistoGreen Kit	(Fa. Linaris, Wertheim)
Citratpuffer	(Fa. DakoCytomation, Zug, Schweiz)
Hämatoxilin-Lösung	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
Aquatex	(Fa. Merck, Darmstadt)

### Primärantikörper:

- Anti-IL-8 (mouse), 1:400 verdünnt (Fa. Abcam, Cambridge, UK)
- Anti-HbD2 (rabbit), 1:400 verdünnt (Fa. Santa Cruz, Heidelberg)
- Anti-HbD3 (rabbit), 1:400 verdünnt (Fa. Chemicon, Schwalbach)
- Anti-Psoriasis (mouse), 1:600 verdünnt (Fa. Abcam, Cambridge, UK)
- Anti-Maus-Neutrophile (Fa. Serotec, Oxford, UK)

Zur Vorbereitung für das Entparaffinieren wurden die Objektträger für etwa 20 min im Brutschrank erwärmt, um das Paraffin zu verflüssigen. Anschließend wurden die Objektträger für viermal 10 min in Xylol bei RT gewaschen, worauf zweimal 5 min Inkubation in Isopropylalkohol, zweimal 5 min in 96% Ethanol und abschließend einmal 5 min Waschen in 70% Ethanol folgten. Daraufhin wurden die Schnitte kurz in Aqua dest gespült und zur Antigendemaskierung in Citratpuffer im Wasserbad bei 98°C für 20 min (im Falle der Maus-Neutrophilen für 40 min) gekocht und anschließend für 20 min bei RT abgekühlt. Im Fall der IL-8-Färbung wurden die Schnitte im Citratpuffer in der Mikrowelle aufgekocht (fünfmal 3 min). Die Schnitte wurden erneut kurz in Aqua dest gespült und danach anhand der verschiedenen Färbe-Systeme spezifisch gefärbt.

**Dako Cytomation System:**

Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper (in PBS<sup>-</sup> verdünnt) beschichtet und für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen für jeweils 5 min in PBS<sup>-</sup>, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Daraufhin folgte eine 30-minütige Inkubation des im System enthaltenen Sekundärantikörper-Gemischs (*Cytomation Labelled Polymer-AP*) bei RT, woraufhin die Objektträger erneut zweimal in PBS<sup>-</sup> gewaschen wurden. In der Zwischenzeit wurde das Chromogen *Fast Red* (Tablettenform) im zugehörigen Puffer gelöst. Dieses wurde für etwa 20 min bei RT auf den Schnitten inkubiert und überschüssiges Chromogen danach mit Aqua dest abgespült.

**UltraTech HRP Detection System:**

Die Objektträger wurden nach der Behandlung mit Citratpuffer mit *Protein Blocking Agent* (PBA) beschichtet und für 8 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Das PBA wurde von den Schnitten abgetropft und ohne anschließendes Waschen der Primärantikörper (in PBS<sup>-</sup> verdünnt) auf die Schnitte gegeben und für 45 min bei RT inkubiert. Es folgte dreimal Waschen der Objektträger für jeweils 2 min in PBS<sup>-</sup>, bevor das im Kit enthaltene biotinylierte Sekundärantikörper-Gemisch auf die Schnitte gegeben und für 15 min bei RT inkubiert wurde. Es folgte erneut dreimaliges Waschen für jeweils 2 min in PBS<sup>-</sup>. Danach wurden die Schnitte mit der im Kit enthaltenen Streptavidin-Peroxidase bedeckt und im Dunkeln für 10 min bei RT inkubiert, worauf ein erneutes dreimaliges Waschen für jeweils 2 min in PBS<sup>-</sup> folgte. Anschließend wurde die Substrat-Chromogen-Lösung aufgetragen und diese für 7 min bei RT inkubiert und überschüssige anschließend mit Aqua dest abgespült.

Bei allen Methoden folgte nun eine Gewebe-Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 min bei RT, worauf ein Bläuen mit kaltem Leitungswasser für 5 min folgte. Zum Eindecken der gefärbten Schnitte wurde Aquatex verwendet.

## 2.11 Quantitative Real-Time-PCR

Anhand dieser Methode wurde die mRNA Menge von IL-8 in unterschiedlich behandelten Zellen bestimmt. Hierzu wurde die totale RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels reverser Transkriptions-PCR in cDNA umgeschrieben. Diese wurde daraufhin in der *real-time* PCR eingesetzt, wobei das „Bio-Rad iQ iCycler Detection System“ mit „SYBR green“ als Fluorophor verwendet wurde. Die Menge der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zum PCR-Produkt und lässt somit Rückschlüsse über die Menge an Transkripten zu. Durch Verwendung von Primern spezifisch für ein house-keeping-gene werden die gemessenen Signale der target-Gene semiquantitativ ins Verhältnis gesetzt.

Die Zellen wurden, wie unter Material und Methoden 2.2.5 beschrieben, in 6-well-Multischalen ausgesät und am nächsten Tag bei Vorliegen einer Subkonfluenz mit ODN behandelt und nach einer erneuten Kultivierung über Nacht bei Standardbedingungen zur RNA-Isolierung verwendet.

### 2.11.1 RNA-Isolierung

#### Material:

TriReagent™	(Fa. Sigma-Aldrich, München)
Chloroform	(Fa. Fisher Scientific, Schwerte)
Isopropanol	(Fa. J.T. Baker, Deventer, Holland)
70% Ethanol	(Fa. AppliChem, Darmstadt)
Thermoblock	(Fa. Eppendorf, Hamburg)
Tris HCl pH 8,25	(Fa. Roth, Karlsruhe)
Ultrospec2000	(Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels TriReagent™ der Firma Sigma-Aldrich. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen. Nach dem Verwerfen des Mediums auf den Zellen und anschließendem Waschen mit

PBS<sup>++</sup>, wurde 1 ml TriReagent<sup>TM</sup> je well zugegeben. Während dieser Inkubation werden Zellstrukturen zerstört, die RNA jedoch bleibt intakt. Die Suspension aus TriReagent<sup>TM</sup> und Zellen wurde in sterile Reaktionsgefäße überführt und durch die Zugabe von 200 µl Chloroform je Gefäß und das anschließende Zentrifugieren drei Phasen gebildet: eine organische, eine wässrige und die Inter-Phase. Die RNA ist nun ausschließlich in der wässrigen Phase gelöst, während DNA in der Interphase zu finden ist; die organische Phase enthält Proteine. Nach dem Transfer der wässrigen Phase in neue Reaktionsgefäße, wurde die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol je Ansatz und Inkubation für 10 min bei RT ausgefällt. Der Alkohol konkurriert mit der Phosphatgruppe der Nukleinsäure um die Bindung zum Wasser. Da der Alkohol aber eine höhere Affinität zum Wasser hat, wird der Nukleinsäure das Wasser entzogen und sie fällt aus. Nach Zentrifugation wurden die Überstände möglichst vollständig verworfen und die Pellets im Thermoblock bei 56°C vom restlichen Alkohol befreit. Die RNA wurde daraufhin in 35 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen und zur vollständigen Eluation weitere 10 min bei 56°C inkubiert. Für die photometrische Quantifizierung wurde die RNA-Lösung 1:60 mit Tris-HCl verdünnt und am Ultrospec2000 gemessen. Die restliche RNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

### 2.11.2 Reverse Transkriptions-PCR

#### Material:

Random Primer	(Fa. Promega, Mannheim)
First Strand Buffer	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
dNTP	(Fa. Promega, Mannheim)
Thermo Cycler T3	(Fa. Biometra, Göttingen)

In diesem Schritt wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden 5 µg RNA mit Random Primern versetzt und mit Aqua ad injectabilia auf 22 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Bei den Random-

Primern handelt es sich um Oligo-d(T)-Primer, also Sequenzen mit mehreren Thymin-Basen, welche sich komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA anlagern. Die Proben wurden daraufhin bei 70°C für 10 min inkubiert, um ein Binden der Primer an die Template-RNA zu ermöglichen. Es folgte daraufhin die Zugabe von 8 µl First Strand Buffer, 4 µl DTT und 2 µl dNTPs je Probe, worauf eine Inkubation bei 25°C für 10 min folgte. Zur reversen Transkription wurden die Proben nun mit RNaseOUT und der Reversen Transkriptase versetzt und für 52 min bei 42°C inkubiert. Daraufhin folgten 15 min bei 70°C und im Anschluss eine Lagerung bei 4°C.

### 2.11.3 *Real-time* PCR

Die *real-time* PCR dient der Quantifizierung eines in unterschiedlichen Mengen in den Proben enthaltenen Templates. Hierzu wurde die im vorangegangenen Schritt unspezifisch synthetisierte cDNA mit spezifischen Primern für IL-8 als *gene of interest* und als Abgleich mit Primern gegen die in allen Zellen vorkommende Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *house-keeping gene* versetzt. Bei der *real-time* PCR wird in jedem PCR-Schritt ein Fluorophor in die neu synthetisierten Stränge eingebaut und die Quantifizierung anhand Fluoreszenz-Messungen während des PCR-Zyklus parallel in Echtzeit (*real time*) durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, wodurch eine Aussage darüber getroffen werden kann, wie viel Template ursprünglich in jeder Probe enthalten war – und rückschließend auch, wie viel RNA in den unterschiedlich behandelten Zellen vorlag.

#### Material:

IQ-Sybr-Mix (2-fach konzentriert)

(Fa. ABgene, Hamburg)

Primer GAPDH:

(Fa. MWG Biotech, Ebersberg)

286: 5'-ATC TTC CAG GAG CGA GAT CC-3'

788: 5'-ACC ACT GAC ACG TTG GCA GT-3'

---

Primer IL-8: (Fa. MWG Biotech, Ebersberg)  
IL-8-1532: 5'-ACA AGA GCC AGG AAG AAA CC-3'  
IL-8-2895: 5'-CTC TCT TCC ATC AGA AAG CT-3'  
iCycler (Fa. Bio-Rad, München)

Die *real-time* PCR wurde in 3-fach Ansätzen mit jeweils 30 µl Reaktionsvolumen gemessen. Hierzu wurden zu Beginn 45 µl IQ-Sybr-Mix, 4,5 µl (0,5 µM) Primer *forward* und 4,5 µl (0,5 µM) Primer *reverse*, sowie 0,9 µl Template mit 35,1 µl Aqua ad injectabilia vermischt, auf drei Vertiefungen in der iCycler-Multiwell-Schale verteilt und im iCycler-Gerät automatisch gemessen.

## 2.12 Luciferase – Reporter – Assay

Anhand des Luciferase-Reporter-Assays lassen sich Aussagen darüber treffen, wie stark die Promoteraktivität eines Genes in unterschiedlich behandelten Zellen reguliert wird. Hierzu wurden Plasmide in HaCaT-Keratinocyten transfiziert (siehe Material und Methoden 2.5), in denen die Promoterregion des zu untersuchenden Proteins (HbD2) oder fünfmal die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor (TF) NFκB hintereinander vor die Firefly-Luciferase geschaltet ist. Wird die Promoterregion (oder die TF-Bindestelle) in verschieden behandelten Zellen unterschiedlich aktiviert, wird auch die Firefly-Luciferase in verschiedenen Mengen in den Zellen synthetisiert. Die Firefly-Luciferase katalysiert die oxidative Decarboxylierung des Luciferins zu Oxyluciferin, wobei eine Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm stattfindet. Zur Transfektionskontrolle wurde parallel ein Plasmid in die Zellen transfiziert, das für die Renilla-Luciferase hinter der Promoterregion des *house-keeping genes* (Thymidin-Kinase) kodiert (phRL-TK), welche ein anderes Substrat umsetzt als die Firefly-Luciferase (Coelenterazine) und dabei Licht in einer Wellenlänge von 482 nm freisetzt. Somit können beide Luciferase-Aktivitäten in der gleichen Probe gemessen werden. Aus dem Quotienten aus Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität wird die relative Luciferase-Aktivität bestimmt.

Sie ist ein Maß für die Promoter- (oder TF-) Aktivität und berücksichtigt mögliche Unterschiede in der jeweiligen Transfektionseffizienz. Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Material:

HbD2-Firefly-Plasmid (pGL3-PV-Vektor)	(Dr. Noel McElvaney, Dublin, Irland)
NFκB-Reporter-Konstrukt (pGL3-Vektor)	(Marion P. Boland, Dublin, Irland)
phRL-TK Plasmid (Renilla Luciferase)	(Fa. Promega, Mannheim)
Dual Luciferase® Reporter Assay System	(Fa. Promega, Mannheim)
Reagenz-Röhrchen	(Fa. Sarstedt, Nümbrecht)

- „Luciferase Assay Substrate“ in 10 ml zugehörigem Puffer lösen, Aliquots zu 1000 / 500 / 200 µl bei -80°C lagern. 100 µl Substrate / Probe in Messung einsetzen
- „Stop and Glo“ (50-fach konzentriert) mit zugehörigem Puffer verdünnen. 100 µl Mischung / Probe in Messung einsetzen

Luciferase-Messgerät (Lumat LB9507) (Fa. EG & G Berthold, Regensburg)

Das Luciferase-Plasmid für HbD2-Promoteraktivitätsstudien wurde freundlicher Weise von Dr. Noel McElvaney (Dept. of Medicine, Education and Research Centre, Beaumont Hospital, Dublin, Irland) bereitgestellt. Es enthält den humanen HbD2-Promoter mit der Sequenz 5'-GGC TCG AGG CTC AGA CAT CAG CAC CCA AA-3' im pGL3-PV-Plasmid der Firma Promega (Griffin et al. 2003). Das NFκB-Reporter-Konstrukt wurde freundlicher Weise von Marion P. Boland (Dept. of Biochemistry, Trinity College, Dublin, Irland) zur Verfügung gestellt. Es enthält fünfmal die NFκB-Konsensussequenz (5'-GGG ACT TCC-3') vor dem Luc+ Gen im pGL3-Vektor (Boland und O'Neill 1998).

Transfizierte und ODN-behandelte Zellen wurden über Nacht im begasten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Morgen lysiert. Alle Angaben beziehen sich auf 12-well-Multischalen-Platten. Zum Lysieren wurden die Zellen mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend mit 250 µl *Passive Lysis Buffer* pro well (1:4 mit Aqua ad injectabilia verdünnt) 10 min bei RT auf der Wippe inkubiert. Die Lyse wurde nach Ablauf der

Zeit mikroskopisch kontrolliert und bei vollständiger Lyse der Zellen die Überstände in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Suspensionen abzentrifugiert und 10 µl anschließend in die Messung eingesetzt. Zur Firefly-Messung wurde jede Probe einzeln im Luciferase-Röhrchen mit 100 µl Substrat vermischt und sofort gemessen. Auf diese Weise wurden zuerst alle Proben gemessen. Zur Messung der Renilla wurden anschließend 100 µl „Stop and Glo“ – Mischung zu jeder Probe einzeln gegeben, diese kurz geschüttelt, sofort gemessen und ebenfalls die Proben-Reihe vollständig durch gemessen.

## 2.13 Aufnahme fluoreszierender ODN in Keratinozyten-Monolayer

### Material:

Fluoreszenz-markierte ODN	(Fa. Biospring, Frankfurt/Main)
4-well Labtek	(Fa. Nunc, Wiesbaden)
PBS <sup>++</sup>	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
SytoxGreen	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Bodipy	(Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

### Fixierlösung:

- 95% Ethanol (Fa. Riedel de Häen, Seelze)
- 5% Essigsäure (Fa. AppliChem, Darmstadt)

Aquatex	(Fa. Merck, Darmstadt)
Konfokales Laser Scan Mikroskop	(Fa. TCS Leica, Bensheim)

Zur Untersuchung der ODN-Aufnahme in Zellen wurden HaCaT-Keratinozyten in 4-well Labteks (Glas) wie in 2.2.5 „Passagieren und Aussäen der Zellen“ beschrieben, ausgesät.

Am nächsten Tag folgte nach Waschen mit PBS<sup>++</sup> ein Mediumwechsel auf 1 µM ODN-haltiges Medium, welches für 1 min bei RT auf den Zellen

inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit PBS<sup>++</sup> erfolgte ein Mediumwechsel auf 500 µl ODN-freies Medium, welches für 5 min, 10 min, eine Stunde oder 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt auf den Zellen belassen wurde.

Anschließend wurde das Medium verworfen und Reste durch zweimaliges Waschen mit jeweils 500 µl kaltem PBS<sup>++</sup> pro well entfernt. Um die Zellen auf der Glasoberfläche zu fixieren, wurden daraufhin 500 µl kalte Fixierlösung pro well zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Zellkern-Färbung wurde SytoxGreen verwendet, dessen Stocklösung 1:10 000 mit PBS<sup>++</sup> verdünnt und die Lösung für 10 min bei RT auf den Zellen inkubiert wurde. Zur Zellmembran-Färbung wurde Bodipy verwendet, das 1 µM in PBS<sup>++</sup> verdünnt und die Lösung 20 min bei RT inkubiert wurde.

Nach Entfernen der Fixierlösung und der Kammerumrandung wurde der Objektträger in Aquatex eingebettet.

Die Präparate wurden bei 4°C dunkel gelagert bis sie am Konfokalen Laser Scan Mikroskop untersucht werden konnten.

## 2.14 Topische Applikation von ODN auf 3D-Hautmodelle

### Material:

(Fluoreszenz-markierte) ODN	(Fa. Biospring, Frankfurt/Main)
3D-Hautmodelle	(Fa. Phenion GmbH, Düsseldorf)
Filterpapier	(Fa. Bio-Rad, München)
Ali-Medium-Agarplatten	(Fa. Phenion, Düsseldorf)
Edelstahlmuttern Außen-Ø: 1,2 cm, Innen-Ø: 0,7 cm	
Vaseline weiß EuAB	(Fa. Bombastus-Werke AG, Freital)
Skalpell	(Fa. Feather Safety Razor, Osaka, Japan)
4,5% Formalin-Lösung	(Fa. Roth, Karlsruhe)
Paraffin	(Fa. Micron International GmbH, Walldorf)
Rotationsmikrotom (Leica RM2125)	(Fa. Leica Microsystems, Wetzlar)
Glasobjektträger	(Fa. Menzel, Braunschweig)
Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM IRB)	(Fa. Leica Microsystems, Wetzlar)

Zur Untersuchung des Penetrationsverhaltens der ODN in mehrschichtige Epithelien oder zur Induktion hauteigener anti-mikrobieller Peptide in Hautmodellen nach topischer Applikation, wurden (Fluoreszenz-gekoppelte) ODN topisch auf das *3D-full-thickness skin model* der Firma Phenion aufgetragen. Um ein Herunterfließen der ODN an den Seiten der Hautmodelle, was zu einer systemische Aufnahme der ODN geführt hätte, zu verhindern, wurden die Hautmodelle mit Edelstahlmuttern bestückt. Diese Muttern wurden an der Unterseite zur Abdichtung mit Vaseline bestrichen und auf die Modelle gesetzt, welche zur Stabilisierung auf Medium-getränktem Filterpapier auf Ali-Medium-Agarplatten gehalten wurden (Abbildung 2.2). Ins Innere der Muttern wurden nun 15  $\mu\text{l}$  (Fluoreszenz-gekoppelte) ODN (200  $\mu\text{M}$ ) gegeben und die Modelle unterschiedlich lange mit den ODN inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Muttern entfernt (Abbildung 2.2 b), die Modelle in der Mitte mit einem Skalpell durchgeschnitten, in 4,5% Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Die in Paraffin eingebetteten Modell-Hälften wurden daraufhin an der Skalpell-Schnittstelle am Mikrotom in 4  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten und auf Glasobjektträger aufgezogen, um zu gewährleisten, dass die Bereiche der Modelle geschnitten wurden, die im Innern der Mutter lagen.



**Abbildung 2.2: Versuchsaufbau zur Penetration Fluoreszenz-gekoppelter ODN in 3D-Hautmodelle.** Um ein Herunterfließen der ODN von den Hautmodellen zu vermeiden, wurden mit Vaseline bestrichene Muttern auf die Hautmodelle aufgesetzt, 15  $\mu\text{l}$  ODN-Lösung (200  $\mu\text{M}$ ) ins Innere gegeben und unterschiedlich lange inkubiert. **(a)** Versuchsaufbau mit Mutter-bestückten Hautmodellen auf Medium-getränktem Filterpapier auf Ali-Medium-Agarplatten. **(b)** Hautmodelle nach der Inkubation von nicht fluoreszierendem CpG-1-PTO (oben) und Fluoreszenz-gekoppeltem Cy3-CpG-1-PTO (unten). Man erkennt deutlich den Rand, den die mit Vaseline bestrichene Mutter auf dem Hautmodell unten hinterlassen hat.

Zur Fluoreszenz-Analyse wurden die Schnitte im Anschluss ohne weitere Behandlung am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet, um ein Ausbleichen oder Auswaschen der Fluoreszenz zu unterbinden.

Zur immunhistochemischen Analyse wurden die Schnitte daraufhin, wie unter Material und Methoden 2.10.2 beschrieben, angefärbt.

## 2.15 Induktion einer Kontakt-Dermatitis im Maus-Modell

### Material:

DNFB-Lösung 4:1 Aceton/Olivenöl, vol/vol (Fa. Sigma-Aldrich, München)

DAC Basis-Salbe

100g enthalten: 1x Tegin-M (Emulsifier), 4% Tetylalkohol, 6% Mygliol, 7,5% Vaseline, 25,5% Tagat, 7,0% Macrogol-1000-Glycerolmonosterate, 10.0% Propylenglycol, 40.0% Wasser (Apotheke des Universitätsklinikums, Frankfurt/Main)

1,4% (w/w) ODN-haltige DAC Salbe: (Fa. Biospring, Frankfurt/M; Apotheke des Universitätsklinikums, Frankfurt/M)

CpG-1-PTO: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3'

Non-CpG-5-PTO: 5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC-3'

Dermatop® (0,25% Prednicarbat) (Fa. Sanofi-Aventis, Frankfurt)

Mikrometer (Fa. Mitutoyo, Neuss)

Männliche 6 – 10 Wochen alte C57BL/6 Mäuse der Firma Charles River, Sulzfeld wurden mit frei zugänglichem Futter und Wasser gehalten. Alle durchgeführten Tierversuche waren genehmigt und wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG Fassung vom 25. Mai 1998) durchgeführt.

Um eine allergische Kontakt-Dermatitis (*contact hypersensitivity*) hervorzurufen, wurde den Mäusen an Tag 0 zur Sensibilisierung 75 µl einer 0,5%igen DNFB-Lösung auf dem Rücken appliziert. Es folgte eine Re-Exposition an Tag 5, indem 10 µl einer 0,3%iger DNFB-Lösung auf das jeweils rechte Ohr der Mäuse appliziert wurde. Nach 60 min folgte eine Behandlung des re-exponierten Ohrs mit Basis-Salbe (DAC) ohne wirksame Bestandteile, 1,4%iger CpG-1-PTO- oder Non-CpG-5-PTO-

---

haltigen Salbe. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Prednicarbat-haltige Salbe (Dermatop<sup>®</sup>) mitgeführt, da bekannt ist, dass Kortison-haltige Salben einen anti-inflammatorischen Effekt auf Keratinozyten ausüben (Stein et al. 1997). Das kontra-laterale Ohr wurde mit Basis-Salbe behandelt. 24 Stunden nach der Re-Exposition wurde die Kontakt-Dermatitis Reaktion analysiert. Hierzu wurden die jeweiligen Ohrschwellungen mittels abgefedertem Mikrometer vermessen und die Ohren zur histologischen Untersuchung entnommen (siehe Material und Methoden 2.10).

## 2.16 Hemmhoftest zur Bestimmung anti-mikrobiell wirksamer Peptide

### Material:

Zellen des Stamms *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

### LB-Medium

- 20 g / Liter LB Broth Base (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

► autoklavieren, Lagerung bei 4°C

### Agarplatten

- 37 g / Liter Luria Agar (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

► autoklavieren, 15 ml pro Petrischale abfüllen, Lagerung bei 4°C

HaCaT-Keratinozyten wurden, wie unter „2.2.5 Passagieren und Aussäen der Zellen“ beschrieben, in 24-well Multischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf Antibiotika-freiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach Waschen mit PBS<sup>++</sup> ein Mediumwechsel auf 500  $\mu$ l frisches, Antibiotika-freies Medium, versetzt mit 6  $\mu$ M CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO, teilweise in Anwesenheit von 20 ng/ml TNF $\alpha$  oder abgetöteten DH5 $\alpha$ -Zellen. Diese wurden zuvor in 500 ml LB-Medium ohne Selektions-Antibiotikum über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bis zum Erreichen der stationären Phase gezogen und vor dem Einsetzen in die

Zellkultur autoklaviert. Nach Abkühlen der Zellsuspension wurden 50 µl / well (entsprechend einer Menge von etwa  $5 \times 10^7$  Zellen) eingesetzt. Die Zellen wurden daraufhin erneut über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurden die zellfreien Kulturüberstände entnommen und Filterplättchen mit je 70 µl dieser Überstände getränkt. Die Filterplättchen wurden direkt auf Agarplatten, auf denen kurz zuvor DH5α-Zellen in PBS<sup>++</sup> ausplattiert wurden, gelegt, die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag die Hemmhöhe ausgewertet. Zur Kontrolle wurden auch Überstände unbehandelter Zellen mitgeführt; als Positiv-Kontrolle diente Gentamycin-haltiges Medium.

## 2.17 Weitere Substanzen

Bafilomycin A1, <i>Streptomyces griseus</i>	(Fa. Calbiochem, Darmstadt)
Chloroquine Diphosphat Salz	(Fa. Sigma- Aldrich, München)
Human TNFα	(Fa. Cell Concepts, Umkirch)
NFκB-Inhibitor SN50 ( <i>Cell permeable inhibitor peptide</i> )	(Fa. Calbiochem, Darmstadt)

## 2.18 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mittels „Mann-Whitney U-Test“ von *SalStats* (Boston, MA, USA) durchgeführt. Genaue Angaben zur Evaluierung der jeweiligen statistischen Signifikanzen befinden sich in den Abbildungsunterschriften.

---

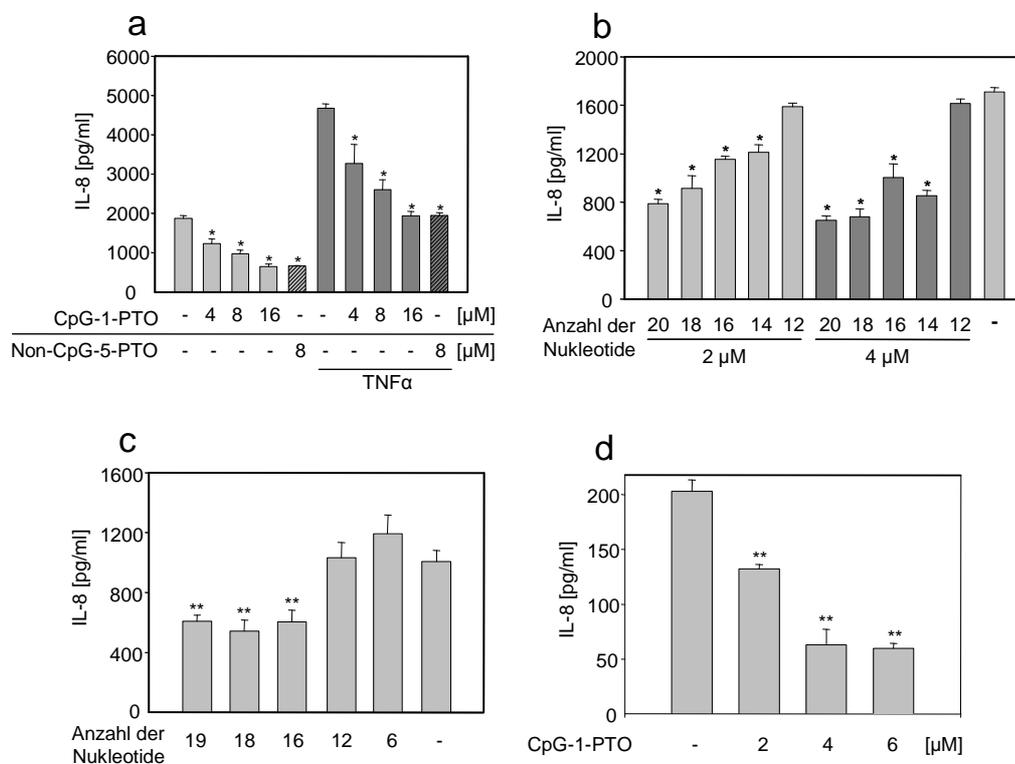
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 ODN mit und ohne CpG-Motiv bewirken eine IL-8-Suppression *in vitro*

Eine Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit dem 20-mer CpG-1-PTO für 18 Stunden führt zu einer Suppression von IL-8 gemessen an Zellkulturüberständen (Abbildung 3.1). Sowohl basale als auch durch 20 ng/ml TNF $\alpha$  induzierte IL-8-Level werden durch CpG-1-PTO konzentrationsabhängig reduziert. Erstaunlicher Weise wird auch durch Non-CpG-5-PTO, das kein CpG-Motiv aufweist, das IL-8-Level supprimiert (Abbildung 3.1 a). Um zu untersuchen, ob die Längen der ODN einen Einfluss auf den IL-8 supprimierenden Effekt ausüben, wurden Deletionsmutanten von CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO untersucht. Abbildungen 3.1 b und 3.1 c zeigen, dass eine sequentielle Deletion der ODN zu einer Abnahme der IL-8-Suppression führt. Sequenzen mit einer Länge von 16 Nukleotiden und mehr wurden bei beiden ODN als besonders wirksam in Bezug auf die IL-8-Suppression identifiziert. Zusätzlich zu HaCaT-Zellen wurden auch primäre Keratinocyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von CpG-1-PTO behandelt. Abbildung 3.1 d zeigt die konzentrationsabhängige IL-8-Suppression von CpG-1-PTO an primären Keratinocyten.

Um zu untersuchen, ob Hexamere (CpG-9-PTO und Non-CpG-5G-PTO), die in dem verwendeten Konzentrationsbereich keine IL-8-Suppression auslösen, möglicherweise mit den jeweiligen 20-mer Analogen um die selbe Bindungsstelle eines Rezeptors konkurrieren, wurden die langen und kurzen Analoge parallel auf den Zellen inkubiert (Abbildung 3.2 a und 3.2 b). Es zeigt sich, dass die IL-8-Suppressionen durch 2  $\mu$ M CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO durch aufsteigende Konzentrationen (1 – 16  $\mu$ M) von CpG-9-PTO beziehungsweise Non-CpG-5G-PTO nicht beeinflusst werden. Dies bedeutet, dass kurze, ineffektive ODN anscheinend nicht

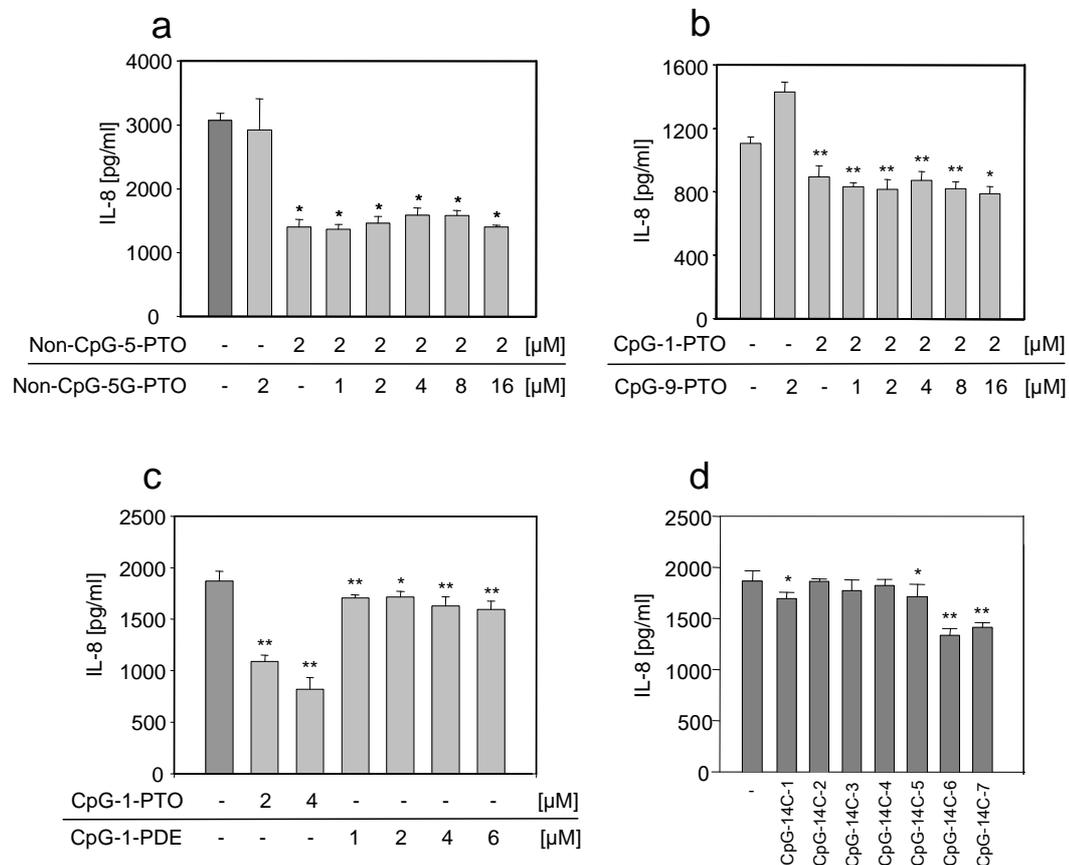
mit den jeweils analogen IL-8-supprimierenden 20-mer ODN um die gleiche Rezeptor-Bindestelle konkurrieren.



**Abbildung 3.1: Oligonukleotide mit und ohne CpG-Motiv bewirken die Suppression sowohl basaler als auch TNF $\alpha$ -induzierter IL-8 Level. (a)** HaCaT-Keratinozyten wurden für 18 Stunden mit CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO in angegebenen Konzentrationen, teilweise unter Zugabe von 20 ng/ml TNF $\alpha$ , inkubiert. Zellfreie Überstände wurden zur IL-8-Analyse verwendet. Sowohl CpG-1-PTO mit zwei klassischen CpG-Motiven als auch Non-CpG-5-PTO ohne CpG-Motive zeigen eine (konzentrationsabhängige) Suppression des basalen und TNF $\alpha$ -induzierten IL-8 Levels. Deletionsmutanten von **(b)** Non-CpG-5-PTO (2 und 4  $\mu$ M) und **(c)** CpG-1-PTO (4  $\mu$ M) weisen eine längenabhängige IL-8-Suppression auf. **(d)** Primäre Keratinozyten wurden für 18 Stunden mit angegebenen Konzentrationen von CpG-1-PTO inkubiert. Es ist eine konzentrationsabhängige Suppression des basalen IL-8 Levels zu erkennen. \*P<0,1; \*\*P<0,01 verglichen zu Kontrollen ohne ODN-Behandlung.

Im Folgenden wurde untersucht, ob das ODN-Rückgrat bei der IL-8-Suppression eine Rolle spielt (Abbildung 3.2 c). CpG-1-ODN wurde mit unterschiedlichen Rückgrat-Bindungen synthetisiert: Phosphodiesterbindungen (PDE) und PTO-Rückgrat. Es zeigt sich, dass CpG-1-PDE lediglich eine marginale IL-8-Suppression in den getesteten Konzentrationen (1 – 6  $\mu$ M) aufweist verglichen mit CpG-1-PTO. Dies deutet darauf hin, dass einerseits die ODN-Halbwertszeit eine Rolle bei der vermittelten IL-8-Suppression spielt, andererseits könnten auch die Phosphorothioat-Bindungen des Rückgrates als solche einen IL-8-

supprimierenden Effekt ausüben. Es ist bekannt, dass diese Rückgrat-Bindungen alleine bereits in der Lage sind, eine Immunstimulierung hervorzurufen (Hutcherson und Glover, 1998).

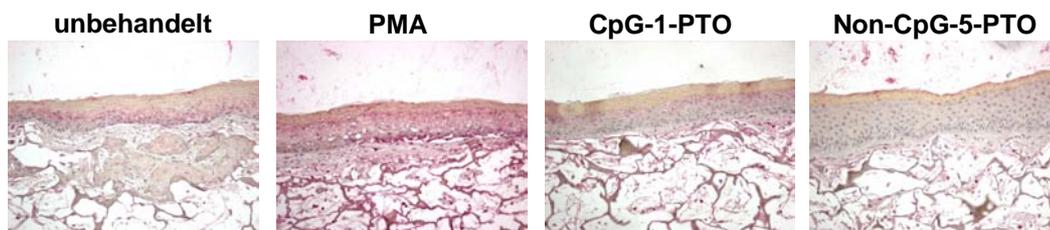


**Abbildung 3.2: Keine Beeinflussung der CpG-1-PTO- und Non-CpG-5-PTO-vermittelten IL-8-Suppression durch ineffektive Hexamere. ODN-Rückgrat-Modifizierungen verändern den IL-8-supprimierenden Effekt von CpG-1-PTO.** HaCaT-Keratozyten wurden für 18 Stunden mit **(a)** 2 µM Non-CpG-5-PTO oder **(b)** 2 µM CpG-1-PTO zusammen mit ineffektiven Analogen (Non-CpG-5G-PTO und CpG-9-PTO) in angegebenen Konzentrationen inkubiert. Zellfreie Überstände wurden zur IL-8-Analyse verwendet. Die Non-CpG-5-PTO- und CpG-1-PTO-vermittelte IL-8-Suppression ist nicht beeinflussbar durch die Anwesenheit ineffektiver Analoge. **(c)** HaCaT-Keratozyten wurden für 18 Stunden mit CpG-1-ODN mit unterschiedlichen Rückgrat-Modifikationen in angegebenen Konzentrationen inkubiert. Zellfreie Überstände wurden zur IL-8-Analyse verwendet. CpG-1-ODN mit Phosphodiester (PDE)-Bindungen weisen lediglich einen marginalen IL-8-suppressiven Effekt, verglichen zu CpG-1-PTO, auf. **(d)** HaCaT-Keratozyten wurden für 18 Stunden mit Derivaten von CpG-1-PTO (CpG-14C-ODN) mit unterschiedlichen Rückgrat-Modifikationen in der Konzentration von 2 µM inkubiert. Zellfreie Überstände wurden zur IL-8-Analyse verwendet. ODN mit einem PTO-Anteil von über 50%, unabhängig von der Lage der PTO-Bindungen innerhalb der Sequenz, weisen eine deutlich erhöhte IL-8-Suppression auf. \*P<0,05; \*\*P<0,01 verglichen zu Kontrollen ohne ODN-Behandlung.

Um weiterführend zu untersuchen, ob Anzahl und Lage der PTO-Bindungen innerhalb der Sequenz eine Rolle spielen, wurden Derivate von CpG-1-PTO (CpG-14C-ODN) mit unterschiedlichen Rückgrat-

Modifikationen eingesetzt. Abbildung 3.2 d zeigt, dass ODN mit einem PTO-Anteil von über 50% zu einer erhöhten IL-8-Suppression in der Lage sind. Dieser Effekt ist sogar unabhängig davon, wo innerhalb der Sequenz sich die PTO-Bindungen befinden.

Um den IL-8 supprimierenden Effekt der ODN am Multilayer zu untersuchen, wurden 3D-Hautmodelle topisch, wie unter „2.14 Topische Applikation von ODN auf 3D-Hautmodelle“ beschrieben, mit CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO für 18 Stunden behandelt und im Anschluss, wie unter „2.10 Herstellung histologischer Präparate“ beschrieben, immunhistochemisch gegen IL-8 gefärbt (Abbildung 3.3). Zum Vergleich wurden unbehandelte Hautmodelle mitgeführt; als Positivkontrolle wurde Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) topisch appliziert. Hautmodelle, die mit Non-CpG-5-PTO behandelt wurden, weisen eine geringere Menge an IL-8 (rote Färbung) im Gewebe auf als unbehandelte Hautmodelle. Dieser Effekt ist bei CpG-1-PTO-behandelten Hautmodellen nur schwach zu erkennen. Bei PMA-behandelten Hautmodellen zeigt sich eine deutlich erhöhte Menge an IL-8 im Gewebe.



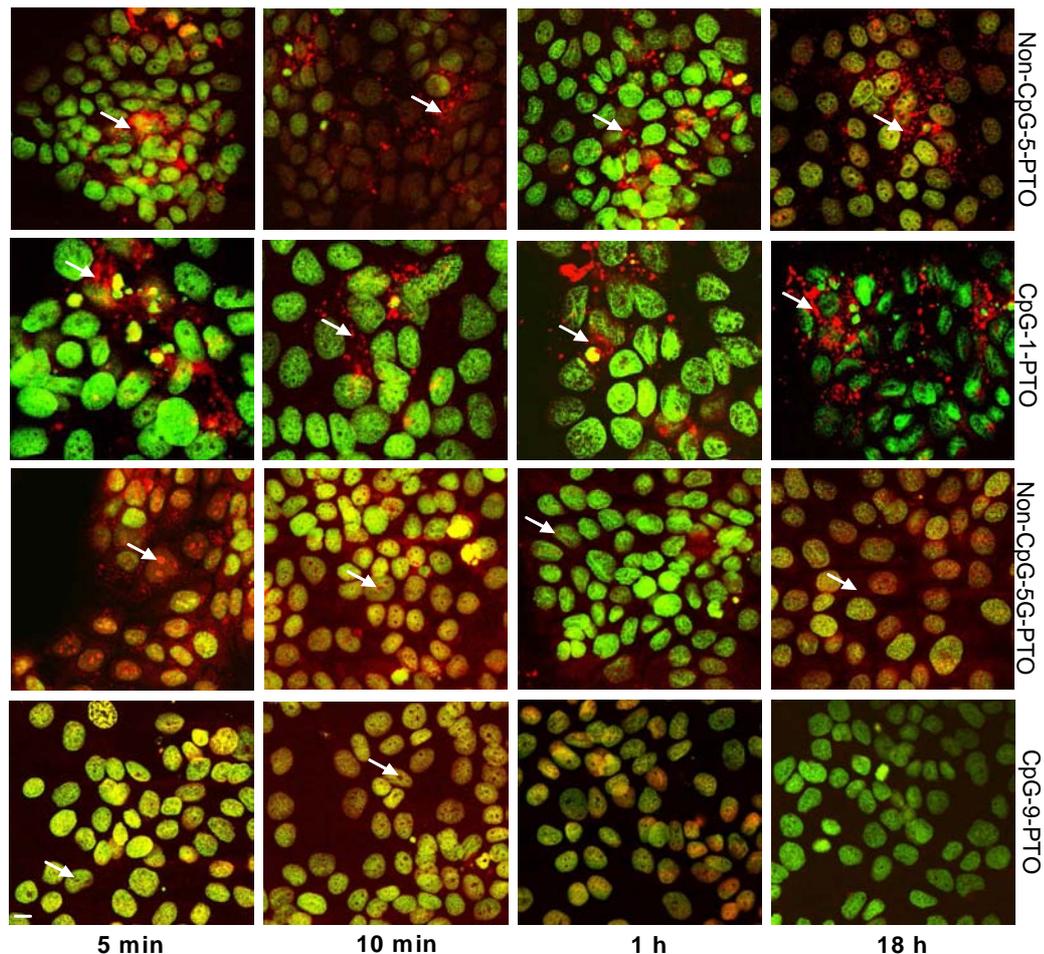
**Abbildung 3.3: Immunhistochemische Färbung gegen IL-8 am Phenion® 3D-Hautmodell.** Die Hautmodelle wurden für 18 Stunden topisch mit Phorbol-12-Myristate 13-Acetat (PMA), CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO behandelt, danach fixiert, in 4 µm dünne Proben geschnitten und mittels Antikörper gegen IL-8 gefärbt (rote Färbung) und kurz mit Hämatoxylin gegengefärbt (bläuliche Färbung). Hautmodelle, die mit Non-CpG-5-PTO behandelt wurden, zeigen eine geringere IL-8-Menge im Gewebe als unbehandelte Hautmodelle. Dieser Effekt ist bei CpG-1-PTO-behandelten Hautmodellen etwas geringer. Die Positivkontrolle (Behandlung mit PMA) zeigt eine deutlich erhöhte Menge an IL-8 im Gewebe.

---

### 3.2 ODN-Aufnahme, -Penetration und -Transport

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist bekannt, dass CpG-ODN mittels Endozytose in Zellen aufgenommen werden, wo sie an TLR9 im endosomalen Kompartiment binden. Im Folgenden wurden die Aufnahme und der Transport von ODN mit und ohne CpG-Motiv unterschiedlicher Länge in HaCaT-Keratinocyten untersucht.

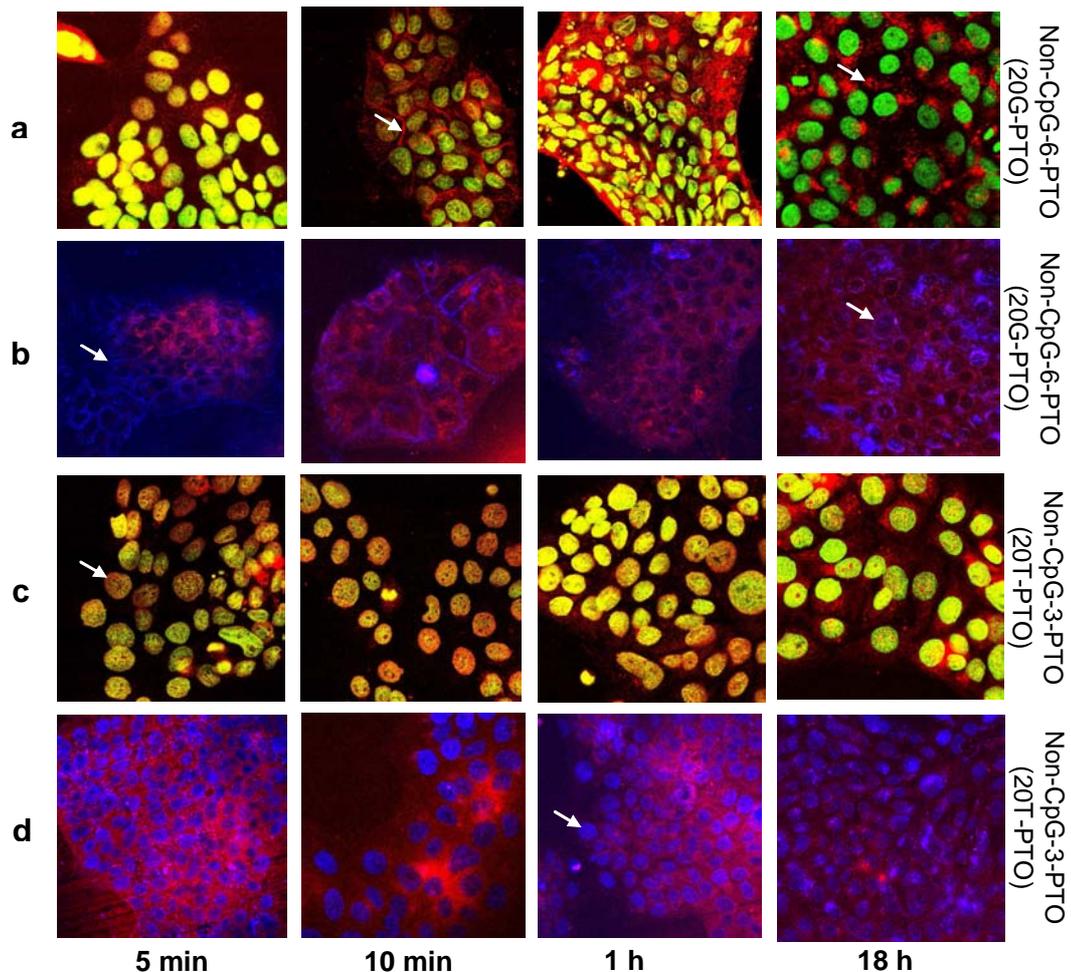
Hierzu wurden 5'-Fluoreszenz-markierte ODN für eine Minute auf den Zellen inkubiert, mit PBS abgespült und die Zellen auf frischem ODN-freiem Medium für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin fixiert und am Konfokalen Laser-Scan Mikroskop ausgewertet. Für eine verbesserte Lokalisations-Bestimmung der ODN wurde eine Zellkernfärbung mittels SytoxGreen oder eine Zellmembranfärbung mittels Bodipy durchgeführt (Abbildungen 3.4 und 3.5). In Abbildung 3.4 ist zu erkennen, dass beide 20-mer ODN (CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO) eine ähnliche Aufnahme-Kinetik aufweisen: bereits nach fünf Minuten gelangen beide ODN in die Zellen und akkumulieren in perinuklearen Clustern (Pfeile), die auch nach 18 Stunden noch sichtbar sind. Die Nuklei scheinen nahezu vollständig frei von CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO zu sein. Im Gegensatz dazu akkumulieren die beiden Hexamere CpG-9-PTO und Non-CpG-5G-PTO in den Nuklei und den Nukleoli der Zellen (Pfeile). Das Signal von Non-CpG-5G-PTO ist auch nach 18 Stunden noch in den Nukleoli sichtbar, ein schwaches Signal scheint im Zytoplasma vorzukommen (Pfeil). CpG-9-PTO ist dagegen nach 18 Stunden nicht mehr detektierbar, was für einen schnelleren Abbau der Sequenz spricht. Diese Ergebnisse deuten auf eine längenabhängige Aufnahme und einen längenabhängigen Transport hin.



**Abbildung 3.4: Der intrazelluläre Transport der ODN ist längenabhängig.** HaCaT-Keratinocyten wurden für eine Minute mit Cy-3-markierten ODN (orange-rot) und anschließend für die angegebenen Zeitintervalle mit ODN-freiem Medium inkubiert. Eine Nucleus-Färbung (grün) wurde mit SytoxGreen, wie in „Material und Methoden 2.13“ beschrieben, durchgeführt. Die 20-mere CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO gelangen bereits nach fünf Minuten in die Zellen und akkumulieren in perinuklearen Clustern (Pfeile), welche noch nach 18 Stunden sichtbar sind. Der Nucleus scheint frei von ODN zu bleiben. Die Hexamere CpG-9-PTO und Non-CpG-5G-PTO gelangen dagegen sofort in die Nuclei und Nucleoli (Pfeile). Maßstab = 10 µm.

Abbildung 3.5 zeigt die Aufnahme und den Transport zweier Non-CpG-ODN, markiert mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen, um einen Einfluss der Farbstoffe auf ODN-Aufnahme und –Transport auszuschließen. Die Zellen wurden nach dem gleichen Verfahren mit Fluoreszenz-markierten ODN behandelt, fixiert und mit SytoxGreen (oder Bodipy) gefärbt wie in Abbildung 3.4 gezeigt. Non-CpG-6-PTO, sowohl Cy3- als auch Cy5-markiert, zeigt sich auch nach einer Stunde noch fast ausschließlich an der Zellmembran (Abbildung 3.5 a, b, Pfeile) und bildet nach 18 Stunden perinukleare Cluster (Pfeile) ähnlich denen von CpG-1-

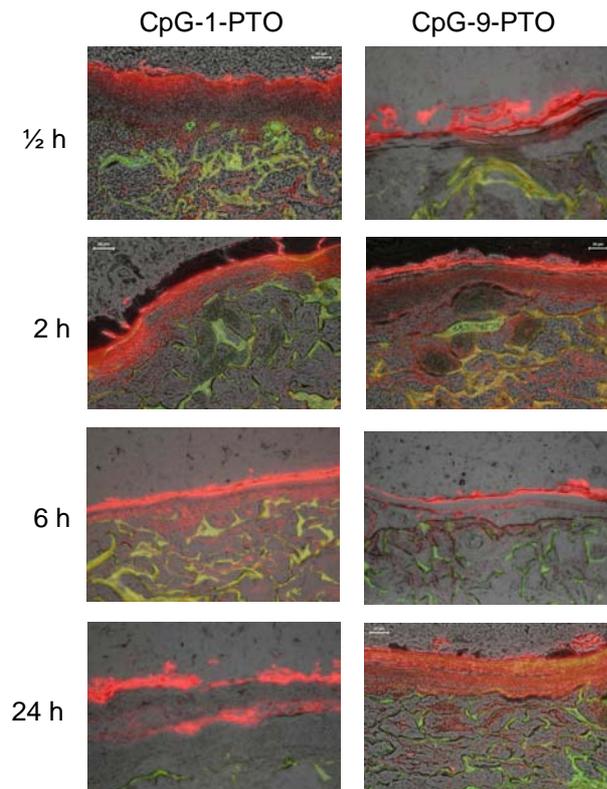
PTO und Non-CpG-5-PTO in Abbildung 3.4. Non-CpG-3-PTO (Abbildung 3.5 c, d) dagegen gelangt bereits nach fünf Minuten in die Nuklei – ähnlich den beiden Hexameren CpG-1-PTO und Non-CpG-5G-PTO in Abbildung 3.4, wo es auch nach einer Stunde (Pfeil) und nach 18 Stunden noch detektierbar ist.



**Abbildung 3.5: Der intrazelluläre Transport der ODN ist sequenzabhängig. (a, c)** HaCaT-Keratinocyten wurden für eine Minute mit Cy-3-markierten ODN (orange-rot) und anschließend für die angegebenen Zeitintervalle mit ODN-freiem Medium inkubiert. Eine Nukleus-Färbung (grün) wurde mit SytoxGreen, wie in „Material und Methoden 2.13“ beschrieben, durchgeführt. **(b, d)** HaCaT-Keratinocyten wurden für eine Minute mit Cy-5-markierten ODN (blau) und anschließend für die angegebenen Zeitintervalle mit ODN-freiem Medium inkubiert. Eine Zellmembran-Färbung (rot) wurde mit Bodipy, wie in „Material und Methoden 2.13“ beschrieben, durchgeführt. Während Non-CpG-6-PTO **(a, b)** auch noch nach einer Stunde fast ausschließlich an der Zellmembran lokalisiert vorliegt (Pfeile) und nach 18 Stunden perinukleare Cluster bildet (Pfeil), befindet sich Non-CpG-3-PTO **(c, d)** bereits nach fünf Minuten im Nukleus der Zellen, wo es auch nach einer Stunde (Pfeil) und nach 18 Stunden noch detektierbar ist.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich nicht nur um eine Längen-spezifische Aufnahme und Transport handelt wie in Abbildung 3.4 gezeigt, sondern auch um eine Sequenz-spezifische wie Abbildung 3.5 zu entnehmen ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe keinen Einfluss auf die Aufnahme und den Transport der ODN ausüben, da in Abbildung 3.5 die Aufnahme- und Transport-Kinetik gleicher ODN, die unterschiedlich Fluoreszenz-markiert wurden, gleich verläuft.

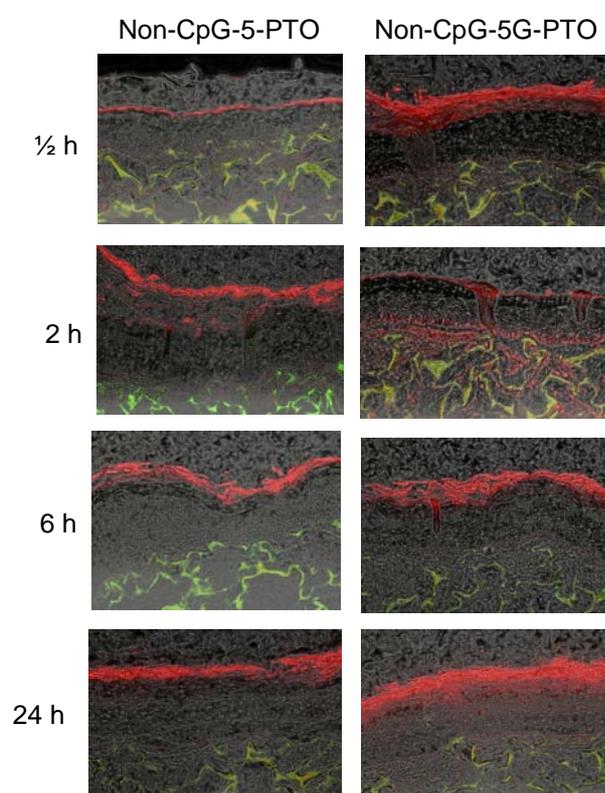
Folgend wurde überprüft, ob verschiedene ODN in der Lage sind, in die Haut zu penetrieren, da dies für den möglichen Einsatz von ODN-haltigen Salben von hohem klinischem Interesse ist. Auch hier sollte eine mögliche Längen- oder Sequenz-Spezifität der Penetration untersucht werden. Abbildung 3.6 zeigt die unterschiedliche Penetration von 5'-Fluoreszenz-markiertem CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO und Non-CpG-6-PTO in das Phenion® 3D-Hautmodell. Die ODN wurden, wie in „Material und Methoden 2.14“ beschrieben, topisch appliziert und die Hautmodelle nach verschiedenen Inkubationszeiten (0,5 – 48 Stunden) in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und nach Schneiden in 4 µm dünne Proben ohne Entparaffinierung am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet, um ein Ausbleichen oder Auswaschen der Fluoreszenz zu verhindern.



**Abbildung 3.6 (a): Penetration von Cy3-markiertem CpG-1-PTO und CpG-9-PTO in das Phenion<sup>®</sup> 3D Hautmodell.** Fluoreszenz-markierte ODN (orange-rot) wurden, wie in „Material und Methoden 2.14“ beschrieben, topisch auf die Hautmodelle appliziert, diese nach den angegebenen Inkubationszeiten fixiert, in 4 µm dünne Proben geschnitten und ohne Entparaffinierung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Um die Eigenfluoreszenz der Hautmodell-Matrix von der Fluoreszenz der ODN unterscheiden zu können, wurde diese mit Licht anderer Wellenlänge als Cy3 angeregt, über andere Filter detektiert und schließlich die Aufnahmen von Cy3 (rot-orange gefärbt) und von der fluoreszierenden Matrix (grün gefärbt) grafisch überlagert. Unbehandelte Kontrolle siehe Abbildung 3.6 (c). Beide ODN gelangen bereits nach einer halben Stunde in dermale Schichten.

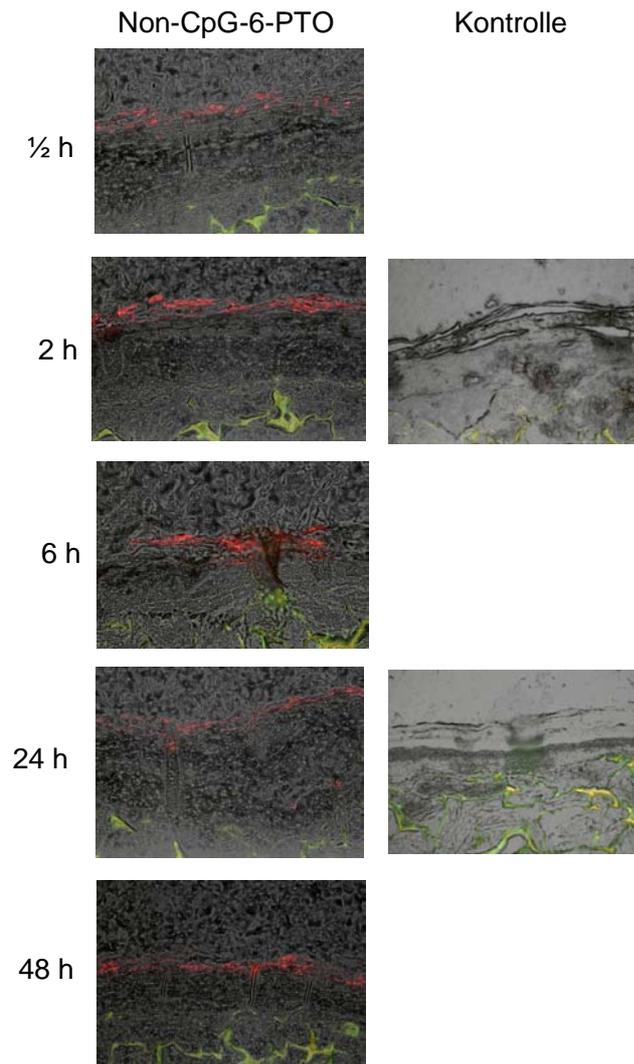
Da die Matrix des Phenion<sup>®</sup> 3D-Hautmodells eine Eigenfluoreszenz (Abbildung 3.6 c, grün) besitzt, die die visuelle Auswertung der Penetration nicht beeinflussen sollte, wurde diese mit Licht anderer Wellenlänge als Cy3 angeregt, über andere Filter detektiert und schließlich die Aufnahmen von Cy3 (rot-orange gefärbt) und von der fluoreszierenden Matrix (grün gefärbt) grafisch überlagert. Zur weiteren Kontrolle wurden unbehandelte Hautmodelle mitgeführt und am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht (Abbildung 3.6 c). Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl das 20-mer CpG-1-PTO als auch das analoge Hexamer CpG-9-PTO bereits nach einer halben Stunde in dermale Schichten gelangt (Abbildung 3.6 a). Auch das Hexamer Non-CpG-5G-PTO (Abbildung 3.6 b) gelangt bereits nach relativ kurzer Zeit (deutlich

erst nach zwei Stunden) in tiefere dermale Schichten, wohingegen das analoge 20-mer Non-CpG-5-PTO erst nach 24 Stunden in diesen Schichten detektierbar ist.



**Abbildung 3.6 (b): Penetration von Cy3-markiertem Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-5G-PTO in das Phenion® 3D Hautmodell.** Fluoreszenz-markierte ODN (orange-rot) wurden, wie in „Material und Methoden 2.14“ beschrieben, topisch auf die Hautmodelle appliziert, diese nach den angegebenen Inkubationszeiten fixiert, in 4 µm dünne Proben geschnitten und ohne Entparaffinierung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Um die Eigenfluoreszenz der Hautmodell-Matrix von der Fluoreszenz der ODN unterscheiden zu können, wurde diese mit Licht anderer Wellenlänge als Cy3 angeregt, über andere Filter detektiert und schließlich die Aufnahmen von Cy3 (rot-orange gefärbt) und von der fluoreszierenden Matrix (grün gefärbt) grafisch überlagert. Unbehandelte Kontrolle siehe Abbildung 3.6 (c). Während das Hexamer Non-CpG-5G-PTO bereits nach zwei Stunden deutlich in dermalen Schichten zu erkennen ist, benötigt das 20-mer Non-CpG-5-PTO 24 Stunden, um in dermale Schichten zu gelangen.

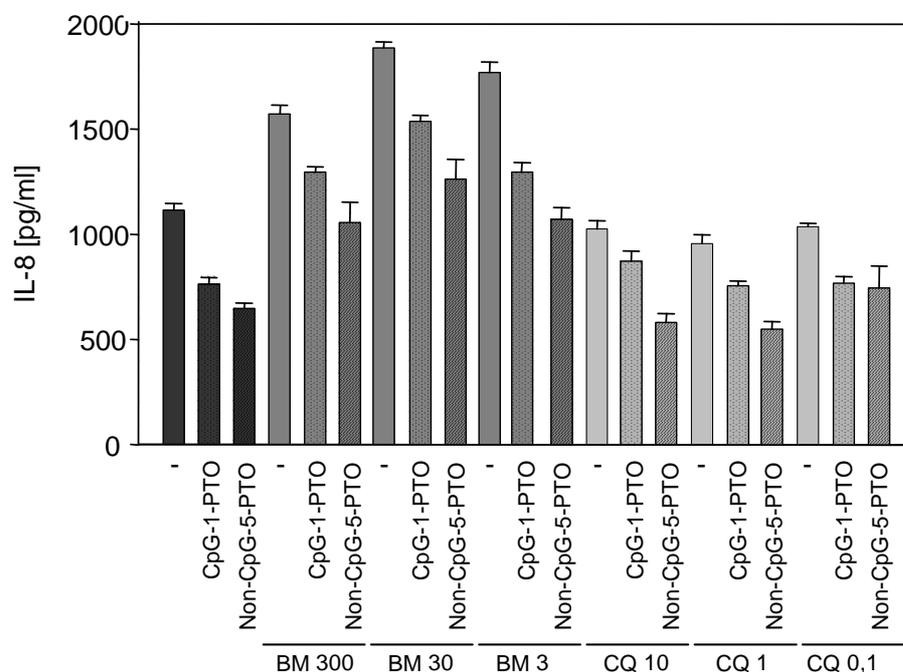
Non-CpG-6-PTO (Abbildung 3.6 c) scheint nicht in das Hautmodell zu penetrieren, da es auch nach 48 Stunden nicht in dermalen Schichten zu erkennen ist sondern immer noch auf der Oberseite der Epidermis. In den unbehandelten Kontroll-Hautmodellen ist lediglich die Eigenfluoreszenz der Matrix sichtbar, nicht jedoch die der Fluoreszenz-markierten ODN.



**Abbildung 3.6 (c): Keine Penetration von Cy3-markiertem Non-CpG-6-PTO in das Phenion® 3D Hautmodell und unbehandelte Kontrolle.** Das Fluoreszenz-markierte ODN (orange-rot) wurde, wie in „Material und Methoden 2.14“ beschrieben, topisch auf die Hautmodelle appliziert, diese nach den angegebenen Inkubationszeiten fixiert, in 4 µm dünne Proben geschnitten und ohne Entparaffinierung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Um die Eigenfluoreszenz der Hautmodell-Matrix von der Fluoreszenz der ODN unterscheiden zu können, wurde diese mit Licht anderer Wellenlänge als Cy3 angeregt, über andere Filter detektiert und schließlich die Aufnahmen von Cy3 (rot-orange gefärbt) und von der fluoreszierenden Matrix (grün gefärbt) grafisch überlagert. Bei der unbehandelten Kontrolle wurden ODN-freie Hautmodelle auf ihre Eigenfluoreszenz hin untersucht. Non-CpG-6-PTO ist nur auf der Epidermis detektierbar und penetriert auch nach 48 Stunden nicht in tiefere dermale Schichten. Bei den Kontrollen ist nur die Eigenfluoreszenz der Matrix sichtbar (grün).

### 3.3 CpG- und Non-CpG-ODN vermitteln ihre IL-8 – suppressive Wirkung unabhängig von TLR9

Da gezeigt werden konnte, dass die ODN in Zellen aufgenommen werden und dort zum Teil in perinuklearen Clustern akkumulieren, sollte untersucht werden, ob für die ODN-vermittelte IL-8-Suppression eine Endosomenreifung und Ansäuerung notwendig ist wie in der Literatur beschrieben (Häcker et al. 1998). Häcker et al. (1998) konnten zeigen, dass eine Vorinkubation der Zellen mit Bafilomycin oder Chloroquine, welche die Endosomen-Reifung und -Ansäuerung verhindern, zu einem verminderten Effekt von CpG-ODN führt. Während Bafilomycin A1 aus *Streptomyces griseus* H<sup>+</sup>-Ionen-Pumpen der Vesikel blockiert und somit deren Ansäuerung verhindert, handelt es sich bei Chloroquine um eine starke Base, die zu einem pH-Shift in den Vesikeln führt. Beide Inhibitoren wurden 15 Minuten präinkubiert bevor eine Zugabe von CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO erfolgte (Abbildung 3.7).



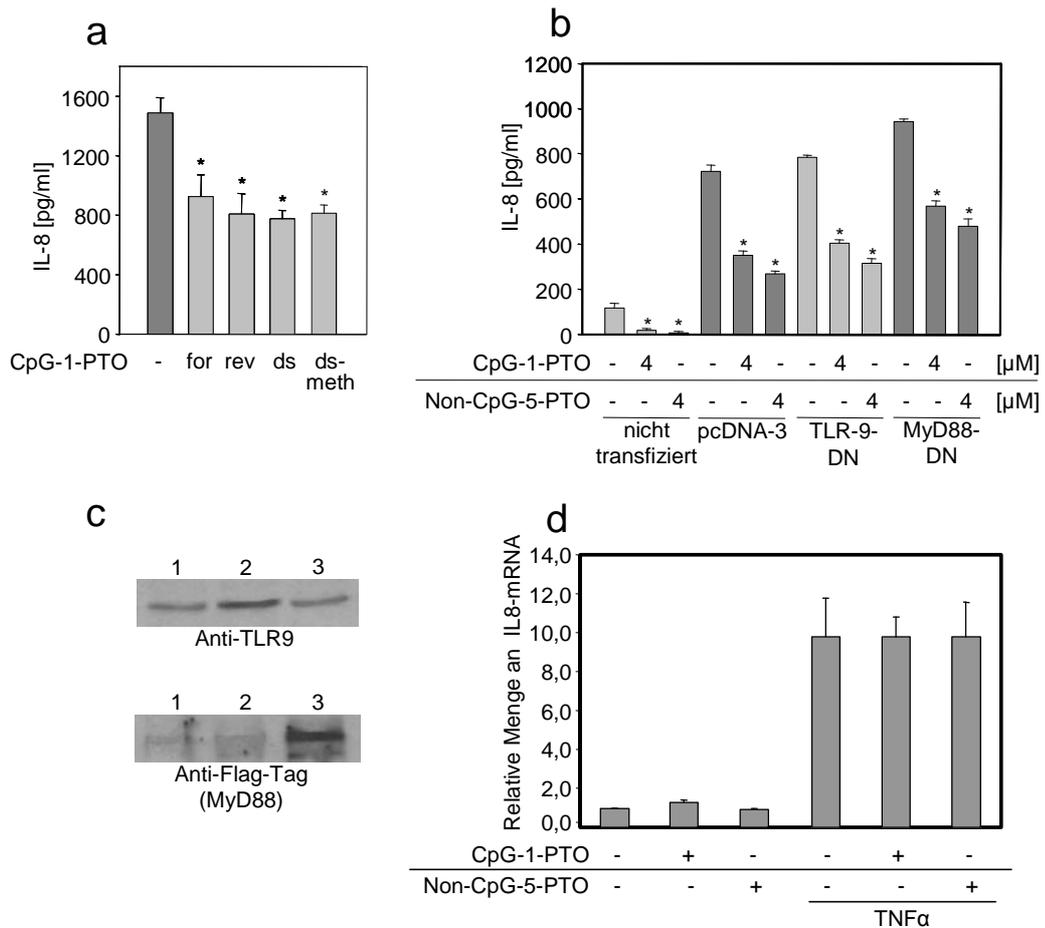
**Abbildung 3.7: Keine Beeinflussung der ODN-vermittelten IL-8-Suppression durch veränderte Endosomen-Ansäuerung.** HaCaT-Keratinocyten wurden 15 Minuten mit 300, 30 oder 3 nM Bafilomycin (BM) oder 10, 1 oder 0,1 µg/ml Chloroquine (CQ) präinkubiert, um eine Endosomen-Reifung und -Ansäuerung zu verhindern. Daraufhin folgte eine Inkubation für 18 Stunden mit den jeweiligen Inhibitoren, zuzüglich 4 µM CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO. Zellfreie Überstände wurden zur IL-8-Analyse verwendet. Eine veränderte Endosomen-Reifung oder -Ansäuerung verhindert nicht die ODN-vermittelte IL-8-Suppression.

---

Es zeigt sich, dass eine Veränderung in der Endosomen-Reifung und ihrer Ansäuerung zu keinerlei Beeinträchtigung der ODN-vermittelten IL-8-Suppression führt. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Fall die IL-8-Suppression unabhängig einer endosomalen Lokalisation der ODN und somit scheinbar unabhängig von TLR9 – dem Rezeptor für unmethylierte CpG-ODN – stattfindet.

Um dies zu überprüfen, wurde CpG-1-PTO mit seinem komplementären Strang (*rev, reverse*) hybridisiert und, wie unter „Material und Methoden 2.1.1“ beschrieben, enzymatisch methyliert (Abbildung 3.8 a). Vorangegangene Studien zeigten, dass eine Methylierung des Cytidins im CpG-Motiv dazu führt, dass der immunstimulierende Effekt dieser ODN aufgehoben wird (Krieg 2002). Erstaunlicher Weise konnte hier jedoch gezeigt werden, dass doppelsträngiges methyliertes (*ds, double-stranded-meth*) CpG-1-PTO eine IL-8-Suppression in gleicher Intensität hervorruft wie das doppelsträngige CpG-1-PTO unmethyliert. Die Methylierung wurde anhand spezifischer Restriktion des methylierten CpG-1-PTO und anschließender Gelelektrophorese überprüft (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde untersucht, ob TLR9 in diesem Kontext tatsächlich, wie bereits angenommen, keine Rolle spielt (Abbildung 3.8 b). Hierfür wurden HaCaT-Zellen, wie unter „Material und Methoden 2.5“ beschrieben, transient mit dominant-negativen Expressionsplasmiden für TLR9 oder das Adapterprotein MyD88 transfiziert und anschließend mit 4  $\mu$ M ODN behandelt. HaCaT-Keratinocyten, die dominant-negativen TLR9 (TLR9-DN) oder dominant-negatives MyD88 (MyD88-DN) exprimieren, zeigen die gleiche IL-8-Suppression nach CpG-1-PTO- oder Non-CpG-5-PTO-Behandlung, wie Zellen, die mit einem Kontrollplasmid (pcDNA-3) transfiziert wurden. Alle transfizierten Zellen, unabhängig vom Transfektions-Plasmid, zeigen erhöhte basale IL-8 Level, was vermutlich eine allgemeine Stress-Antwort der Zellen auf die Transfektion ist. Die Transfektions-Effizienz wurde mittels Western Blot überprüft. Abbildung 3.8 c zeigt eine Western Blot Analyse gegen TLR9 und gegen Flag-Tag zum Nachweis des transfizierten MyD88.



**Abbildung 3.8: TLR9 ist an der CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO vermittelten IL-8-Suppression nicht beteiligt. Eine IL-8-Regulierung auf transkriptioneller Ebene findet nicht statt. (a)** HaCaT-Keratinocyten wurden 18 Stunden mit 2 μM CpG-1-PTO einzelsträngig „vorwärts“ (for, *forward*), einzelsträngig komplementär (rev, *reverse*), doppelsträngig (ds, *double-stranded*) und doppelsträngig methyliert (ds-meth) inkubiert. Zellfreie Überstände wurden zur IL-8-Analyse verwendet. Methyliert zeigt CpG-1-PTO die gleiche IL-8-Suppression wie unmethyliert. **(b)** HaCaT-Keratinocyten wurden transient mit dominant-negativen Konstrukten für TLR9 (TLR-9-DN) oder MyD88 (MyD88-DN) transfiziert und anschließend für 18 Stunden mit 4 μM CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO inkubiert. Der leere pcDNA-3-Vektor diente als Kontrolle. Zellfreie Überstände wurden zur IL-8-Analyse verwendet. Transfizierte Zellen zeigen ein erhöhtes IL-8 Level, das durch Transfektions-induzierten Stress zustande kommt. Die Expression von TLR-9-DN oder MyD88-DN zeigt keine Auswirkungen auf die CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO induzierte IL-8-Suppression. **(c)** Die Transfektions-Effizienz wurde mittels Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen TLR9 und Flag-Tag (MyD88) überprüft. Es wurden jeweils Lysate von Zellen, die mit pcDNA3- (1), TLR9-DN- (2) oder MyD88-DN- (3) Plasmiden transfiziert wurden, auf ein Gel aufgetragen. TLR9 ist in den Zelllysaten TLR9-DN transfizierter Zellen vermehrt nachweisbar (oben, 2), während Flag-Tag vermehrt in den Zelllysaten MyD88-DN transfizierter Zellen vermehrt detektierbar ist (unten, 3). **(d)** HaCaT-Keratinocyten wurden für 10 Stunden mit 4 μM CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO alleine (Balken 2-3) oder zusätzlich mit 50 ng/ml TNFα für die letzten sechs Stunden (Balken 5-6) inkubiert. Zelluläre RNA wurde extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitative *real-time* PCR die Menge an IL-8 mRNA untersucht. Unbehandelte Kontroll-Zellen wurden auf 1,0 gesetzt. Beide ODN zeigen keine IL-8-Regulierung auf transkriptioneller Ebene. \*P<0,05 verglichen zu Kontrollen ohne ODN-Behandlung.

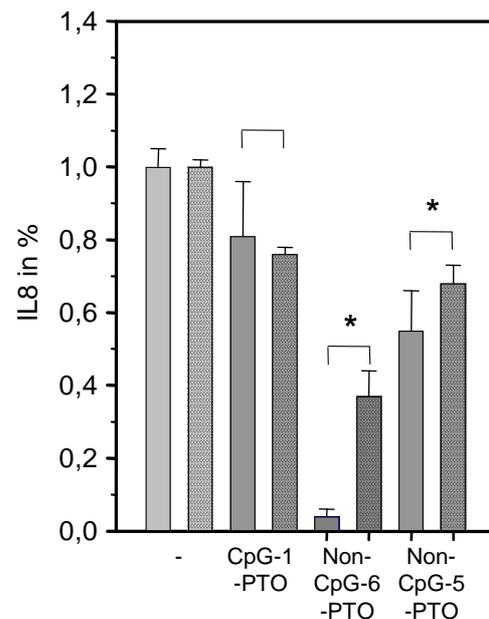
TLR9 ist in den Zelllysaten TLR9-DN-transfizierter Zellen vermehrt nachweisbar (Abbildung 3.8 c, oben, 2), während Flag-Tag vermehrt in

---

den Zelllysaten MyD88-DN-transfizierter Zellen vermehrt detektierbar ist (Abbildung 3.8 c, unten, 3). Dies lässt auf eine gelungene Transfektion der Expressionsplasmide schließen. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die CpG-1-PTO- und Non-CpG-5-PTO-induzierte IL-8-Suppression unabhängig vom TLR9-Signalweg verläuft. Dies schließt jedoch nicht aus, dass die verwendeten ODN an den Rezeptor TLR9 binden und diesen aktivieren können; es ist lediglich auszuschließen, dass dies bei der nachgewiesenen IL-8-Suppression keine Rolle spielt.

Um zu überprüfen, ob IL-8 auf transkriptioneller Ebene durch die verwendeten ODN reguliert wird, wurde eine quantitative *real-time* PCR zur IL-8 *messenger* RNA (mRNA) - Analyse durchgeführt. Abbildung 3.8 d zeigt keine Regulation der IL-8 mRNA durch CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO. Dies deutet darauf hin, dass durch die verwendeten ODN IL-8 auf post-transkriptionelle Weise reguliert werden muss und nicht auf transkriptioneller Ebene.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es sich bei der ODN-vermittelten IL-8-Suppression möglicherweise um einen extrazellulären Effekt handelt, der unabhängig von der Anwesenheit lebender Zellen auftritt. Hierzu wurden Überstände ODN-behandelter Zellen mit konditioniertem Medium, das in Abwesenheit von Zellen mit ODN inkubiert wurde, auf ihren IL-8-Gehalt hin untersucht (Abbildung 3.9). HaCaT-Keratinocyten wurden 18 Stunden mit 4  $\mu$ M CpG-1-PTO, Non-CpG-6-PTO oder Non-CpG-5-PTO behandelt und zellfreie Überstände zur IL-8-Analyse verwendet.

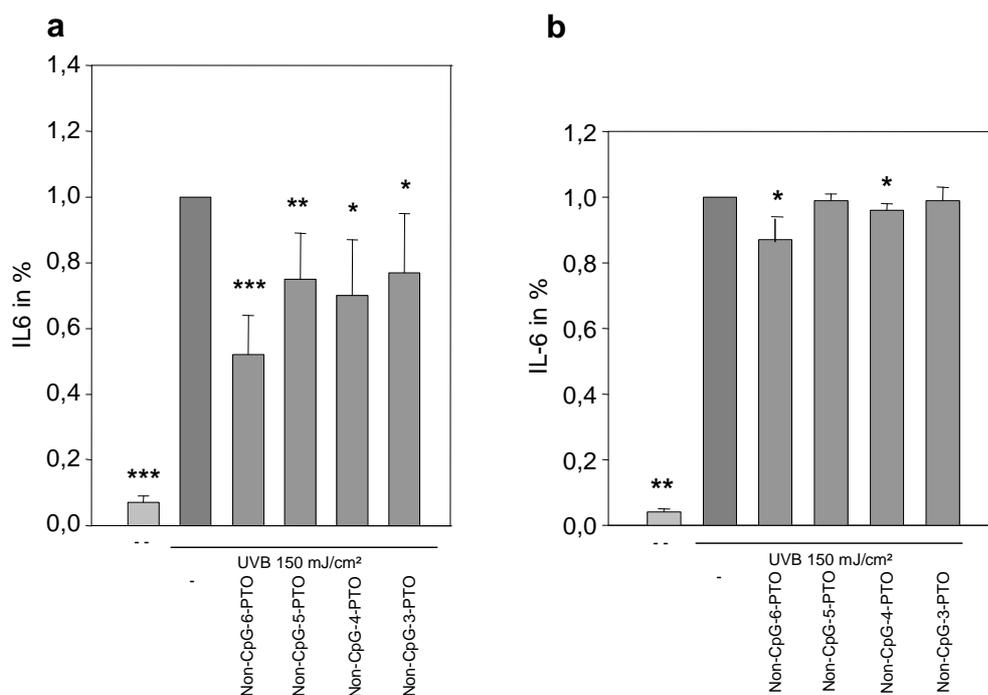


**Abbildung 3.9: ODN-vermittelte IL-8-Suppression tritt auch bei Behandlung von konditioniertem Medium in Abwesenheit von Zellen auf.** Zellen wurden 18 Stunden mit 4  $\mu$ M CpG-1-PTO, Non-CpG-6-PTO oder Non-CpG-5-PTO behandelt (klare Balken) und die zellfreien Überstände zur IL-8-Analyse verwendet. Des Weiteren wurden Zellen 18 Stunden auf ODN-freiem Medium inkubiert, zellfreie Überstände entnommen, diese mit 4  $\mu$ M CpG-1-PTO, Non-CpG-6-PTO oder Non-CpG-5-PTO für 18 Stunden inkubiert und schließlich zur IL-8 Analyse verwendet (gepunktete Balken). Alle getesteten ODN weisen auch einen IL-8-supprimierenden Effekt in Abwesenheit von Zellen auf. \* $P < 0,001$  im Vergleich zueinander (siehe Klammern).

Zum Vergleich wurden Zellen 18 Stunden in ODN-freiem Medium kultiviert, zellfreie Überstände entnommen, diese mit 4  $\mu$ M CpG-1-PTO, Non-CpG-6-PTO oder Non-CpG-5-PTO inkubiert und ebenfalls zur IL-8-Analyse verwendet. Bei allen getesteten ODN zeigt sich deutlich auch ein IL-8 supprimierender Effekt in Abwesenheit von Zellen, was auf einen extrazellulären Effekt – möglicherweise eine direkte Wechselwirkung zwischen IL-8 und ODN – schließen lässt. Da jedoch die IL-8 Suppression bei Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-6-PTO behandelten Zellen signifikant höher ist als die ODN-behandelter Zellkulturüberstände, muss zusätzlich auch ein zellulärer IL-8 supprimierender Effekt stattfinden.

Um zu untersuchen, ob ein extrazellulärer Effekt wie der bei IL-8 gefunden, auch bei anderen Interleukinen wie beispielsweise IL-6 vorzufinden ist, wurden einerseits UVB-bestrahlte HaCaT-Keratinocyten, andererseits zellfreie Kulturüberstände UVB-bestrahlter Zellen für 18 Stunden mit 4  $\mu$ M Non-CpG-6-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-4-PTO

oder Non-CpG-3-PTO inkubiert und anschließend zur IL-6-Analyse verwendet (Abbildung 3.10). Alle getesteten ODN zeigen bei Inkubation auf den Zellen eine deutliche Suppression UVB-induzierter IL-6 Level (Abbildung 3.10 a). Bei einer Inkubation der ODN auf konditioniertem Medium in Abwesenheit von Zellen, zeigt sich jedoch, dass lediglich bei Non-CpG-6-PTO und Non-CpG-4-PTO eine geringe IL-6-Suppression stattfindet. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die ODN-vermittelte IL-6-Suppression generell geringer ausfällt als die ODN-vermittelte IL-8-Suppression und somit in isolierten Zellkulturüberständen kein Effekt mehr erzielbar ist. Des Weiteren könnten die Ergebnisse jedoch auch darauf hindeuten, dass bei der Suppression von IL-6 vermehrt zelluläre Effekte eine Rolle spielen als bei der von IL-8.

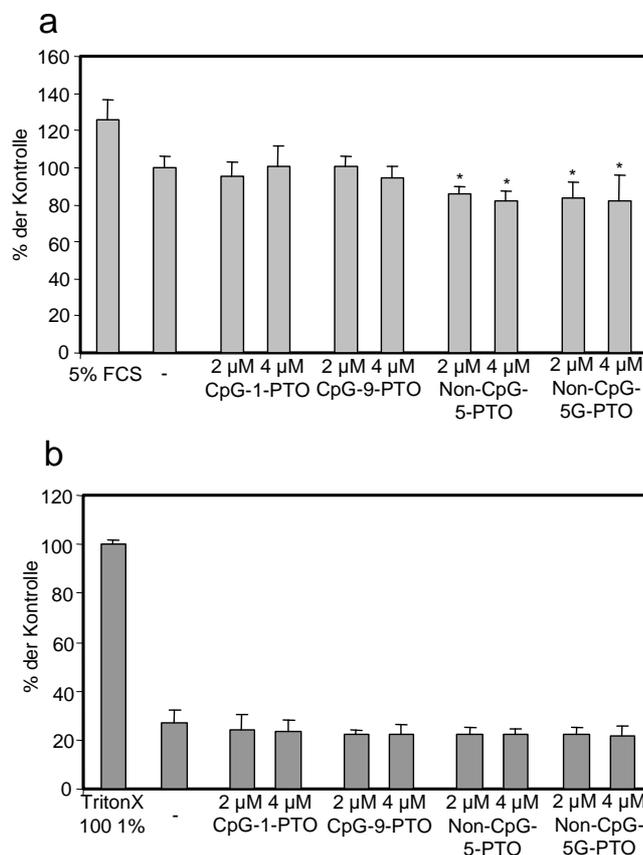


**Abbildung 3.10: ODN-induzierte IL-6-Suppression tritt bei Inkubation von HaCaT-Keratinocyten deutlich auf, bei der Behandlung von konditioniertem Medium nur marginal. (a)** Zellen wurden vier Stunden mit 4  $\mu$ M Non-CpG-6-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-4-PTO oder Non-CpG-3-PTO inkubiert und anschließend mit 150 mJ/cm<sup>2</sup> auf ODN-freiem PBS<sup>++</sup> bestrahlt. Es folgte eine weitere Inkubation mit jeweils 4  $\mu$ M ODN-haltigem Medium für 18 Stunden. Zellfreie Überstände wurden zur IL-6-Analyse verwendet. Alle getesteten ODN sind in der Lage, den UVB-induzierten IL-6-Level bei Zellbehandlung deutlich zu supprimieren. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 im Vergleich zu unbehandelten bestrahlten Zellen. **(b)** Zellen wurden mit 150 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt und anschließend zellfreie Überstände gewonnen, welche für 18 Stunden mit 4  $\mu$ M Non-CpG-6-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-4-PTO oder Non-CpG-3-PTO inkubiert wurden bevor sie zur IL-6-Analyse verwendet wurden. Nur Non-CpG-6-PTO zeigt einen deutlichen IL-6-supprimierenden Effekt in Abwesenheit von Zellen. \*P<0,01; \*\*P<0,001 im Vergleich zu unbehandelten Überständen bestrahlter Zellen.

### 3.4 ODN-vermittelte Effekte auf DNA-Synthese und LDH-Ausschüttung

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Behandlung mit ODN zu veränderten zellulären Parametern wie DNA-Synthese und LDH-Ausschüttung von HaCaT-Keratinocyten führt.

Abbildung 3.11 kann entnommen werden, dass die DNA-Synthese durch CpG-1-PTO und CpG-9-PTO in den getesteten Konzentrationen nach 18 Stunden Inkubation nicht beeinflusst wird, wohingegen eine Behandlung mit Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-5G-PTO zu einer geringen Suppression führt (Abbildung 3.11 a).



**Abbildung 3.11: ODN zeigen leichte Sequenz-spezifische Effekte auf den 5-Bromodeoxyuridin-Einbau, jedoch keinen Einfluss auf die LDH-Freisetzung von HaCaT-Keratinocyten.** Zellen wurden für 18 Stunden mit 2 und 4 µM CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO oder Non-CpG-5G-PTO inkubiert. Die Messung des 5-Bromodeoxyuridin-Einbaus in die DNA und die LDH-Freisetzung der Zellen wurde, wie unter „Material und Methoden 2.7 und 2.8“ beschrieben, durchgeführt. **(a)** Das 20-mer CpG-1-PTO und sein kurzes Derivat CpG-9-PTO zeigen keinen Effekt auf die DNA-Synthese, während Non-CpG-5-PTO und sein kurzes Derivat einen minimalen Effekt auf die DNA-Synthese aufweisen. **(b)** Alle vier getesteten ODN (CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-5G-PTO) zeigen keine signifikante Auswirkung auf die LDH-Freisetzung der HaCaT-Keratinocyten. \*P<0,05 im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen.

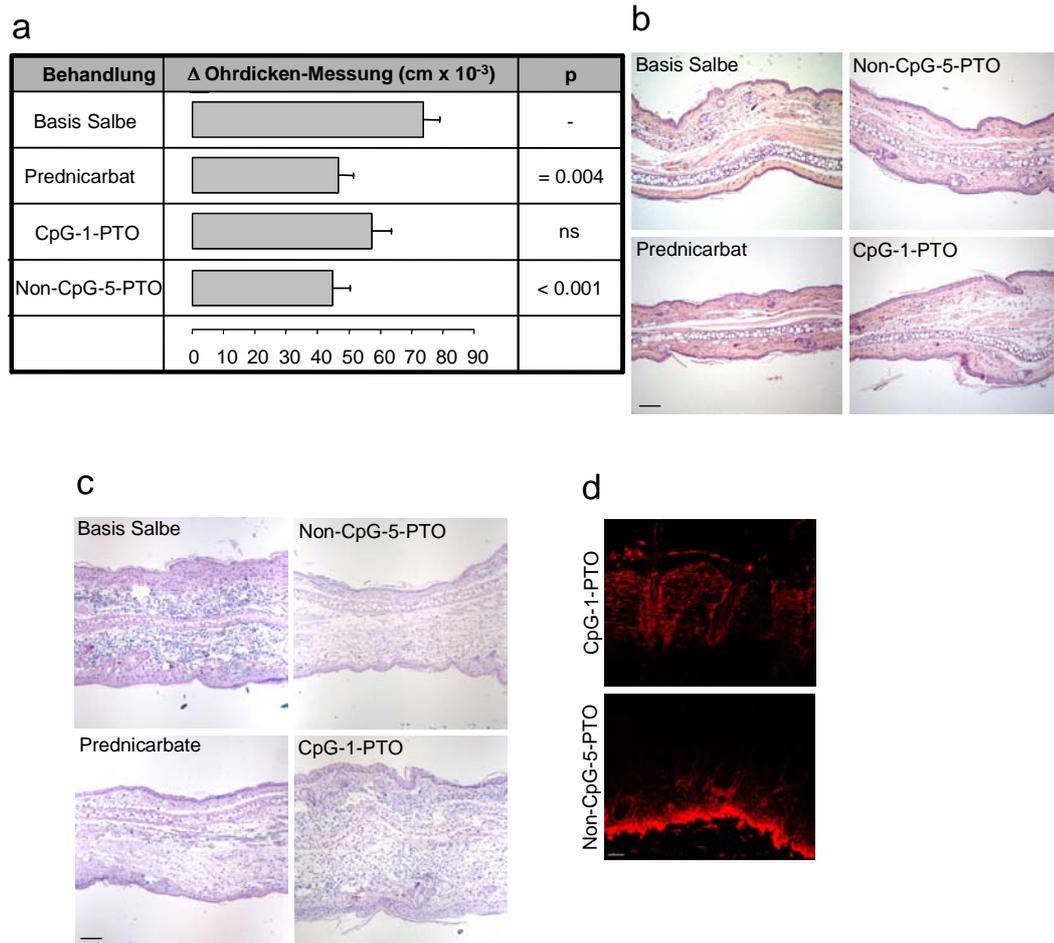
---

Das Ausschütten von Laktat Dehydrogenase (LDH) durch die Zellen wird als Marker für die Membranintegrität gemessen. Eine Behandlung von HaCaT-Keratinocyten mit CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-5G-PTO für 18 Stunden zeigt keinen Effekt auf die LDH-Ausschüttung (Abbildung 3.11 b).

### **3.5 Non-CpG-5-PTO übt einen anti-inflammatorischen Effekt *in vivo* aus**

Eine Inflammation der Haut ist, wie bereits in der Einleitung erwähnt, von einer erhöhten Sekretion von IL-8 begleitet. Wird IL-8 blockiert, führt dies zu einer Abnahme einer Tuberkulin-ausgelösten kutanen Überempfindlichkeitsreaktion (Larsen et al. 1995).

Da sowohl CpG-1-PTO als auch Non-CpG-5-PTO an Mono- und an Multilayern von Keratinocyten eine starke IL-8-Suppression aufwiesen, wurde im Folgenden die topische Applikation von CpG-1-PTO- und Non-CpG-5-PTO-haltigen Salben zum Schutz gegen eine DNFB-induzierte kutanen Überempfindlichkeitsreaktion an C57BL/6 getestet, wie in Material und Methoden 2.15 beschrieben. 24 Stunden nach der Re-Exposition von DNFB wurde die Ohrschwellung vermessen (Abbildung 3.12 a). Im Gegensatz zu Basis Salbe-behandelten Mäusen reduzierte die Behandlung mit 0,25%iger Prednicarbat-Salbe die Ohrschwellung deutlich. Prednicarbat wird der Klasse II „mittelstark wirksame Kortison-Präparate“ zugerechnet und ist bereits in klinischer Anwendung, um anti-inflammatorische Effekte zu erzielen. Auch die Behandlung mit 1,4% (w/w) Non-CpG-5-PTO-haltiger Salbe zeigt eine deutliche Reduktion der Ohrschwellung in DNFB-sensibilisierten Mäusen, wohingegen bei Behandlung mit 1,4% (w/w) CpG-1-PTO-haltiger Salbe lediglich ein nicht-signifikanter Trend feststellbar ist. Dies spiegelt den stärkeren IL-8-supprimierenden Effekt von Non-CpG-5-PTO in Keratinocyten wider (Abbildungen 3.1 und 3.3).



**Abbildung 3.12: Non-CpG-5-PTO reduziert die Ohrschwellung und Neutrophileninfiltration in DNFB-sensibilisierten Mäusen.** Die Mäuse wurden am Tag 0 mit DNFB sensibilisiert und an Tag 5 re-exponiert. 60 Minuten nach Re-Exposition wurde ein Ohr der „Behandlungsgruppe“ mit DAC Basis Salbe als Kontrolle, CpG-1-PTO- oder Non-CpG-5-PTO-haltigen Salbe oder einer Prednicarbat-haltigen Salbe als Positivkontrolle behandelt. Das zweite Ohr der Maus wurde jeweils mit DAC Basis Salbe behandelt. **(a)** 24 Stunden nach der Behandlung wurde die Ohrdicke gemessen. Die Ohrschwellung ist durch Prednicarbat deutlich reduziert, ebenso wie durch die Non-CpG-5-PTO-haltige Salbe im Vergleich zu Basis Salbe-behandelten Mäusen. CpG-1-PTO behandelte Ohren zeigen nur einen nicht-signifikanten Trend. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte der Ohrschwellung angegeben. P zeigt die statistische Signifikanz zur Behandlung mit Basis Salbe. **(b)** 24 Stunden nach der Behandlung wurden die behandelten Mausohren zur histologischen Analyse entnommen und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Ohren, die mit der Basis Salbe behandelt wurden, zeigen ein verstärktes dermales Ödem im Vergleich zu Prednicarbat-behandelten Ohren. Non-CpG-5-PTO-behandelte Ohren zeigen ein reduziertes dermales Ödem, das vergleichbar mit dem der Prednicarbat-behandelten Ohren ist, wohingegen CpG-1-PTO-behandelte Ohren eine Ähnlichkeit mit den Basis Salbe-behandelten Ohren aufweisen. Maßstab = 100  $\mu$ m. **(c)** 24 Stunden nach der Behandlung wurden die behandelten Mausohren zur histologischen Analyse entnommen und immunhistochemisch gegen infiltrierende Neutrophile gefärbt (blaue Färbung). Nach Behandlung mit Prednicarbat- oder Non-CpG-5-PTO-haltigen Salben zeigt sich eine deutlich reduzierte Infiltration von Neutrophilen (blaue Zellen). CpG-1-PTO-behandelte Ohren weisen dagegen keinen Unterschied zu Basis Salbe-behandelten Ohren auf. Maßstab = 100  $\mu$ m. **(d)** Penetration von topisch auf rasierte Maushaut applizierten Cy-3-markiertem CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO (100  $\mu$ M) nach zwei Stunden. Die ODN können sowohl in der Epidermis als auch in supra-epidermalemem Gewebe detektiert werden. Maßstab = 50  $\mu$ m.

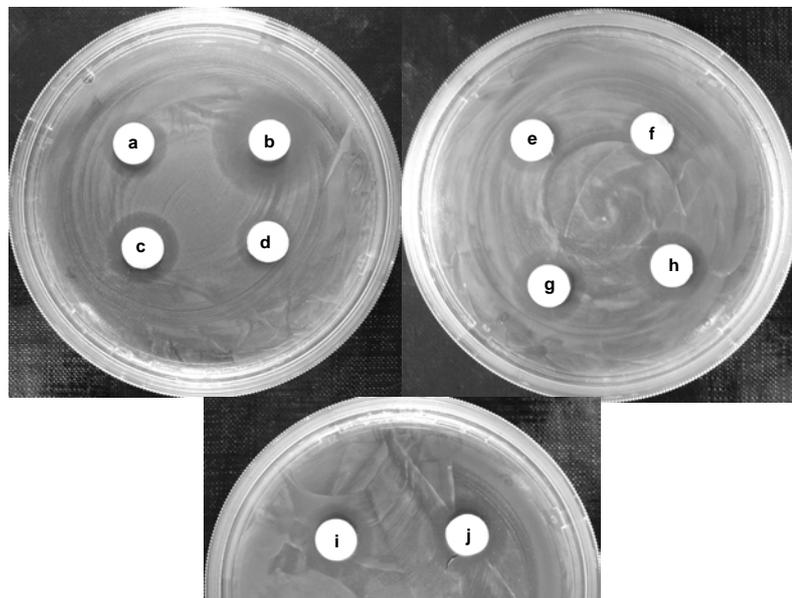
Histologische Analysen bestätigen die Ohrschwellen-Messungen (Abbildung 3.12 b): Ohren, die mit Basis Salbe behandelt wurden, zeigen ein massives dermales Ödem verglichen mit Prednicarbat-behandelten Ohren. Non-CpG-5-PTO-behandelte Ohren weisen ein deutlich reduziertes dermales Ödem auf, ähnlich dem der Prednicarbat-behandelten Ohren. CpG-1-PTO-behandelte Ohren dagegen zeigen ein dermales Ödem vergleichbar mit dem der Basis Salbe-behandelten Ohren. Immunhistochemische Analysen zeigen, dass die Mehrheit der infiltrierenden Zellen Neutrophile darstellen (Abbildung 3.12 c). Diese infiltrierenden Neutrophile sind vermehrt in den Schnitten der Basis Salbe-behandelten und CpG-1-PTO-behandelten Ohren zu erkennen. Eine deutliche Verminderung der Neutrophilen-Infiltration wurde in Prednicarbat- oder Non-CpG-5-PTO-behandelten Ohren erreicht. Die Penetration von CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO in Mauhaut wurde anhand topischer Applikation Fluoreszenz-markierter ODN (100 µM) auf rasierte Maus-Rückenhaut untersucht. Abbildung 3.12 d zeigt, dass beide ODN bereits nach zwei Stunden in supra-epidermale Gewebe detektierbar sind.

### **3.6 ODN bewirken eine Induktion hauteigener anti-mikrobieller Peptide mittels NFκB-Aktivierung**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist bekannt, dass verschiedene Inflammations-Mediatoren in der Lage sind, die Expression und Sekretion von anti-mikrobiellen Peptiden in Keratinozyten zu induzieren (Kippenberger et al. 2005; Gläser et al. 2005). Es sollte untersucht werden, ob CpG- oder Non-CpG-ODN alleine oder in Kombination mit bekannten Immunsystem-stimulierenden Substanzen in der Lage sind, hauteigene anti-mikrobielle Peptide zu induzieren.

Hierfür wurden in einem Vorversuch HaCaT-Keratinozyten mit 6 µM CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO, teilweise in Kombination mit 20 ng/ml TNFα oder abgetöteten Zellen des *Escherichia coli*-Stammes DH5α, für 18

Stunden inkubiert und zellfreie Überstände in einen Hemmhof test, wie in „Material und Methoden 2.16“ beschrieben, eingesetzt (Abbildung 3.13). Sowohl von TNF $\alpha$  als auch von Bestandteilen von *E. coli*-Bakterien ist bekannt, dass sie das Immunsystem stimulieren, also eine Abwehrreaktion induzieren. Hier sollte getestet werden, ob CpG- und Non-CpG-ODN alleine oder in Kombination mit diesen Immunstimulatoren haut-eigene anti-mikrobielle Substanzen induzieren können. Als Positivkontrolle wurde Gentamycin-haltiges Medium mitgeführt, welches den größten Hemmhof auf ausplattierten DH5 $\alpha$ -Zellen bildet (Abbildung 3.13 b).

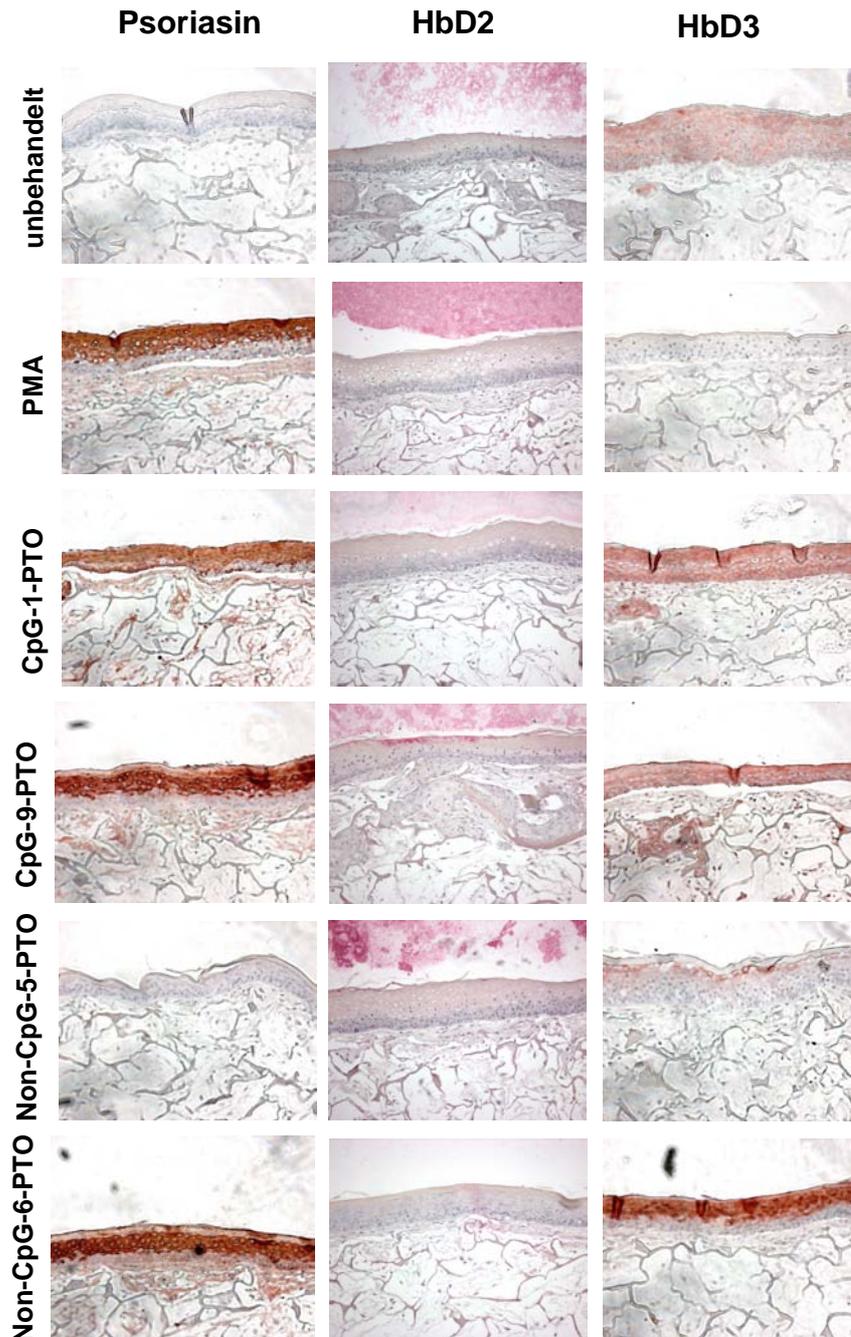


**Abbildung 3.13: ODN-stimulierte HaCaT-Keratinocyten sind in der Lage, anti-mikrobielle Peptide zu synthetisieren.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 18 Stunden mit 6  $\mu$ M CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO, teilweise in Anwesenheit von 20 ng/ml TNF $\alpha$  oder abgetöteten Zellen des *E. coli*-Stamms DH5 $\alpha$  inkubiert. Zellfreie Kulturüberstände wurden auf Filterpapier-Plättchen gegeben und diese auf ausplattierten DH5 $\alpha$ -Zellen auf Agarplatten über Nacht inkubiert. Es folgte eine Auswertung der Hemmhöfe am nächsten Morgen. Während unbehandelte Zellen (**a**) bereits ein basales Level an anti-mikrobiellen Peptiden synthetisieren (Hemmhof = 3,5 mm), wird dies durch Behandlung mit CpG-1-PTO (**c**) deutlich induziert (Hemmhof = 4,5 mm). Non-CpG-5-PTO-induzierte Zellen (**d**) zeigen dagegen keine erhöhte Induktion anti-mikrobieller Peptide (Hemmhof = 3,5 mm). Auch TNF $\alpha$ - (**e**) oder DH5 $\alpha$ -behandelte Zellen (**f**) zeigen keinen vergrößerten Hemmhof (Hemmhöfe = 3,5 mm). Die Kombination aus TNF $\alpha$  und CpG-1-PTO (**g**) führt zu keiner Induktion anti-mikrobieller Peptide, verglichen zu nur CpG-1-PTO-behandelten Zellen (Hemmhof = 4,5 mm). Die Kombination aus TNF $\alpha$  und Non-CpG-5-PTO (**h**) zeigt dagegen eine deutliche Induktion anti-mikrobieller Peptide (Hemmhof = 4,5 mm). Die Kombination aus toten DH5 $\alpha$ -Zellen und CpG-1-PTO (**i**) führt zu keinem vergrößerten Hemmhof, verglichen zu nur CpG-1-PTO-behandelten Zellen (Hemmhof = 4,5 mm). Die Kombination aus toten DH5 $\alpha$ -Zellen und Non-CpG-5-PTO (**j**) zeigt dagegen erneut eine deutliche Induktion anti-mikrobieller Peptide gegenüber nur Non-CpG-5-PTO-behandelten Zellen (Hemmhof = 5,3 mm). Als Positiv-Kontrolle (**b**) wurde Gentamycin-haltiges Medium verwendet (Hemmhof = 9 mm).

---

Es zeigt sich, dass bereits bei unbehandelten HaCaT-Keratinocyten in Kultur anti-mikrobielle Substanzen im Zellkulturüberstand nachweisbar sind. Diese sind durch die Behandlung der Zellen mit CpG-1-PTO, nicht jedoch mit Non-CpG-5-PTO-Inkubation, induzierbar. Die Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$  oder abgetöteten DH5 $\alpha$  führt zu keiner erhöhten anti-mikrobiellen Wirkung des Zellkulturüberstandes, hier sind die Hemmhöfe gleich dem der unbehandelten Zellen. Erst in Kombination mit CpG-1-PTO oder Non-CpG-5-PTO zeigen diese beiden immunstimulierenden Substanzen eine Wirkung und induzieren die anti-mikrobielle Wirkung der Zellkulturüberstände (Abbildung 3.13 g-j). Hier kann sogar eine Steigerung des Hemmhofs der Non-CpG-5-PTO behandelten Zellen vergrößert werden.

Um die Expression anti-mikrobieller Peptide durch epidermale Zellen zu untersuchen, wurden Phenion<sup>®</sup> 3D-Hautmodelle, wie unter „Material und Methoden 2.14“ beschrieben, topisch mit CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO oder Non-CpG-6-PTO behandelt und für 18 Stunden inkubiert (Abbildung 3.14). Daraufhin wurden die Hautmodelle immunhistochemisch, wie unter „Material und Methoden 2.10.2“ beschrieben, gegen Psoriasin, HbD2 oder HbD3 gefärbt (rot, rot-braune Färbung) und mit Hämatoxylin gegengefärbt (bläuliche Färbung). Als Positivkontrolle wurde PMA mitgeführt, das aus der Literatur als anti-mikrobielle Peptide induzierend bekannt ist (Vankeerberghen et al. 2005). Psoriasin wird in unbehandelten Hautmodellen nicht konstitutiv exprimiert, wird jedoch durch eine Behandlung der Hautmodelle mit PMA, CpG-1-PTO, CpG-9-PTO oder Non-CpG-6-PTO deutlich induziert und ist sowohl in den viablen als auch abgestorbenen Schichten der Epidermis zu erkennen. Auch HbD2 wird nicht konstitutiv exprimiert, erfährt jedoch durch Behandlung der Hautmodelle mit CpG-9-PTO eine deutliche Induktion und ist in den viablen Schichten der Epidermis zu sehen. Eine schwächere Induktion ist durch topische Applikation von PMA oder Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-6-PTO sichtbar.



**Abbildung 3.14: Induktion von Psoriasin, HbD2 und HbD3 im Phenion® 3D-Hautmodell nach topischer Applikation verschiedener ODN.** Die Hautmodelle wurden, wie unter „Material und Methoden 2.14“ beschrieben, topisch für 18 Stunden mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO oder Non-CpG-6-PTO behandelt und danach immunhistochemisch gegen verschiedene hauteigene anti-mikrobielle Peptide gefärbt (rot, rot-braun) und mit Hämatoxylin gegengefärbt (bläulich). Psoriasin ist in unbehandelten Hautmodellen nicht detektierbar, wird jedoch durch PMA-Behandlung und durch CpG-1-PTO-, CpG-9-PTO- und Non-CpG-6-PTO-Applikation deutlich induziert. HbD2 scheint nur durch CpG-9-PTO deutlich induziert zu werden, eine schwache Induktion ist bei Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-6-PTO sichtbar. HbD3 liegt bereits in unbehandelten Hautmodellen konstitutiv vor, wird jedoch durch CpG-1-PTO-, CpG-9-PTO- und Non-CpG-6-PTO-Behandlung deutlich induziert, eine schwache Induktion ist auch durch Non-CpG-5-PTO hervorrufbar.

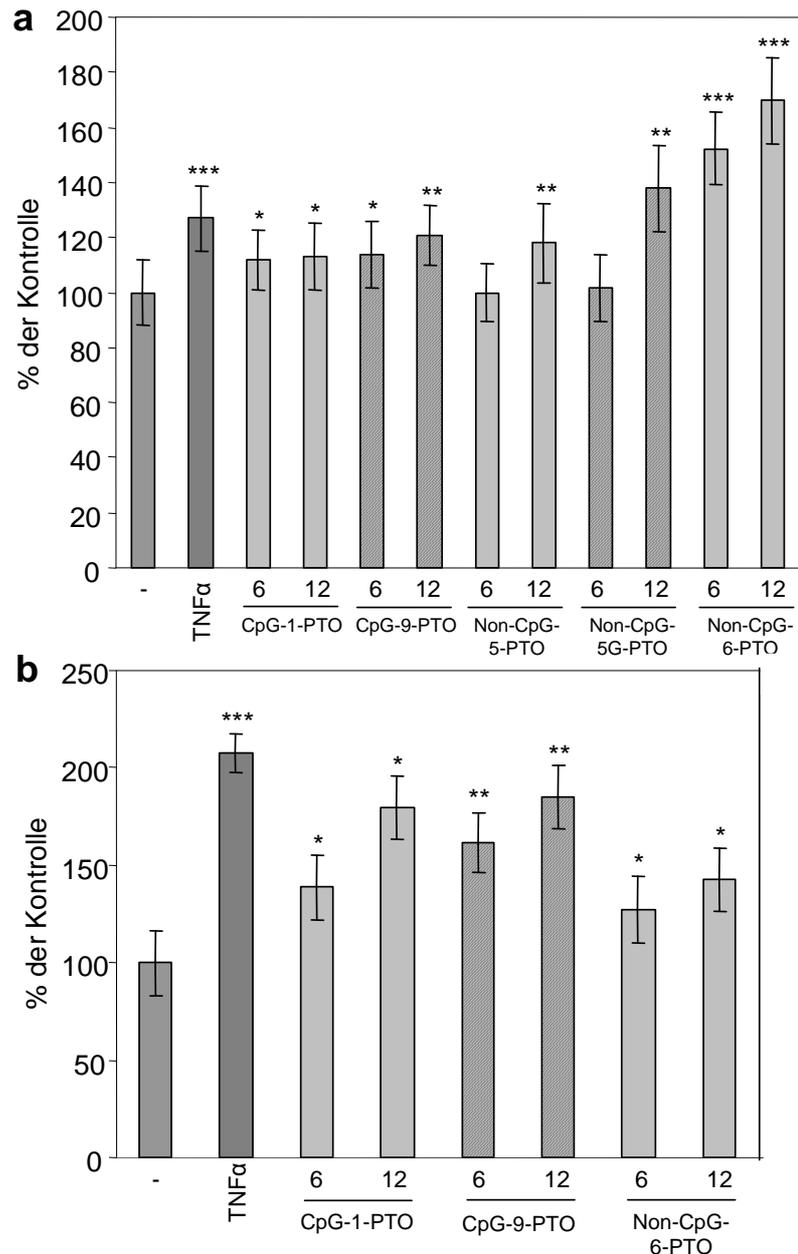
HbD3 dagegen liegt bereits konstitutiv in den Hautmodellen vor, wie das unbehandelte Hautmodell zeigt. Eine topische Applikation von PMA führt hier zu keiner Induktion der Expression, was in der Literatur bekannt ist (Vankeerberghen et al. 2005), eine Behandlung mit CpG-1-PTO, CpG-9-PTO oder Non-CpG6-PTO dagegen jedoch zu einer sehr deutlichen. Eine schwache Induktion ist auch bei topischer Applikation von Non-CpG-5-PTO sichtbar. HbD3 ist ähnlich dem Psoriasin in den tieferen viablen, jedoch auch in den oberen Schichten der Epidermis zu erkennen.

Um eine genauere Aussage über die HbD2-Induktion treffen zu können, wurden am Monolayer Luciferase-Reporter-Assays wie in Material und Methoden 2.12 beschrieben, durchgeführt.

Abbildung 3.15 a zeigt die HbD2-Promoteraktivität in HaCaT-Keratinocyten nach 18-stündiger Inkubation mit 40 ng/ml TNF $\alpha$  oder CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO und Non-CpG-6-PTO in den Konzentrationen 6  $\mu$ M oder 12  $\mu$ M.

Während TNF $\alpha$  die Promoteraktivität von HbD2 um knapp 30% steigert, sind alle getesteten ODN in der Lage, bei einer Konzentration von 12  $\mu$ M, die HbD2-Promoteraktivität um mindestens 20% zu induzieren. Eine Behandlung der Zellen mit 12  $\mu$ M Non-CpG-5G-PTO führt sogar zu einer Steigerung um 40%, eine Behandlung mit Non-CpG-6-PTO bereits bei 6  $\mu$ M zu einer Induktion um 50%, bei 12  $\mu$ M sogar um 70%.

Deutlich ist die Induktion der HbD2-Promoteraktivität auch bei der 18-stündigen Inkubation von primären Keratinocyten mit 40 ng/ml TNF $\alpha$  oder CpG-1-PTO, CpG-9-PTO oder Non-CpG-6-PTO in den Konzentrationen 6  $\mu$ M oder 12  $\mu$ M zu erkennen (Abbildung 3.15 b). Hier zeigt bereits TNF $\alpha$  eine Verdopplung der HbD2-Promoteraktivität. Eine CpG-1-PTO-Behandlung mit einer Konzentration von 6  $\mu$ M führt zu einer Induktion von 40%, bei einer Konzentration von 12  $\mu$ M sogar um 80%. Auch das dazu analoge Hexamer CpG-9-PTO zeigt eine Induktion bei 6  $\mu$ M um bereits 60%, bei 12  $\mu$ M ebenfalls um 80%. Auf eine Non-CpG-6-PTO-Behandlung folgt eine Induktion um 30% bei 6  $\mu$ M und um 45% bei 12  $\mu$ M.

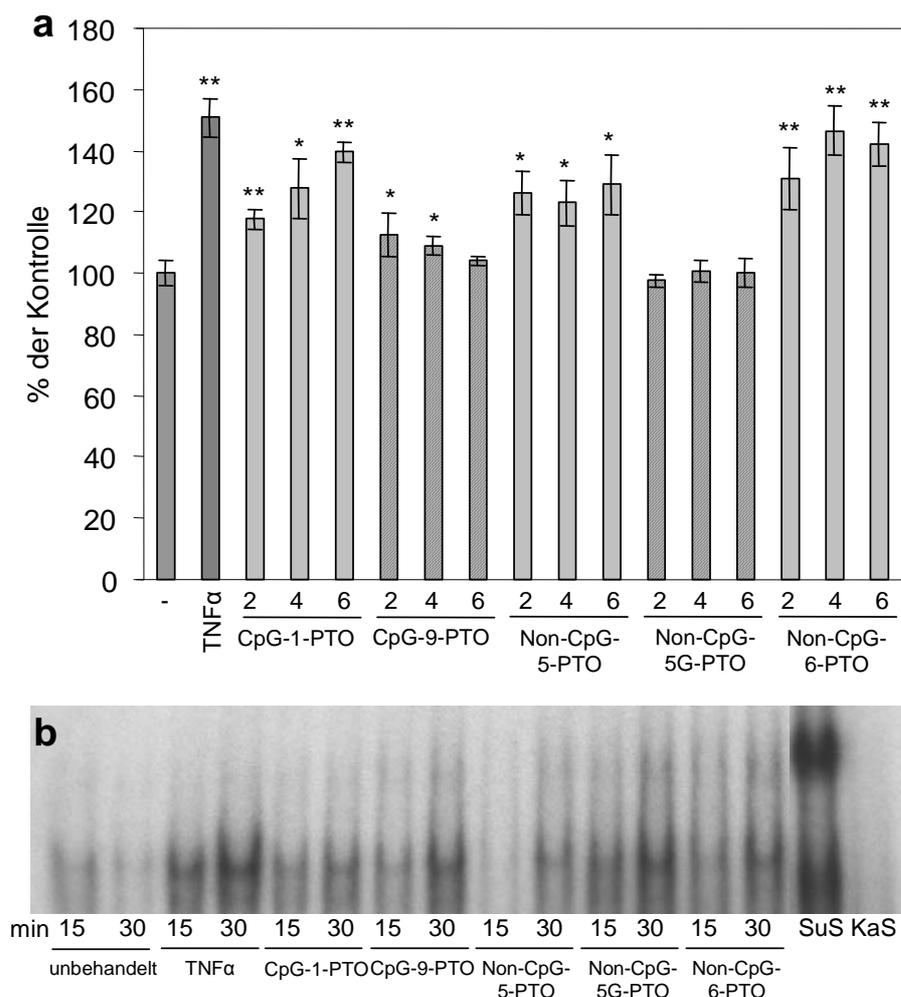


**Abbildung 3.15: Induktion des HbD2-Promotors durch ODN.** (a) HaCaT-Keratinocyten wurden für 18 Stunden mit 40 ng/ml TNF $\alpha$ , CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO oder Non-CpG-6-PTO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend in einen Luciferase-Reporter-Assay, wie in „Material und Methoden 2.12“ beschrieben, eingesetzt. Alle verwendeten ODN, insbesondere Non-CpG-6-PTO sind in der Lage bei einer Konzentration von mindestens 12  $\mu$ M, die Promoteraktivität von HbD2 zu induzieren. (b) Primäre Keratinocyten wurden für 18 Stunden mit 40 ng/ml TNF $\alpha$ , CpG-1-PTO, CpG-9-PTO oder Non-CpG-6-PTO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und anschließend in einen Luciferase-Reporter-Assay, wie in „Material und Methoden 2.12“ beschrieben, eingesetzt. Alle verwendeten ODN vermitteln eine konzentrationsabhängige HbD2-Promoter-Induktion. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen.

Da beschrieben ist, dass einer Induktion hauteigener anti-mikrobieller Peptide eine NF $\kappa$ B-Aktivierung vorausgeht (Baldwin 1996), wurde mittels Luciferase-Reporter-Assay (Abbildung 3.16 a) und *Electrophoretic Mobility*

*Shift Assay* (EMSA) (Abbildung 3.16 b) die Induktion von NF $\kappa$ B durch CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO und Non-CpG-6-PTO nach verschiedenen Inkubationszeiten untersucht. Für eine Analyse mittels Luciferase-Reporter-Assay (Abbildung 3.16 a) wurden HaCaT-Keratinocyten mit 2, 4 oder 6  $\mu$ M ODN für 18 Stunden inkubiert. Eine Behandlung der Zellen mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  als Positivkontrolle induziert die Aktivität von NF $\kappa$ B um 50%. Eine Zellbehandlung mit den 20-meren CpG-1-PTO, Non-CpG-5-PTOP und Non-CpG-6-PTO weist eine konzentrationsabhängige Induktion der NF $\kappa$ B-Aktivität um bis zu 40% auf, wohingegen die Hexamere CpG-9-PTO und Non-CpG-5G-PTO lediglich eine geringe und nicht konzentrationsabhängige bis keine (Non-CpG-5G-PTO) Induktion hervorrufen. Bei einer Messung der NF $\kappa$ B-Induktion nach 15- und 30-minütiger Inkubation von 40 ng/ml TNF $\alpha$  oder 4  $\mu$ M ODN mittels EMSA (Abbildung 3.16 b) konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Hexamere CpG-9-PTO, Non-CpG-5G-PTO in der Lage sind, eine NF $\kappa$ B-Aktivierung zu induzieren. Dies spricht für eine schnelle Aktivierung, die vermutlich nach 18 Stunden bereits nicht mehr messbar ist. Eine deutliche Induktion von NF $\kappa$ B zeigt sich auch bei Behandlung der Zellen mit CpG-1-PTO, Non-CpG-5-PTO (hier jedoch erst nach 30 Minuten), schwächer bei Non-CpG-6-PTO und Non-CpG-3-PTO, was zeigt, dass hier eine spätere Aktivierung vorliegen könnte, die dann nach 18 Stunden im Luciferase-Reporter-Assay messbar ist (Abbildung 3.16 a).

Die beiden mitgeführten Kontrollen bestätigen die Spezifität der verwendeten NF $\kappa$ B-Sonde, da erstens eine Zugabe von Anti-NF $\kappa$ B zu der TNF $\alpha$ -induzierten Probe (30 Minuten Inkubation) zum so genannten „Supershift“ (SuS) führt. Hier lagert sich an die radioaktivmarkierte Sonde zusätzlich der Antikörper, wodurch sich die Bande nach oben verschiebt. Zweitens wurde in einem Ansatz zur TNF $\alpha$ -induzierten Probe (30 Minuten Inkubation) zusätzlich zur radioaktivmarkierten Sonde die gleiche NF $\kappa$ B-Sonde ohne Radioaktivität im Überschuss zugegeben, so dass die markierte Sonde verdrängt wurde und somit keine Bande mehr sichtbar ist. Dies bedeutet, dass eine Entstehung der Banden im EMSA tatsächlich durch die spezifische Bindung der radioaktivmarkierten NF $\kappa$ B-Sonde hervorgerufen wird und nicht durch unspezifische Bindungsreaktionen.



**Abbildung 3.16: Induktion der NF $\kappa$ B-Aktivität in HaCaT-Keratinozyten durch ODN.**

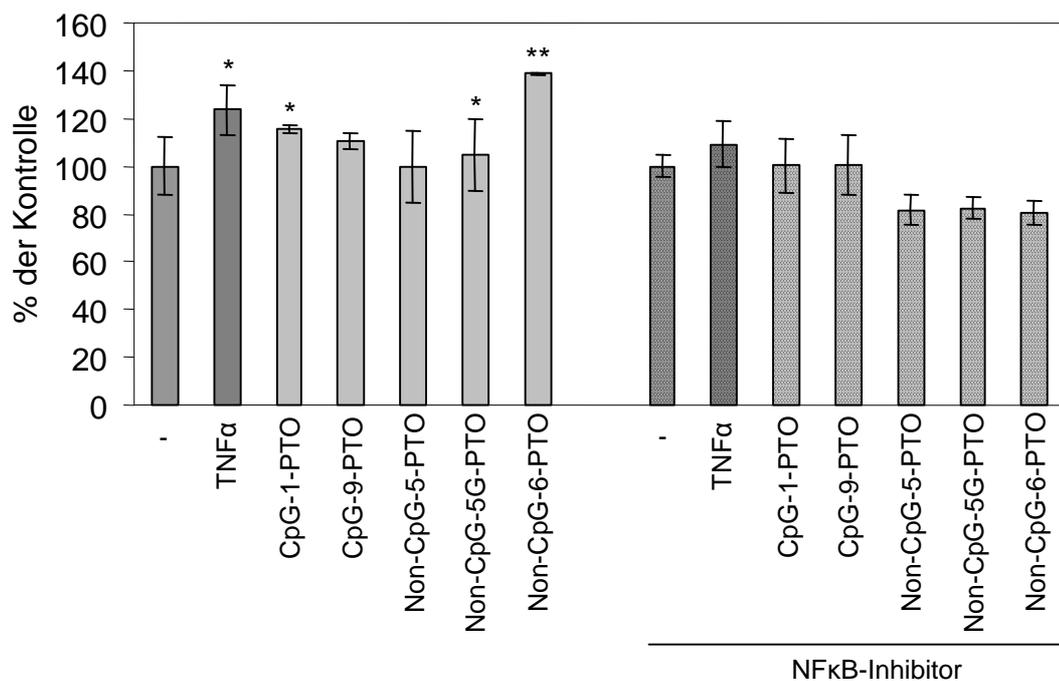
**(a)** Zellen wurden für 18 Stunden mit 20 ng/ml TNF $\alpha$ , CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO oder Non-CpG-6-PTO in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und Zelllysate anschließend in einen Luciferase-Reporter-Assay, wie in „Material und Methoden 2.12“ beschrieben, eingesetzt. Eine starke Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B nach 18 Stunden ist durch CpG-1-PTO und Non-CpG-6-PTO, ähnlich der durch TNF $\alpha$  hervorgerufenen, induzierbar; eine schwächere auch durch Non-CpG-5-PTO. Die Hexanukleotide CpG-9-PTO und Non-CpG-5G-PTO bewirken keine NF $\kappa$ B-Aktivierung nach 18 Stunden. \*P<0,05; \*\*P<0,005 im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen. **(b)** Zellen wurden für jeweils 15 oder 30 Minuten mit 40 ng/ml TNF $\alpha$ , 4  $\mu$ M CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO oder Non-CpG-6-PTO inkubiert und anschließend die NF $\kappa$ B-Aktivierung, wie in „Material und Methoden 2.9“ beschrieben, mittels EMSA analysiert. Eine deutliche Aktivierung von NF $\kappa$ B nach bereits 15 Minuten zeigt sich nach einer Behandlung mit CpG-1-PTO, Non-CpG-5G-PTO und Non-CpG-6-PTO. Nach 30 Minuten induzieren auch CpG-9-PTO und Non-CpG-5-PTO eine NF $\kappa$ B-Aktivierung. Die Kontrollen SuS (*Supershift*), die mit der 30 Minuten-TNF $\alpha$ -Probe und NF $\kappa$ B-Antikörper angesetzt wurde, und KaS (Kalte Sonde), die mit der 30-Minuten-TNF $\alpha$ -Probe und kalter Sonde im Überschuss angesetzt wurde, bestätigen die Spezifität der verwendeten NF $\kappa$ B-Sonde.

Um nun zu bestätigen, dass die zuvor gemessene Induktion der HbD2-Promoteraktivität (siehe Abbildung 3.15) direkt mit der ODN-vermittelten Aktivierung von NF $\kappa$ B (siehe Abbildung 3.16) korreliert, wurden erneut

HbD2-Luciferase-Reporter-Assays unter Verwendung eines NFκB-Inhibitors durchgeführt (Abbildung 3.17).

HaCaT-Keratinocyten wurden mit 40 ng/ml TNFα oder 4 μM CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO oder Non-CpG-6-PTO, teilweise in Anwesenheit des NFκB-Inhibitors SN50, für 18 Stunden inkubiert. Ohne Inhibitor sind ähnliche Induktionen der HbD2-Promoteraktivitäten durch die ODN sichtbar (Abbildung 3.17, linke Seite) wie bereits in Abbildung 3.15 gezeigt.

In Anwesenheit des NFκB-Inhibitors SN50, der bereits zwei Stunden präinkubiert wurde, ist eine deutliche Reduktion der TNFα-vermittelten HbD2-Promoter-Induktion zu erkennen, bei allen ODN ist keine Induktion der HbD2-Promoteraktivität mehr messbar (Abbildung 3.17, rechte Seite).



**Abbildung 3.17: Eine NFκB-Inhibition verhindert eine ODN-vermittelte Induktion der HbD2-Promoteraktivität.** HaCaT-Keratinocyten wurden für 18 Stunden mit 40 ng/ml TNFα oder 4 μM CpG-1-PTO, CpG-9-PTO, Non-CpG-5-PTO, Non-CpG-5G-PTO oder Non-CpG-6-PTO, teilweise in Anwesenheit des NFκB-Inhibitors SN50 (20 μM, zwei Stunden Prä-Inkubation) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einen Luciferase-Reporter-Assay, wie in „Material und Methoden 2.12“ beschrieben, eingesetzt, um die HbD2-Promoteraktivität zu bestimmen. Die deutliche Induktion der HbD2-Promoteraktivität vermittelt durch TNFα, CpG-1-PTO, CpG-9-PTO und Non-CpG-6-PTO (linke Seite) wird durch die Inhibition von NFκB deutlich verringert oder vollständig abgewendet (rechte Seite). \*P<0,05; \*\*P<0,005 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

## 4. Diskussion

### 4.1 ODN mit und ohne CpG-Motiv bewirken eine IL-8-Suppression *in vitro*

Es ist bislang bekannt, dass CpG-ODN einen immunstimulierenden Effekt ausüben, der mit der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine durch Immunzellen einhergeht (Bird 1987; Hergersberg 1991). Neuere Studien konnten belegen, dass auch ODN, die kein klassisches CpG-Motiv beinhalten (so genannte Non-CpG-ODN), in der Lage sind, das Immunsystem zu aktivieren (Vollmer et al. 2004). Andere Studien zeigten, dass eine subkutane Injektion von CpG-ODN zu einer *contact hypersensitivity* (Kontaktdermatitis; CHS-) Reaktion in Mäusen führt (Akiba et al. 2004). Bislang liegen jedoch keine Studien vor, die sich mit der Wirkung von CpG- und Non-CpG-ODN auf Keratinozyten beschäftigen. Da einige Veröffentlichungen zeigen, dass der Rezeptor für CpG-DNA TLR9 auch in humanen Keratinozyten exprimiert wird (Mempel et al. 2003; Miller et al. 2005; Lebre et al. 2007; Dorn et al. 2007), liegt die Vermutung nahe, dass CpG-ODN auch in der Haut relevante Informationen vermitteln.

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit konnte bereits erstmals gezeigt werden, dass sowohl CpG- als auch Non-CpG-PTO-ODN an humanen Keratinozyten (und anderen epithelialen Zellen) eine IL-8-Suppression bewirken, wobei der Mechanismus ungeklärt blieb. Innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit wurde dieser Effekt nun näher betrachtet.

Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigten, dass eine kritische Länge von 16 Nukleotiden und mehr zu einer verstärkten IL8-Suppression (konzentrationsabhängig) führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die CpG- und Non-CpG-ODN-vermittelte IL-8-Suppression nicht durch ineffektive Hexamere beeinflussbar ist (Abbildung 3.2), was die Schlussfolgerung nahe legt, dass diese Sequenzen nicht um eine gleiche (Rezeptor-) Bindestelle konkurrieren. Untersuchungen zu dem ODN-Rückgrat zeigten, dass ODN mit Phosphorothioat (PTO)-Bindungen zu

einer verstärkten IL-8-Suppression führen, verglichen mit ODN, welche mit Phosphodiester (PDE)-Rückgrat synthetisiert wurden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass PTO-Bindungen vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt sind und somit ihre Halbwertszeit in der Zellkultur (Stein et al. 1988; Ferreira 2003) aber auch *in vivo* (Zhao et al. 1993; Agrawal et al. 1995) deutlich erhöht ist. Zudem ist an Immunzellen beschrieben, dass PTO-Bindungen an sich bereits eine immun-modulatorische Wirkung entfalten, da PTO-ODN effizienter in Zellen aufgenommen werden (Zhao et al. 1993, 1994). Auch humane sowie murine B-Zellen werden durch PTO-ODN – unabhängig des Vorhandenseins eines CpG-Motivs – aktiviert (Zhao et al. 1996; Liang et al. 1996; Monteith et al. 1997; Hutcherson und Glover 1998). Sester et al. (2000) gelang der Nachweis, dass das PTO-Rückgrat alleine einen immun-modulatorischen Effekt auf Makrophagen ausübt. Zu erklären sind diese Effekte vermutlich durch eine chemotaktische Aktivität der PTO-ODN, die durch Aktivierung der p38 MAP Kinase, ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) und PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) hervorgerufen wird, wie Baek et al. (2001) *in vitro* zeigen konnten. Die Tatsache, dass das PTO-Rückgrat synthetischer ODN an sich in der Lage ist, das Immunsystem zu aktivieren, wird vermutlich durch den eingebauten Schwefel hervorgerufen. Dieser ist bereits als stark reduzierendes Agens beschrieben, welches einen immun-modulatorischen Effekt auf humane Makrophagen *in vitro* ausübt (Knorst et al. 1996). Es ist also wahrscheinlich, dass der Schwefel in chemischen Verbindungen vom angeborenen Immunsystem erkannt und als Alarmsignal gewertet wird (Baek et al. 2001). Eine weitere Erklärung der Immunstimulation von PTO-haltigen ODN, unabhängig vom Vorhandensein von CpG-Motiven, liegt darin, dass PTO-ODN möglicherweise in der Lage sind, sich in die Bindetasche von TLR9 einzupassen und dabei teilweise die Struktur effizienter CpG-haltiger Liganden nachahmen zu können (Roberts et al. 2005). Im vorliegenden Fall ist die verstärkte Wirkung der PTO-haltigen ODN vermutlich auf ein erhöhtes Bindungsvermögen von PTO-haltigen Sequenzen an Proteine (Baek et al. 2001) zurückzuführen (siehe auch 4.3 „CpG- und Non-CpG-ODN vermitteln ihre IL-8-suppressive Wirkung unabhängig von TLR9“),

oder durch die bereits angesprochene erhöhte Halbwertszeit durch den Schutz vor einem Abbau durch Nukleasen.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden Mixmere eingesetzt, die an unterschiedlichen Stellen PTO-Bindungen innerhalb der Sequenz enthalten. Die Ergebnisse, die in Abbildung 3.2 (d) dargestellt sind, zeigen, dass ein Anteil von über 50% PTO-Bindungen zu einer deutlich erhöhten IL-8-Suppression führt. PTO-Bindungen am 3'- und 5'-Ende schützen vor einer Degradation durch Exonukleasen, wohingegen PTO-Bindungen innerhalb der Sequenz vor einer Degradation durch Endonukleasen schützen. Da hier gezeigt werden konnte, dass PTO-Bindungen ab einem Anteil von 50% unabhängig ihrer Lage innerhalb der Sequenz, zu einer erhöhten IL-8-Suppression führen, weist dies darauf hin, dass die getesteten Sequenzen weder von Endo-, noch von Exonukleasen favorisiert werden.

Der IL-8 supprimierende Effekt konnte nicht nur am Monolayer gezeigt werden, sondern auch am Multilayer, wie eine immunhistochemische Färbung CpG- und Non-CpG-ODN behandelter Hautmodelle zeigt. Hier weist Non-CpG-5-PTO eine stärkere IL-8-Suppression auf als CpG-1-PTO (Abbildung 3.3), was die Daten am Monolayer bestätigt (Abbildung 3.1).

Dass IL-8 durch die Inkubation von CpG- oder Non-CpG-ODN auf Keratinozyten supprimiert und nicht wie in Immunzellen induziert wird, ist dadurch erklärbar, dass epidermale Zellen durch die Besiedelung der Haut mit einer eigenen Mikroflora permanent mit bakterieller DNA konfrontiert sind. Dies führt vermutlich dazu, dass Hautzellen DNA gegenüber eine Toleranz ausgebildet haben, wodurch permanente Entzündungsreaktionen, wie sie durch CpG- und Non-CpG-ODN in Immunzellen ausgelöst werden, unterbunden werden.

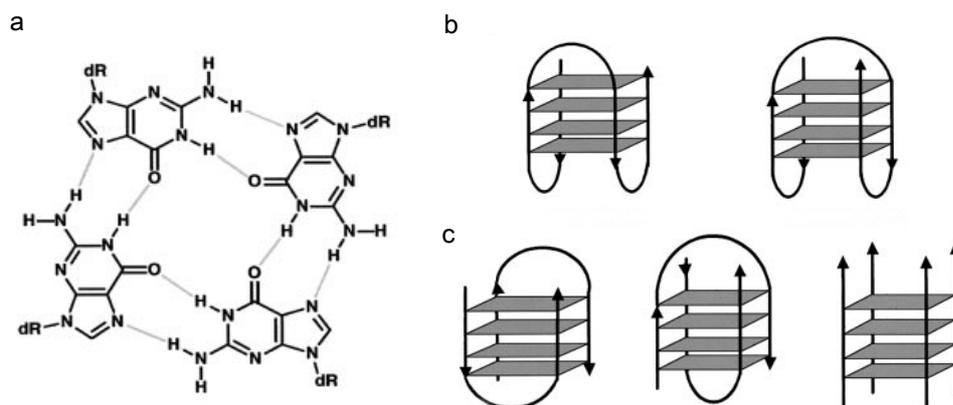
---

## 4.2 ODN-Aufnahme, -Penetration und -Transport

Die Aufnahme von ODN in Zellen und ihr Transport innerhalb der Zellen sind bislang immer noch weitestgehend unklar. Studien zeigen, dass ODN mit einer Länge von 22 Nukleotiden die Zellmembran zellspezifisch passieren können (Shi und Hoekstra 2004). Häcker et al. (1998) gelang der Nachweis, dass sowohl CpG- als auch Non-CpG-ODN von J774-Makrophagen mittels unspezifischer Endozytose aufgenommen werden. Im nächsten Schritt gelangen die ODN in sauren Vesikeln ins Zytosol und von dort zum Nukleus, wie von Tonkinson und Stein (1994) und Shi und Hoekstra (2004) berichtet. Eine Ansäuerung dieser Vesikel scheint von wesentlicher Bedeutung für die biologische Aktivität der ODN (Häcker et al. 1998). Abbildung 3.4 ist zu entnehmen, dass ODN verschiedener Länge einen unterschiedlichen intrazellulären Transport zeigen. Die beiden 20-mere CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO gelangen bereits nach kurzer Zeit in die Zellen und sammeln sich in perinuklearen Clustern, vermutlich endosomale Kompartimente, wie bereits von anderen Studien beschrieben (Häcker et al. 1998; Shi und Hoekstra 2004). Die Hexamere CpG-9-PTO und Non-CpG-5G-PTO dagegen gelangen sofort in den Nukleus und die Nukleoli, in denen sie auch nach mehreren Stunden noch sichtbar bleiben. Dass Non-CpG-5G-PTO vom Nukleus zurück in das Zytoplasma translozieren kann, wird von den Ergebnissen von Lorenz et al. (2000) unterstützt, die zeigen, dass ODN in der Lage sind, ATP-abhängig zwischen Nukleus und Zytoplasma zu pendeln.

Des Weiteren zeigt Abbildung 3.5, dass nicht nur die Länge der ODN eine wichtige Rolle während der Aufnahme in die Zellen und dem Transport innerhalb der Zellen spielt, sondern auch die Sequenz. Non-CpG-6-PTO zeigt sich auch nach wenigen Stunden immer noch lediglich an der Zelloberfläche. Erst nach 18 Stunden ist es ebenfalls wie die 20-mere aus Abbildung 3.4 in perinuklearen Clustern zu sehen. Diese Beobachtung hängt vermutlich damit zusammen, dass Poly-G-Sequenzen in der Lage sind, räumliche Strukturen auszubilden, die eine Aufnahme in die Zellen wesentlich erschweren. Bei diesen Strukturen handelt es sich um so genannte Tetraden (Abbildung 4.1 a) oder Quadruplexe, wenn es über die

plane Ebene hinaus geht (Abbildung 4.1 b, c). Stabilisiert werden Quadruplex-Strukturen über Hoogsteen-Wasserstoffbrücken (Gellert et al. 1962; Henderson et al. 1987, Han und Hurley 2000). Eine biologische Funktion üben diese Strukturen in der Stabilisierung von Telomer-Regionen der Chromosomen aus. Hier ist ein Strang in 3'-Richtung mittels Poly-G-Sequenzen verlängert und bildet G-Tetraden aus (Klobutcher et al. 1981). Es wurde herausgefunden, dass eine Verkürzung dieser Strukturen in Alterungsprozessen und in der Krebs-Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Harley et al. 1990; Hastie et al. 1990). Wie in Abbildung 4.1 zu erkennen ist, können Quadruplexe intramolekular (Smith et al. 1995; Wang und Patel 1995), aber auch intermolekular, das heißt aus mehreren ODN, gebildet werden (Kang et al. 1992; Smith und Feigon 1992) und verschiedene Formen ausbilden.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung einer G-Tetrade und G-Quadruplexen. (a)** Vier Guaninreste bilden mittels Hoogsteen Wasserstoffbrücken eine plane Struktur, die G-Tetrade. **(b)** ODN mit langen G-reichen Wiederholungen können Haarnadelstrukturen ausbilden, welche wiederum zu Quadruplexen dimerisieren, die intramolekularer „Stuhl“-Quadruplexe genannt werden; oder sich antiparallel anlagern zu dem so genannten intramolekularem „Korb“-Quadruplexen. **(c)** ODN mit zwei oder mehr G-reichen Wiederholungen können Haarnadelstrukturen ausbilden, die sich an die eines anderen Moleküls zu einem intermolekularen Haarnadel-Dimer lagern, auch „Stuhl“-Quadruplex genannt; oder zu einem antiparallelen intermolekularen „Korb“-Quadruplex. Ein tetramolekularer paralleler G-Quadruplex kann aus vier ODN-Strängen, die sich parallel anlagern, entstehen. Jeder Quadruplex ist aus G-Tetraden aufgebaut, die in **(b)** und **(c)** als graue Quadrate dargestellt sind (modifiziert nach Dapic et al. 2003).

Non-CpG-3-PTO verhält sich dagegen in der Aufnahme-Kinetik ähnlich den Hexameren in Abbildung 3.4, bereits nach wenigen Minuten ist es in den Nuklei der Zellen und später auch in den Nukleoli detektierbar.

---

Studien zeigen, dass ODN aus den endosomalen Kompartimenten in das Zytosol gelangen und von dort aus passiv in den Nukleus diffundieren können (Oberle et al. 2000; Shi and Hoekstra 2004). Hier kann eine Sequenz-spezifische Hybridisierung an DNA oder RNA stattfinden (Noonberg et al. 1993) oder aber auch eine Interaktion mit nuklearen Komponenten wie beispielsweise den Histonen (Lukacs et al. 2000). Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen, dass eine nukleare Akkumulation nur bei den kurzen Hexameren CpG-9-PTO und Non-CpG-5G-PTO, sowie Non-CpG-3-PTO zu finden ist.

Das Wissen um die Penetrations-Eigenschaften der ODN in mehrschichtige Gewebe ist für einen späteren therapeutischen Einsatz der ODN von wesentlicher Bedeutung. Es wurden daher verschiedene ODN auf ihre Penetration in das Phenion<sup>®</sup> 3D-Hautmodell hin untersucht (Abbildung 3.6). Ähnlich dem Aufnahme-Verhalten der ODN in Einzelzellen, zeigt sich auch hier, dass kürzere und weniger komplexe Strukturen leichter aufgenommen werden, beziehungsweise penetrieren können. Bereits nach einer halben Stunde sind die Hexamere, aber auch CpG-1-PTO in viablen epidermalen und zum Teil auch in dermalen Schichten detektierbar. Nur das sehr komplexe Non-CpG-6-PTO, das auch bei der Aufnahme am Monolayer bereits mehrere Stunden nur an der Zellperipherie zu erkennen war, zeigt keinerlei Penetration in mehrschichtiges Gewebe; es ist auch nach 48 Stunden lediglich auf der Oberseite der Epidermis sichtbar. Diese Beobachtung ist durch die Ausbildung der sehr komplexen Quadruplex-Strukturen durch Poly-G-Sequenzen, wie bereits erwähnt, zu erklären.

### **4.3 CpG- und Non-CpG-ODN vermitteln ihre IL-8-suppressive Wirkung unabhängig von TLR9**

TLR9, der als Rezeptor für CpG-haltige ODN beschrieben ist (Hemmi et al. 2000), liegt in der endosomalen Membran verankert vor, was dazu führt, dass eine Liganden-Internalisierung und ein Liganden-Transport

---

zum Rezeptor stattfinden müssen, bevor es zu einer Rezeptor-Liganden-Bindung kommen kann (Krieg et al. 1995). Häcker et al. (1998) konnten zeigen, dass eine Ansäuerung endosomaler Vesikel für die Wirkung von CpG-DNA eine wichtige Rolle spielt.

Um zu überprüfen, ob auch bei der IL-8-Suppression eine Ansäuerung endosomaler Vesikel, wie von Häcker et al. beschrieben, von Bedeutung ist, wurden Bafilomycin und Chloroquine eingesetzt (Abbildung 3.7). Beide Inhibitoren verhindern eine Endosomen-Reifung und -Ansäuerung: Bafilomycin A1 aus *Streptomyces griseus* blockiert die H<sup>+</sup>-Ionen-Pumpen der Vesikel und dadurch deren Ansäuerung (Perez und Carrasco 1994) und Chloroquine als starke Base führt zu einem pH-Shift in den Vesikeln (Ohkuma und Poole 1978). Da unter „3.2 ODN-Aufnahme, -Penetration und -Transport“ eine Ansammlung der meisten ODN in perinuklearen Clustern, vermutlich in endosomalen Vesikeln, gezeigt wurde, liegt es nahe, dass diese auch bei einer ODN-vermittelten IL-8-Suppression eine wichtige Rolle spielen. Wäre dies der Fall, würde der Einsatz der genannten Inhibitoren zu einer verringerten IL-8-Suppression führen. Es zeigte sich jedoch, dass eine Veränderung in Reifung oder Ansäuerung endosomaler Vesikel zu keiner Beeinträchtigung der ODN-vermittelten IL-8-Suppression führt (Abbildung 3.7). Beide 20-mer CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO weisen weiterhin eine deutliche IL-8-Suppression, auch in Anwesenheit von Bafilomycin oder Chloroquine, auf. Dies lässt darauf schließen, dass eine Aufnahme von ODN in das endosomale Kompartiment und eine Bindung an den dort lokalisierten TLR9, in diesem Fall für ihre biologische Aktivität nicht von Bedeutung ist.

Zur Validierung der Rolle von TLR9 bei der ODN-vermittelten IL-8-Suppression, wurde CpG-1-PTO mit seinem komplementären Strang hybridisiert und anschließend methyliert, da beschrieben ist, dass bakterielle DNA unter anderem vom Immunsystem aufgrund fehlender Methylierung des Cytidinrestes erkannt wird (Heeg et al. 1998; Hallman et al. 2001). Solche und weitere epigenetischen Modifizierungen sind charakteristisch für das Säuger-Genom (Holliday 1987; Bonfils et al. 2000; Delaval und Feil 2004) und werden daher nicht als „fremd“ identifiziert.

---

Krieg et al. (1995) konnten nachweisen, dass eine Methylierung von CpG-ODN zu einer verringerten Immunstimulierung führt. In Abbildung 3.8 (a) konnte jedoch gezeigt werden, dass methyliertes CpG-1-PTO den gleichen IL-8-suppressiven Effekt auf Keratinozyten ausübt wie das unmethylierte ODN. Diese Ergebnisse belegen die obigen Beobachtungen, dass hier ein TLR9-unabhängiger Mechanismus vorliegt. Durch Transfektionsexperimente mit dominant-negativen Expressions-Plasmiden für TLR9 und dem Adapterprotein MyD88 konnten diese Daten zusätzlich untermauert werden (Abbildung 3.8 b). Eine Beeinflussung dieser wichtigen Komponenten des TLR9-Signalwegs zeigt keine Auswirkung auf die CpG-1- und Non-CpG-5-PTO-vermittelte IL-8-Suppression.

Um zu überprüfen, ob durch die verwendeten ODN überhaupt eine transkriptionelle Regulierung von IL-8 ausgelöst wird, wurde mittels *Real-Time* PCR die relative Menge an IL-8 mRNA unterschiedlich behandelte Zellen im Vergleich zueinander bestimmt (Abbildung 3.8 d). Hier zeigt sich keine Beeinflussung der IL-8 mRNA in CpG-1-PTO- oder Non-CpG-5-PTO-behandelten Zellen. Dies weist darauf hin, dass IL-8 in diesem Fall post-transkriptionell beeinflusst wird, beispielsweise durch die Regulation der IL-8-Sekretion. So wird diskutiert, ob IL-8 in sekretorischen Vesikeln gespeichert und je nach Bedarf ausgeschüttet wird (Pellme et al. 2006). Außerdem ist eine zellunabhängige funktionelle Regulation von IL-8 durch eine direkte Wechselwirkung von IL-8 mit den verwendeten ODN denkbar.

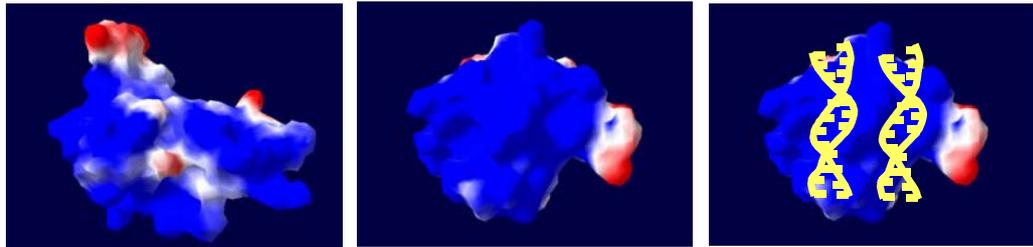
Um dies zu überprüfen, wurden einerseits HaCaT-Keratinozyten mit verschiedenen ODN über Nacht inkubiert; zum Vergleich dazu wurde andererseits konditioniertes zellfreies Medium mit unterschiedlichen ODN mit den gleichen Inkubationsbedingungen behandelt. Im Anschluss wurde die Menge an IL-8 im zellfreien Kulturüberstand und im ODN-inkubierten zellfreien Medium mittels ELISA, wie in „Material und Methoden 2.3“ beschrieben, analysiert (Abbildung 3.9). Hier konnte gezeigt werden, dass die Menge an IL-8 im Medium nach ODN-Inkubation, unabhängig vom Vorhandensein von Zellen, reduziert wird. Dies lässt vermuten, dass eine direkte physikalische Interaktion zwischen IL-8 und ODN stattfindet, die

---

dazu führt, dass IL-8 maskiert und somit nicht mehr im ELISA detektierbar ist (siehe auch Abbildung 4.2). Da die IL-8 supprimierende Wirkung der ODN bei Inkubation auf Zellen jedoch einen höheren Effekt erzielt (siehe Non-CpG-6-PTO), was umso erstaunlicher ist, da in den Zellen fortlaufend neues IL-8 produziert wird, finden hier vermutlich zwei verschiedene Mechanismen statt: ein zellabhängiger und einer unabhängig von lebenden Zellen. Um dies an einem weiteren Zytokin zu untersuchen, wurden einerseits UVB-induzierte Zellen, andererseits deren konditioniertes zellfreies Medium, mit ODN unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert und anschließend zellfreie Überstände zur IL-6 Analyse verwendet (Abbildung 3.10). Bei der Behandlung von Zellen mit verschiedenen ODN zeigt sich auch hier eine signifikante IL-6-Suppression. Im Unterschied zur IL-8-Suppression konnte hier jedoch außer bei Non-CpG-6-PTO keine Suppression in Abwesenheit von Zellen gezeigt werden. Bei IL-6 scheint also vorrangig eine zellabhängige Suppression stattzufinden. Studien zeigen, dass das anti-inflammatorisch wirkende Dexamethason (Klasse 2-Glukokortikoid), eine Repression der IL-6-Expression in epithelialen Zellen bewirkt, in dem es eine Okklusion an der Enhancer-Region und an weiteren Promoterelementen wie der TATA-Box und RNA-Startsite innerhalb des IL-6-Promoters hervorruft (Krueger et al. 1991). Möglicherweise spielen im Fall der IL-6-Suppression durch die verwendeten ODN ebenso transkriptionelle Regulationen eine Rolle.

Die zellunabhängige IL-8-Suppression besteht vermutlich, wie bereits erwähnt, aus einer direkten Wechselwirkung zwischen ODN und IL-8. Bei Betrachten des elektrostatischen Potentials beider Moleküle fällt auf, dass IL-8, wie bereits in der Einleitung gezeigt, ein überwiegend positives elektrostatisches Potential über die Oberfläche verteilt aufweist. DNA-Sequenzen verfügen dagegen über ein negatives elektrostatisches Potential, welches eine Wechselwirkung mit IL-8 möglich macht. Dass mobile Kationen durch DNA angezogen und daran gebunden werden und somit zu einer DNA-Helix-Deformation führen, ist bereits beschrieben (McConnell und Beveridge 2000). Auch eine Interaktion zwischen Nukleinsäuren und Proteinen, Enzymen oder Medikamenten ist bekannt

(MacGregor 2002). Diese Komplexe werden meist durch sehr stabile, nicht-kovalente Bindungen ausgebildet; hier spielen elektrostatische Interaktionen die wesentliche Rolle. Abbildung 4.2 zeigt die bereits aus der Einleitung bekannte schematische Darstellung des überwiegend positiven elektrostatischen Potentials von IL-8 (blau dargestellt) und eine mögliche Interaktion mit DNA-Fragmenten (gelb dargestellt).



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des elektrostatischen Potentials von IL-8 und eine mögliche Wechselwirkung mit DNA.** Mittels „Swiss-Pdb Viewer“ (Guex und Peisch 1997) kann das Potential von IL-8 grafisch dargestellt werden; eine blaue Färbung steht für ein positives elektrostatisches Potential, eine rote Färbung für ein negatives und weiß für ein neutrales. Die Wechselwirkung mit DNA (gelb) wird durch deren negatives elektrostatisches Potential ermöglicht (Abbildungen nach Dr. Andreas Bock).

Auch die in Abbildung 3.1 gezeigte kritische Länge von 16 Nukleotiden, welche zur verstärkten IL-8-Suppression führt, und die in Abbildung 3.2 gezeigte erhöhte IL-8-Suppression durch PTO-Bindungen im DNA-Rückgrat, lässt sich mit einer Interaktion von IL-8 und ODN in Einklang bringen. Möglicherweise ist diese kritische Länge der ODN für eine Bindung und Maskierung von IL-8 nötig, um einen reduzierten IL-8-Level im ELISA zu verursachen. Des Weiteren ist bekannt, dass PTO-Bindungen eine höhere Bindungsaffinität zu Proteinen aufweisen als PDE-Bindungen (Baek et al. 2001), was ebenfalls eine Interaktion von IL-8 und ODN verstärkt.

Eine funktionelle Hemmung von IL-6 oder IL-8 ist durch diese Ergebnisse noch nicht nachweisbar, weshalb CpG-1-PTO und Non-CpG-5-PTO im lebenden System (Kontaktdermatitis-Mausmodell) auf ihre mögliche anti-inflammatorische Wirkung hin untersucht wurden (siehe 3.5 und 4.5 „Non-CpG-5-PTO übt einen anti-inflammatorischen Effekt *in vivo* aus“)

---

#### **4.4 ODN-vermittelte Effekte auf DNA-Synthese und LDH-Ausschüttung**

Des Weiteren wurde überprüft, ob ODN bei HaCaT-Keratinocyten zu einer veränderten DNA-Synthese oder zu zytotoxischen Reaktionen (messbar durch eine LDH-Ausschüttung) führen. Hierzu wurde der BrdU-Einbau in die DNA gemessen (siehe „Material und Methoden 2.7“) und ein LDH-Test (siehe „Material und Methoden 2.8“) durchgeführt. Die DNA-Synthese (und somit die Proliferation) der HaCaT-Keratinocyten scheint lediglich durch die beiden ODN Non-CpG-5-PTO und Non-CpG-5G-PTO marginal beeinflusst zu werden (Abbildung 3.11 a). Eine vermehrte LDH-Ausschüttung ist bei keinem der getesteten ODN nachweisbar (Abbildung 3.11 b). Dies bestätigt die Annahme, dass eine IL-8-Reduktion nicht durch Proliferations-Änderungen der Zellen oder durch eine zytotoxische Wirkung der ODN und somit über eine veränderte Zellzahl, zustande kommt.

#### **4.5 Non-CpG-5-PTO übt einen anti-inflammatorischen Effekt *in vivo* aus**

Um zu überprüfen, ob die *in vitro*-Ergebnisse, die in einem reduzierten Zellsystem gefunden wurden, auch auf die wesentlich komplexere *in vivo*-Situation zutreffen, wurden eine CpG-1-PTO- und eine Non-CpG-5-PTO-haltige Salbe im Kontaktdermatitis-Mausmodell getestet (Abbildung 3.12). Die *in vitro*-Daten konnten bislang keinen funktionellen Nachweis einer anti-inflammatorischen Wirkung der ODN geben. Dieser sollte daraufhin in einem Kontaktdermatitis-Mausmodell erbracht werden.

Zur Vermittlung eines Kontaktekzems wurde DNFB verwendet, welches nach Komplettierung zum Vollantigen durch Bindung an Proteine von den Langerhanszellen in der Haut erkannt wird. Daraufhin folgt eine Antigenpräsentation und Ausschüttung von IL-1 aus Langerhanszellen und Keratinocyten, was wiederum zur Stimulation spezifischer T-

---

Lymphozyten, welche dann als *Memory-T-Zellen* im Organismus zirkulieren, führt (Saint-Mezard et al. 2004). Dieser Vorgang benötigt mindestens fünf Tage und wird als Sensibilisierung bezeichnet. Bei erneutem Kontakt mit DNFB kommt es nach 24 bis 72 Stunden zur Proliferation und Aktivierung von allergenspezifischen Effektor-T-Zellen, welche verschiedene pro-inflammatorische Zytokine ausschütten. Dieser Vorgang wird als Re-Exposition bezeichnet. Dadurch wird die Migration von Leukozyten aus den umliegenden Gefäßen in das betroffene Hautareal ausgelöst; es bildet sich ein entzündliches Infiltrat, klinisch entsteht das Bild eines allergischen Kontaktekzems (Büdinger und Hertl 2000; Saint-Mezard et al. 2004).

Eine topische Behandlung mit 1,4% Non-CpG-5-PTO-haltiger Salbe 60 Minuten nach der Re-Exposition von DNFB führt zu einem verminderten Kontaktekzem, wohingegen die 1,4% CpG-1-PTO-haltige Salbe lediglich einen nicht signifikanten Trend zeigt (Abbildung 3.12). Diese Ergebnisse liefern die funktionelle Bestätigung der *in vitro*-Daten, in denen auch Non-CpG-5-PTO eine deutlich stärkere IL-8-Suppression aufweist als die CpG-1-PTO-vermittelte (Abbildung 3.1).

Dies scheint den Ergebnissen von Akiba et al. (2004) zu widersprechen, da diese Gruppe zeigen konnte, dass eine subkutane CpG-ODN-Injektion eine CHS-Reaktion auslöst. Hier spielt jedoch vermutlich die Form der ODN-Applikation eine wichtige Rolle: eine systemische oder subkutane Applikation von ODN bewirkt eine Immunantwort, die mit dem Ausschütten verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und IL-8 einhergeht (Marshall et al. 2005). Dieser Effekt ist vermutlich durch die Bindung von ODN an TLR9 vermittelt. Sobald ODN die Barriere Haut überwunden haben und vom Körper als „fremd“ und potentiell pathogen erkannt werden, scheinen sie eine inflammatorische Immunantwort auszulösen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiermodell bewirken die topisch applizierten ODN dagegen eine Suppression der Immunantwort.

Es ist anzunehmen, dass aufgrund der eigenen Mikroflora die Haut einer permanenten Konfrontation mit bakterieller DNA ausgesetzt ist. Je nach Körperregion spezialisiert und abhängig vom Alter des Individuums sind

---

dauerhafte Hauptvertreter der hauteigenen humanen Mikroflora zum Beispiel *Mikrokokken*-Spezies, *Staphylokokken*, aerobe und anaerobe *Coryneforme*-Bakterien, sowie *Pityrosporum*-Spezies (Korting et al. 1988). Dies und die Tatsache, dass die Haut zudem beständig mit hauteigener DNA, die im Rahmen der terminalen Differenzierung auftritt, konfrontiert ist, führt zu der Annahme, dass die Haut DNA gegenüber eine Toleranz ausgebildet hat. Entzündungsreaktionen, wie sie durch CpG- aber auch Non-CpG-ODN in Immunzellen ausgelöst werden, sind in diesem Zusammenhang auf der Haut nicht wünschenswert, da sie aufgrund der permanenten Präsenz von DNA auf der Haut, fortwährend auftreten würden. Trotzdem spielt die Immunantwort gegen pathogene Mikroorganismen auf der Haut eine essentielle Rolle, wie an der Induktion hauteigener AMPs durch ODN gezeigt wurde (siehe 3.6 und 4.6 „ODN bewirken eine Induktion hauteigener anti-mikrobieller Peptide mittels NFκB-Aktivierung“).

#### **4.6 ODN bewirken eine Induktion hauteigener anti-mikrobieller Peptide mittels NFκB-Aktivierung**

Weiterführend wurde untersucht, ob CpG- oder Non-CpG-ODN in der Lage sind, anti-mikrobielle Substanzen in HaCaT-Keratinocyten und in mehrschichtigen Geweben (im Hautmodell) zu induzieren. Dies war deshalb von Interesse, da überprüft werden sollte, ob Keratinocyten eine allgemeine Toleranz gegenüber bakteriellen Produkten, wie CpG-DNA, aufweisen, oder ob lediglich Entzündungsreaktionen unterbunden werden, eine Abwehrreaktion, wie die Induktion hauteigener anti-mikrobieller Produkte, jedoch stattfindet. Es gelang erstmals der Nachweis, dass durch alleinige CpG- und Non-CpG-ODN-Inkubation, verstärkt jedoch durch die Kombination aus ODN und anderen immunstimulierenden Faktoren wie TNF $\alpha$  oder abgetötete Zellen des *Escherichia coli*-Stammes DH5 $\alpha$ , eine Induktion anti-mikrobieller Substanzen erzielt werden kann, wobei eine

---

nähere Spezifizierung innerhalb dieses ersten Tests nicht möglich war (Abbildung 3.13).

Die Induktion von AMPs durch CpG- und Non-CpG-ODN ist umso erstaunlicher, da als Induktoren hauteigener AMPs bislang einige Inflammationsparameter, wie beispielsweise Zytokine, beschrieben sind (Yang et al. 2001; Ganz 2003; Duits et al. 2003; Proud et al. 2004; Sorensen et al. 2005; Gläser et al. 2005). Des Weiteren waren CpG- und Non-CpG-ODN bislang hauptsächlich an Zellen des Immunsystems als immun-stimulierende TLR9-Liganden bekannt (Madsen et al. 1991; van den Broek et al. 1995; Medzhitov und Janeway 1997; Pfeffer et al. 1998; Hemmi et al. 2000; Biron 2001; Schitteck et al. 2001; Ganz 2003).

Um die Induktion einiger hauteigener AMPs näher zu bestimmen, wurden Hautmodelle mit unterschiedlichen ODN inkubiert und immunhistochemisch gegen die bekannten hauteigenen AMPs HbD2, HbD3 und Psoriasin gefärbt (Abbildung 3.14). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation der Hautmodelle mit unterschiedlichen ODN eine Induktion der genannten AMPs auslöst. Die Inkubation mit verschiedenen ODN führt auch zu einem unterschiedlich ausgeprägten Induktionsmuster von Psoriasin, HbD2 und HbD3, was auf eine Sequenzspezifität hinweist. Im Falle von Non-CpG-6-PTO beispielsweise könnte eine abweichende Induktion an dem geringen Penetrationsverhalten der Sequenz liegen. Im Falle von Psoriasin und HbD3 scheint eine geringe Penetration und das Verweilen auf der Epidermis nicht hinderlich für eine Induktion zu sein, bei HbD2 führt dies jedoch zu keiner Induktion. Möglicherweise ist hier das Vordringen der ODN zu viablen Schichten der Epidermis und der Dermis von größerer Bedeutung.

Die Ergebnisse der HbD2-Promotorstudie am Monolayer (Abbildung 3.15) zeigen dagegen, dass auch Non-CpG-6-PTO zu einer sehr starken Induktion des HbD2-Promotors in der Lage ist, sowohl an HaCaT-Zellen als auch an primären Keratinozyten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Non-CpG-6-PTO hier bereits an viablen Zellen lokalisiert vorliegt und somit die HbD2-Induktion auslösen kann, wozu es am Hautmodell nicht in der Lage ist. Auch alle anderen getesteten ODN zeigen eine Induktion von

---

HbD2. Daraus folgt, dass die verwendeten ODN von den Zellen als „Fremd-Faktoren“ erkannt und die nötigen Abwehr-Signale angeschaltet werden.

Die Regulation von HbD2 während einer Infektion oder Inflammation erfolgt, wie in der Einleitung erwähnt, NFκB-abhängig (Baldwin 1996; Liu et al. 1997, 1998). Bei NFκB handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in nahezu allen Zellen im inaktiven Zustand – gebunden an IκB – im Zytoplasma zu finden ist (Bäuerle und Baltimore 1996). Stimulierung durch Zytokine, Chemokine, virale oder bakterielle Komponenten, oder stressinduzierte Agenzien führt zur Phosphorylierung von IκB, was zu einer Polyubiquitinierung dieses Proteins und somit zu dessen Abbau führt. Dadurch wird NFκB freigesetzt und kann in den Nukleus translozieren, wo es an Promoter-spezifische κB Konsensus-DNA Elemente bindet und – oft im Zusammenspiel mit weiteren Coaktivatoren – die Expression der nachgeschalteten Gene induziert (zusammengefasst in Zhou et al. 2005). Die meisten aktiven Formen von NFκB induzieren eine Genexpression, es gibt jedoch auch Untereinheiten, denen eine Transaktivierungsdomäne fehlt, wodurch es hier trotz Aktivierung und Translokation in den Nukleus zu einer Repression NFκB-abhängiger Gene kommt (Ghosh und Karin 2002).

Um zu überprüfen, ob sowohl CpG- als auch Non-CpG-ODN trotz einer IL-8-Suppression *in vitro* und einer anti-inflammatorischen Wirkung *in vivo* zur Aktivierung von NFκB führen, die möglicherweise die Induktion von HbD2 verursacht, wurden HaCaT-Keratinocyten mit ODN behandelt und die Aktivierung von NFκB mittels EMSA nach 15 und 30 Minuten und mittels funktionellem Nachweis über einen Luciferase-Reporter-Assay nach 18 Stunden gemessen (Abbildung 3.16). Hier konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit verschiedenen ODN über unterschiedliche Inkubationszeiten zu einer deutlichen Aktivierung von NFκB führt. Dies bestätigt die Hypothese, dass die verwendeten CpG- und Non-CpG-ODN von den Zellen als „fremd“ und als „Gefahrssignal“ erkannt werden, was zur Aktivierung von NFκB führt.

---

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese ODN-vermittelte Aktivierung von NFκB tatsächlich, wie in der Literatur beschrieben (Baldwin 1996), in direktem Zusammenhang mit der ODN-vermittelten HbD2-Induktion steht (Abbildung 3.17). Mit Hilfe eines NFκB-Inhibitors kann die Induktion von HbD2 nach ODN-Inkubation an HaCaT-Keratinocyten inhibiert werden. Dies zeigt, dass die verwendeten ODN von den Zellen als „fremd“ und potentiell gefährlich erkannt werden, woraufhin NFκB aktiviert wird, welcher seinerseits die Synthese hauteigener AMPs induziert.

Die Regulation von HbD2 durch NFκB ist jedoch komplex; eine Aktivierung von NFκB alleine muss nicht zwangsläufig zu einer Induktion von HbD2 führen, wie an intestinalen Epithelzellen gezeigt wurde. Während eine NFκB-Aktivierung durch IL-1 und bakteriellem Flagellin zur Transkription des *HbD2*-Gens führt (O'Neil et al. 1999, 2002; Ogushi et al. 2001; Takahashi et al. 2001), wird dies beispielsweise an diesen Zellen durch den NFκB-Aktivatoren LPS nicht erreicht (O'Neil et al. 1999, 2002; Fahlgren et al. 2003). Dies ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass unterschiedliche Adapterproteine in den Signalwegen verwendet werden: IL-1 und Flagellin agieren über TRAF-6 (Bradley und Pober 2001; Chung et al. 2002; O'Neill 2002), wohingegen LPS über TRAF-2 agiert (Bradley und Pober 2001; Wajant und Scheurich 2001; Chung et al. 2002). Es scheint also, dass bereits vor der eigentlichen Aktivierung von NFκB im Signalweg andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen, die zusätzlich über die Regulation des *HbD2*-Gens entscheiden. Weitere Studien zeigten, dass eine NFκB-abhängige Induktion der HbD2-Expression ausgelöst durch Zytokine oder bakterielle Bestandteile, oft über eine Co-Aktivierung von AP-1, der MAP-Kinase oder der Protein-Kinase C (PKC) verläuft (Krisanaprakornkit et al. 2002; Tsutsumi-Ishii und Nagaoka 2002, 2003; McDermott et al. 2003; Jang et al. 2004; Chung und Dale 2004; Wehkamp et al. 2004; Donnarumma et al. 2004). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass TRAF-6 womöglich weitere Mediatoren aktiviert und dass nur dieses Zusammenspiel zu einer HbD2-Induktion führt.

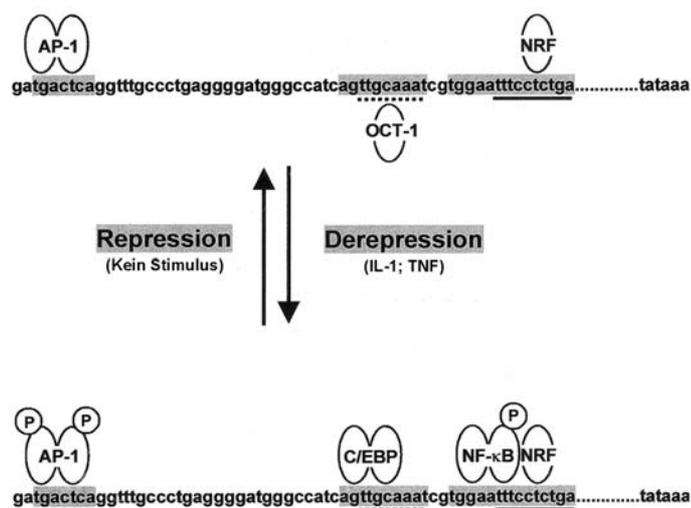
---

Wie bereits erwähnt, sind TLRs nach Aktivierung durch ihren spezifischen Liganden für eine schnelle Transkriptions-Induktion von Genen, die für Proteine der Wirtsabwehr kodieren, verantwortlich. Zu diesen gehört auch die Familie der AMPs (Lemaitre et al. 1996; Anderson 2000). Da auch PTO-ODN ohne CpG-Motiv zu einer Aktivierung von TLR9 in der Lage sind (Vollmer et al. 2004), können die in dieser Arbeit verwendeten CpG- und Non-CpG-PTO-ODN möglicherweise TLR9 aktivieren, der einen Signalweg auslöst, der zur Aktivierung von NFκB und somit zur Induktion von HbD2 führt. Diese NFκB-Aktivierung führt jedoch hier nicht zur Induktion des *IL-8*-Gens, da die relative Menge an IL-8 mRNA durch ODN-Behandlung der Zellen nicht beeinflusst wird (mittels *Real-Time* PCR gezeigt, Abbildung 3.8).

Dieses Phänomen kann einerseits dadurch erklärt werden, dass das *IL-8*-Gen nicht nur von NFκB reguliert wird (Kasahara et al. 1991), sondern noch verschiedene weitere Bindesequenzen in der Promoterregion aufweist (siehe auch Abbildung 4.3). IL-8 wird basal von nicht-induzierten Zellen sekretiert, seine Synthese kann jedoch nach einem Stimulus durch Zytokine wie TNFα oder IL-1 (Kasahara et al. 1991; Brasier et al. 1998), bakterielle (Aihara et al. 1997; Hobbie et al. 1997) oder virale Produkte (Murayama et al. 1997; Mastronarde et al. 1998) und zellulärem Stress (DeForge et al. 1993; Shapiro und Dinarello 1995; Lee et al. 1997; Sonoda et al. 1997) rapide ansteigen. Während manche Stimuli wie IL-1 oder TNFα eine mehr als 100-fache Hochregulation erreichen (Kasahara et al. 1991; Murayama et al. 1997; Sonoda et al. 1997; Brasier et al. 1998), bewirken manche bakteriellen Komponenten oder EGF lediglich eine moderate Induktion von fünf- bis zehnfach erhöhter Sekretion (Aihara et al. 1997; Hobbie et al. 1997; Holtmann et al. 1999). Dieses unterschiedliche Induktionsmuster muss durch intrazelluläre Signalwege exakt reguliert werden. So wurde gefunden, dass die Promotersequenz von IL-8, wie bereits erwähnt, nicht nur die Bindesequenz für NFκB enthält, welche für die IL-8-Expression essentiell ist, sondern auch die für AP-1 und C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*), die für eine maximale Expression benötigt werden (Kasahara et al. 1991; Aihara et al.

1997; Hobbie et al. 1997; Murayama et al. 1997; Lee et al. 1997; Brasier et al. 1998; Mastronarde et al. 1998) (siehe Abbildung 4.3).

In unstimulierten Zellen unterliegt der IL-8-Promoter einer Repression, welche hauptsächlich durch zwei Mechanismen ausgelöst wird: erstens durch die Bindung des NFκB-repressing factor (NRF) an das negative regulatorische Element, welches sich mit der NFκB-Bindestelle überschneidet (Nourbakhsh et al. 2001); und zweitens durch die Bindung des Oktamer-1 (OCT-1) an die Oktamer-Bindestelle am komplementären Strang in entgegengesetzte Richtung zur C/EBP-Bindestelle (Wu et al. 1997). Durch einen Stimulus wie TNFα oder IL-1 transloziert NFκB in den Nukleus und bindet an seine spezifische Bindestelle in der Nähe von NRF (Stein und Baldwin 1993; Chen et al. 1998; Nourbakhsh et al. 2001).



**Abbildung 4.3: Regulation von basaler und induzierter IL-8-Transkription.** Dargestellt ist ein Teil des IL-8-Promoters mit seinen verschiedenen regulatorischen Regionen. Identifizierte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind grau unterlegt. Die Repression des IL-8-Promoters in unstimulierten Zellen wird durch zwei Mechanismen ausgelöst: erstens durch die Bindung des NFκB-repressing factor (NRF) an das negative regulatorische Element, welches sich mit der NFκB-Bindestelle überschneidet (durchgezogene Linie); und zweitens durch die Bindung des Oktamer-1 (OCT-1) an die Oktamer-Bindestelle am komplementären Strang in entgegengesetzte Richtung zur C/EBP-Bindestelle (gestrichelte Linie). Durch Stimuli (TNFα oder IL-1) transloziert NFκB in den Nukleus und bindet an seine spezifische Bindestelle bei NRF, wodurch dieser vom Repressor zum Coaktivator wird. OCT-1 wird durch C/EBP ersetzt und AP-1 und NFκB signalabhängig phosphoryliert. Dieses Zusammenspiel der Faktoren initiiert die Transkription von IL-8. (Modifiziert nach Hoffmann et al. 2002).

Dadurch verliert NRF seine Repressor-Funktion und agiert als Coaktivator (Nourbakhsh et al. 2001). OCT-1 wird durch C/EBP ersetzt und AP-1 und

NFκB signalabhängig phosphoryliert. Diese unterschiedlichen Faktoren müssen zusammenspielen, um die Transkription von IL-8 zu initiieren.

In der vorliegenden Arbeit bewirken die verwendeten CpG- und Non-CpG-ODN eine zellabhängige NFκB-Aktivierung, welche die Expression von HbD2 sequenzabhängig induziert, jedoch nicht zur Induktion von IL-8 führt. Dies könnte durch das Fehlen von wichtigen Coaktivatoren oder, wie bereits beschrieben, durch unterschiedliche NFκB-Untereinheiten, welche die Repression NFκB-abhängiger Gene bewirken (Ghosh und Karin 2002), ausgelöst werden. Als zweite Komponente wird zellunabhängig sekretiertes IL-8 maskiert, wodurch es *in vitro* im ELISA nicht mehr detektierbar ist und möglicherweise *in vivo* zu einem anti-inflammatorischen Effekt führt.

Des Weiteren konnten Wang X et al. (2003) an Lungenepithelzellen eine TLR2-abhängige Induktion von HbD2 nachweisen. Hier scheint die NFκB-Aktivierung, die durch PAMPs hervorgerufen wird, über den TLR-Signalweg zu verlaufen. Die Vermutung liegt nahe, dass dieser Signalweg dann jedoch in epithelialen Zellen zwar zur Aktivierung von Genen führt, die der Abwehr dienen, zu denen die der AMPs gehören, nicht jedoch zu denen, deren Produkte eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CpG- und Non-CpG-PTO-ODN eine Aktivierung von NFκB bewirken, welche eine HbD2-Expression induziert. Eine Expressionsinduktion des *IL-8*-Gens findet nicht statt, eventuell aufgrund fehlender Coaktivatoren. Gleichzeitig geschieht jedoch eine direkte Wechselwirkung der ODN mit sekretiertem IL-8, wodurch es zur Maskierung und damit zur Suppression *in vitro* und möglicherweise auch zur Anti-Inflammation *in vivo* kommt.

---

## 4.7 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals, dass sowohl CpG- als auch Non-CpG-PTO-ODN eine IL-8-Suppression an humanen Keratinozyten *in vitro* und eine anti-inflammatorische Wirkung bei topischer Applikation *in vivo* entfalten. Des Weiteren gelang erstmals der Nachweis, dass sowohl CpG- als auch Non-CpG-PTO-ODN mittels NFκB-Aktivierung eine Induktion von HbD2 hervorrufen.

Offen bleibt der exakte Mechanismus dieser Regulation, da trotz NFκB-Aktivierung eine IL-8-Suppression stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass diese TLR9-unabhängig verläuft und vermutlich durch direkte Wechselwirkungen der ODN mit IL-8 ausgelöst wird. Ungeklärt bleibt jedoch die Frage, warum IL-8 trotz NFκB-Aktivierung nicht induziert wird. Dieses Phänomen ist bislang nur theoretisch zu erklären. Zur weiteren Aufklärung sollten hierzu NFκB-Studien durchgeführt werden, die genauen Aufschluss darüber geben, welche Untereinheiten von NFκB durch die hier verwendeten ODN aktiviert werden und ob Coaktivatoren oder Repressoren eine Rolle spielen. Dies ist sinnvoll, da einerseits Ghosh und Karin (2002) herausfanden, dass spezielle Untereinheiten von NFκB bei einer Aktivierung statt der zu erwartenden Expressions-Induktion zu einer Repression NFκB-abhängiger Gene führten. Andererseits ist zudem bekannt, dass eine NFκB-Aktivierung alleine nicht zu einer präzisen Regulation eines Gens ausreicht, sondern andere coaktivierende Faktoren eine wesentliche Rolle spielen (zusammengefasst in Hoffmann et al. 2002).

Eine Vielzahl von Studien belegt, dass bei der Aktivierung von TLR9 durch ODN der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert wird und somit Gene, deren Produkte für die Wirtsabwehr benötigt werden, induziert werden (Hemmi et al. 2000; Goldberg et al. 2000; Bauer et al. 2001; Takeshita et al. 2001). Da auch AMPs zu Bestandteilen der Wirtsabwehr zählen (Lemaitre et al. 1996; Anderson 2000) und an Lungenepithelzellen bereits eine TLR2-abhängige Induktion von HbD2 gefunden wurde (Wang X et al. 2003), liegt hier ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsarbeiten: das

Untersuchen einer TLR9-Abhängigkeit der HbD2-Induktion in Keratinozyten und die dabei beschrittenen Signalwege bis hin zur Aktivierung von NFκB.

Ein weiteres wichtiges Thema dieser Dissertation ist auch das Aufnahme- und Penetrationsverhalten der ODN. Hier gelang der Nachweis einer Sequenz- und Längen-abhängigen Aufnahme der ODN in Monolayer und in mehrschichtige komplexe Gewebe, welche mittels 3D-Hautmodell nachgestellt wurden. Diese Ergebnisse sind für einen therapeutischen Einsatz der ODN von hohem Interesse. Zu diesem Thema sollten weitere Studien mit spezifischen Färbungen einzelner Zellkompartimente wie beispielsweise endosomale Vesikel Aufklärung verschaffen.

## 5. Zusammenfassung

Der menschliche Körper ist permanent verschiedenen Mikroorganismen aus der Umwelt ausgesetzt. Dringen diese in den Körper ein, werden sie oder ihre Produkte vom Körper als „fremd“ erkannt und abgewehrt. Dies geschieht über zwei unterschiedliche immunologische Systeme, dem schnell und zuerst reagierenden angeborenen und einem langsamer reagierenden erworbenen Immunsystem.

Vom angeborenen Immunsystem erkannt werden so genannte *pathogen associated molecular pattern*, zu denen auch die CpG-DNA zählt, welche als Ligand des TLR9 identifiziert wurde. CpG- und Non-CpG-ODN sind bislang hauptsächlich an Zellen des Immunsystems erforscht und bewirken dort eine Immunaktivierung und einen pro-inflammatorischen Effekt, der mit dem Ausschütten inflammatorischer Zytokine einhergeht.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl CpG- als auch Non-CpG-PTO-ODN an humanen Keratinozyten eine IL-8-Suppression bewirken. Diese IL-8-supprimierende Wirkung wird nicht über den beschriebenen Rezeptor für CpG-DNA TLR9 entfaltet, sondern vermutlich mittels direkter physikalischer Interaktion mit IL-8 selbst. Durch diese Maskierung des IL-8 kann das Chemokin im ELISA nicht mehr detektiert werden.

Des Weiteren gelang im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit der funktionelle Nachweis, dass auch *in vivo* (im Kontaktdermatitis-Mausmodell) bei topischer Applikation eine anti-inflammatorische Wirkung durch eine Non-CpG-ODN-haltige Salbe erzielt werden kann.

Auf intakter Haut, welche permanent mit einer eigenen Mikroflora besiedelt und somit auch permanent mit bakterieller DNA konfrontiert ist, lösen CpG- und Non-CpG-ODN eine Immunsuppression aus, vermutlich als Schutz vor überschießenden Entzündungen der Haut.

Außerdem konnte anhand konfokaler Laser-Scan Mikroskopie gezeigt werden, dass die verwendeten ODN längen- und sequenzspezifisch in Keratinozyten aufgenommen und innerhalb der Zellen transportiert

werden. Hier zeigte sich, dass Sequenzen, welche bei der IL-8-Suppression nur geringe oder keine Effekte zeigen, direkt in den Nukleus oder die Nukleoli transportiert werden, wo sie vermutlich an nukleare Bestandteile gebunden oder abgebaut werden.

Untersuchungen zum Penetrationsverhalten der ODN an Multilayern zeigten, dass die ODN auch hier längenabhängig in tiefere viable Schichten gelangen.

Die Untersuchungen zum Penetrations- und Aufnahme-Verhalten der ODN ist für einen möglichen therapeutischen Einsatz der ODN von hohem Interesse.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit gelang zudem erstmals der Nachweis, dass PTO-ODN in der Lage sind, die zum angeborenen Immunsystem zählenden anti-mikrobiell wirksamen Substanzen HbD2, HbD3 und Psoriasin zu induzieren. Diese werden in der Haut synthetisiert und schützen gegen eine ganze Reihe von Mikroorganismen.

Anhand Promoter-Aktivitätsstudien konnte demonstriert werden, dass die verwendeten ODN eine Aktivierung von NFκB vermitteln, welche in direktem Zusammenhang mit einer HbD2-Induktion steht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CpG- und Non-CpG-ODN zwar als „fremd“ und potentiell gefährlich in intakter Haut erkannt werden, wodurch eine Induktion von anti-mikrobiell wirksamen Substanzen ausgelöst wird. Gleichzeitig findet jedoch eine IL-8-Suppression (*in vitro*), beziehungsweise eine anti-inflammatorische Wirkung (*in vivo*) statt, welche vermutlich vor überschießenden Immunreaktionen der Haut schützen sollen.

## 6. Literaturverzeichnis

Abel K, Wang Y, Fritts L, Sanchez E, Chung E, Fitzgerald-Bocarsly P, Krieg AM, Miller CJ: **Deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotide classes A, B, and C induce distinct cytokine gene expression patterns in rhesus monkey peripheral blood mononuclear cells and distinct alpha interferon responses in TLR9-expressing rhesus monkey plasmacytoid dendritic cells.** *Clin Diagn Lab Immunol* 12:606-621 (2005)

Agrawal S, Temsamani J, Galbraith W, Tang J: **Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides.** *Clin Pharmacokinet* 28:7-16 (1995)

Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H: **Bacterial DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.** *Eur J Immunol* 32:1958-1968 (2002)

Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, Matsushima K: **Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45.** *Infect Immun* 65:3218-3224 (1997)

Akiba H, Satoh M, Iwatsuki K, Kaiserlian D, Nicolas J-F, Kaneko F: **CpG immunostimulatory sequences enhance contact hypersensitivity in mice.** *J Invest Dermatol* 123:488-493 (2004)

Akira S, Takeda K: **Toll-like receptor signalling.** *Nat Rev Immunol* 4:499-511 (2004)

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S: **Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors.** *J Intern Med* 261:511-528 (2007)

Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C: **Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product.** *Cell* 42:779-789 (1985)

Anderson KV: **Toll signaling pathways in the innate immune response.** *Curr Opin Immunol* 12:13-19 (2000)

- 
- Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, Boonstra A, O'Garra A, Vicari A, Trinchieri G: **Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration.** *J Exp Med* 201:1157-1167 (2005)
- Avery OT: **Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types.** *J Exp Med* 79:137-158 (1944)
- Baek KH, Ha SJ, Sung YC: **A novel function of phosphorothioate oligodeoxynucleotides as chemoattractants for primary macrophages.** *J Immunol* 167:2847-2854 (2001)
- Baldwin ET, Weber IT, Charles RS, Xuan JJC, Appella E, Yamada M, Matsushima K, Edwards BFP, Clore GM, Gronenborn AM, Wlodawer A: **Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography.** *Proc Natl Acad Sci USA* 88:502-506 (1991)
- Baldwin S Jr.: **The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights.** *Annu Rev Immunol* 14:649-683 (1996)
- Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM: **Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA.** *J Immunol* 157:1840-1845 (1996)
- Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM: **Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung.** *J Clin Invest* 102:874-880 (1998)
- Barton GM, Kargan JC, Medzhitov R: **Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA.** *Nat Immunol* 7:49-56 (2006)
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB: **Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.** *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9237-9242 (2001)
- Bäuerle PA, Baltimore D: **NF $\kappa$ B: ten years after all.** *Cell* 87:13-20 (1996)
- Beer HD, Gassmann MG, Munz BBB, Steiling H, Engelhardt F, Bleuel K, Werner S: **Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in**

- 
- skin morphogenesis and cutaneous wound repair.** *J Invest Dermatol Symp Proc* 5:34-39 (2000)
- Benninghoff A, Drenckhahn D, Zenker W, **Anatomie – Band 2**, 15. Auflage, Urban & Schwarzenberg-Verlag, München, Wien, Baltimore (1994)
- Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A: **Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.** *Science* 298:2199-2202 (2002)
- Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A: **A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naïve B cells and constitutive expression in memory B cells.** *Blood* 101:4500-4504 (2003)
- Beutler B: **Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling.** *Nature* 430:257-263 (2004)
- Bevins CL, Jones DE, Dutra A, Schaffzin J, Muenke M: **Human enteric defensin genes: chromosomal map position and a model for possible evolutionary relationships.** *Genomics* 31:95-106 (1996)
- Bird AP: **CpG islands and genes.** *Current Opin Genet* 5:309-314 (1985)
- Bird AP: **CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus.** *Trends Genet* 3:342-347 (1987)
- Biron CA: **Interferons alpha and beta as immune regulators – a new look.** *Immunity* 14:661-664 (2001)
- Blasco MA, Gasser SM, Lingner J: **Telomeres and telomerase.** *Genes Dev* 13:2353-2359 (1999)
- Boland MP, O'Neill LA: **Ceramide activates NFkappaB by inducing the processing of p105.** *J Biol Chem* 273:15494-500 (1998)
- Boman HG: **Peptide antibiotics and their role in innate immunity.** *Annu Rev Immun* 13:61-92 (1995)
- Boman HG: **Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review.** *Scand J Immunol* 48:15-25 (1998)

- Bonfils C, Beaulieu N, Chan E, Cotton-Montpetit J, MacLeod AR: **Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b.** *J Biol Chem* 275:10754-10760 (2000)
- Borghesi L, Milcarek C: **Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its time?** *Cancer Res* 67:3989-3993 (2007)
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: **Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.** *Journal of Cell Biology* 106:761-771 (1988)
- Bowie A, O'Neill LA: **The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products.** *J Leukoc Biol* 67:508-514 (2000)
- Bradley JR, Pober JS: **Tumor necrosis factor-associated factors (TRAFs).** *Oncogene* 20:6482-6491 (2001)
- Brasier AR, Jamaluddin M, Casola A, Duan W, Shen Q, Garofalo RP: **A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors.** *J Biol Chem* 273:3551-3561 (1998)
- Breitkreutz D, Boukamp P, Stark HJ, Ryle C, Fusenig NE: **Response of established keratinocyte lines to modulators of epidermal differentiation.** *Pharmacology and the skin* 3. Auflage, Krager Basel (1989)
- van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M: **Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors.** *Immunol Rev* 148:5-18 (1995)
- Büdinger L, Hertl M: **Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview.** *Allergy* 55:108-115 (2000)
- Burteau C, Willems L, Kettmann R: **Les chémokines et leurs récepteurs: rôle dans les infections virales et dans les pathologies cancéreuses.** *Biotechnol Agron Soc Environ* 11:141-150 (2007)

- 
- Campbell DJ, Butcher EC: **Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues.** *J Exp Med* 195:135-141 (2002)
- Celis JE, Crüger D, Kiil J, Lauridsen JB, Ratz G, Basse B, Celis A: **Identification of a group of proteins that are strongly up-regulated in total epidermal keratinocytes from psoriatic skin.** *FEBS Lett* 262:159-164 (1990)
- Chain BM: **Current issues in antigen presentation – focus on the dendritic cell.** *Immunol Lett* 89:237-241 (2003)
- Chen YQ, Ghosh S, Ghosh G: **A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer.** *Nat Struct Biol* 5:67-73 (1998)
- Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H: **All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction.** *J Cell Sci* 115:679-688 (2002)
- Chung WO, Dale BA: **Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species.** *Infect Immun* 72:352-358 (2004)
- Clark R, Kupper T: **Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity.** *J Invest Dermatol* 125:629-637 (2005)
- Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD: **Structure-activity relationships of chemokines.** *J Leukoc Biol* 57:703-711 (1995)
- Clore GM, Appella E, Yamada M, Matsushima K, Gronenborn AM: **Determination of the secondary structure of interleukin-8 by nuclear magnetic resonance spectroscopy.** *J Biol Chem* 264:18907-18911 (1989)
- Clore GM, Apella E, Yamada M, Matsushima K, Gronenborn AM: **Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution.** *Biochem* 29:1689-1696 (1990)
- Cole AM, Wang W, Waring AJ, Lehrer RI: **Retrocyclins: using past as prologue.** *Curr Prot Pept Sci* 5:373-381 (2004)

- 
- Coley WB: **The treatment of malignant tumors by repeated inoculations with erysipelas with a report of ten original cases.** *Am J Med Sci* 105:487-511 (1893)
- Coley WB: **Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus.** *Am J Med Sci* 108:183-212 (1894)
- Cong Y, Jupelli M, Guentzel MN, Zhong G, Murthy AK, Arulanandam BP: **Intranasal immunization with clamydial protease-like activity factor and CpG deoxynucleotides enhances protective immunity against genital *Chlamydia muridarum* infection.** *Vaccine* 25:3773-3780 (2007)
- Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI: **Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins.** *J Virol* 60:1068-1074 (1986)
- Dapic V, Abdomerovic V, Marrington R, Peberdy J, Rodger A, Trent JO, Bates PJ: **Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides.** *Nucl Acid Res* 31:2097-2107 (2003)
- Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM: **CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen.** *J Immunol* 160:870-876 (1998)
- DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG: **Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress.** *J Biol Chem* 268:25568-25576 (1993)
- Delaval K, Feil R: **Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting.** *Curr Opin Genet Dev* 14:188-195 (2004)
- Diamond G, Bevins CL: **Molecule of the month:  $\beta$ -defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response.** *Clin Immunol Immunopath* 88:221-225 (1998)
- Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Orlando M, Tufano MA, Baroni A: **Malassezia furfur induces the expression of beta-defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner.** *Arch Dermatol Res* 295:474-481 (2004)

- Dorn A, Ludwig RJ, Bock A, Thaci D, Hardt K, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Bernd A, Kippenberger S: **Oligonucleotides suppress IL-8 in skin keratinocytes in vitro and offer anti-inflammatory properties in vivo.** *J Invest Dermatol* 127:846-854 (2007)
- Dorn A, Kippenberger S: **Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators.** *Curr Opin Mol Ther* 10:10-20 (2008)
- Duits LA, Nibbering PH, van Strijen E, Vos JB, Mannesse-Lazeroms SP, van Sterkenburg MA, Hiemstra PS: **Rhinovirus increases human  $\beta$ -defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 38:59-64 (2003)
- Elkins KL, Rhinehart-Jones TR, Stibitz S, Conover JS, Klinman DM: **Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria.** *J Immunol* 162:2291-2298 (1999)
- Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, Gillitzer R: **Chemokines IL-8, Gro $\alpha$ , MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing.** *Am J Pathol* 153:1849-1860 (1998)
- Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML: **Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis.** *Clin Exp Immunol* 131:90-100 (2003)
- Fernandez de Caleyra R, Gonzales-Pasqual B, Garcia-Olmedo F, Carbonero P: **Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*.** *Appl Microbiol* 23:998-1000 (1972)
- Ferreiro MG, Crooke RM, Tillman L, Hardee G, Bodmeier R: **Stability of polycationic complexes of an antisense oligonucleotide in rat small intestine homogenates.** *Eur J Pharm Biopharm* 55:19-26 (2003)

- 
- Filion MC, Saha N, Gueddi M, Phillips NC: **Development of short non-CpG phosphodiester oligonucleotides as immune stimulatory agents.** *Vaccine* 21:983-989 (2003)
- Filion MC, Filion B, Roy J, Ménard S, Reader S, Phillips NC: **Development of immunomodulatory six base-length non-CpG motif oligonucleotides for cancer vaccination.** *Vaccine* 22:2480-2488 (2004)
- Fritsch P. **Dermatologie und Venerologie – Lehrbuch und Atlas.** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1998)
- Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stähle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH: **The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders.** *J Biol Chem* 272:15258-15263 (1997)
- Fuchs E, Raghavan S: **Getting under the skin of epidermal morphogenesis.** *Nat Rev Genet* 3:199-209 (2002)
- Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R: **Inflammation: basic principles and clinical correlates.** NY, Raven, p 343 (1988)
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI: **Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils.** *J Clin Invest* 76:1427-1435 (1985)
- Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI: **Defensin.** *Eur J Haematol* 44:1-8 (1990)
- Ganz T, Weiss J: **Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia.** *Semin Hematol* 34:343-354 (1997)
- Ganz T: **Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity.** *Nat Rev Immunol* 3:710-720 (2003)
- García JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodríguez-Jiménez J, Forssmann U, Adermann K, Klüver E, Vogelmeier C, Becker D, Hedrich R, Forssmann WG, Bals R: **Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction.** *Cell Tissue Res* 306:257-264 (2001)

- 
- Gellert M, Lipsett MN, Davies DR: **Helix formation by guanylic acid.** *Proc Natl Acad Sci USA* 48:2013-2018 (1962)
- Ghosh S, Karin M: **Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.** *Cell* 109:S81-S96 (2002)
- Gillitzer R, Goebeler M: **Chemokines in cutaneous wound healing.** *J Leukoc Biol* 69:513-521 (2001)
- Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM: **Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection.** *Nat Immunol* 6:57-64 (2005)
- Goldberg B, Urnovitz HB, Stricker RB: **Beyond danger: unmethylated CpG dinucleotides and the immunopathogenesis of disease.** *Immunol Lett* 73:13-18 (2000)
- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wislon JM: **Human-beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis.** *Cell* 88:553-560 (1997)
- Griffin S, Taggart CC, Greene CM, O'Neill S, McElvaney NG: **Neutrophil elastase up-regulates human  $\beta$ -defensin-2 expression in human bronchial epithelial cells.** *FEBS Letters* 546:233-236 (2003)
- Guermónprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S: **ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells.** *Nature* 425:397-402 (2003)
- Guex N, Peitsch MC: **SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.** *Electrophoresis* 18:2714-2723 (1997)
- Gursel I, Gursel M, Ishii KJ, Klinman DM: **Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides.** *J Immunol* 167:3324-3328 (2001)
- Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM: **Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotides.** *J Leukoc Biol* 71:813-820 (2002)

- Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM: **Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation.** *J Immunol* 171:1393-1400 (2003)
- Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H: **GpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation.** *EMBO J* 17:6230-6240 (1998)
- Hallman M, Rämets M, Ezekowitz RA: **Toll-like receptors as sensors of pathogens.** *Pediatr Res* 50:315-321 (2001)
- Halpern MD, Kurlander RJ, Pisetsky DS: **Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha.** *Cell Immunol* 167:72-78 (1996)
- Han H, Hurley LH: **G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design.** *Trends Pharmacol Sci* 21:136-142 (2000)
- Hancock RE, Falla T, Brown M: **Cationic bacterial peptides.** *Adv Microb Physiol* 37:135-175 (1995)
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K: **Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation.** *J Leukoc Biol* 56:559-564 (1994)
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM: **A peptide antibiotic from human skin.** *Nature* 387:861 (1997)
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM: **Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic.** *J Biol Chem* 276:5707-5713 (2001)
- Harder J, Schröder JM: **RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin.** *J Biol Chem* 277:46779-46784 (2002)
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW: **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** *Nature* 345:458-460 (1990)

- 
- Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM: **Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*.** *J Immunol* 164:1617-1624 (2000)
- Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S: **Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- $\alpha$  induction in plasmacytoid dendritic cells.** *Eur J Immunol* 33:1633-1641 (2003)
- Hastie HD, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC: **Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing.** *Nature* 346:866-868 (1990)
- Hébert C, Luscinskas F, Kiely J, Luis EA, Darbonne WC, Bennett GL, Liu CC, Obin MS, Gimbrone MA Jr, Baker JB: **Endothelial and leukocyte forms of IL-8: conversion of thrombin and interactions with neutrophils.** *J Immunol* 145:3033-3040 (1990)
- Heeg K, Sparwasser T, Lipford GB, Häcker H, Zimmermann S, Wagner H: **Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17 :464-469 (1998)
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: **A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.** *Nature* 408:740-745 (2000)
- Henderson E, Hardin CC, Wolk SK, Tinoco I Jr., Blackburn EH: **Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs.** *Cell* 51:899-908 (1987)
- Henseler T, Christophers E: **Disease concomitance in psoriasis.** *J Am Acad Dermatol* 32:982-986 (1995)
- Hergersberg M: **Biological aspects of cytosine methylation in eukaryotic cells.** *Experientia* 47:1171-1185 (1991)
- Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galán JE: **Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine**

- 
- production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells.** *J Immunol* 159:5550-5559 (1997)
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M: **Multiple control of interleukin-8 gene expression.** *J Leukoc Biol* 72:847-855 (2002)
- Hoffmann JA: **The immune response of *Drosophila*.** *Nature* 426:33-38 (2003)
- van Hogerlinden M, Rozell BL, Toftgard R, Sundberg JP: **Characterization of the progressive skin disease and inflammatory cell infiltrate in mice with inhibited NF-kappaB signaling.** *J Invest Dermatol* 123:101-108 (2004)
- Holliday, R: **The inheritance of epigenetic defects.** *Science* 238:163-170. (1987)
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI: **Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor.** *Science* 253:1278-1280 (1991)
- Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, Kracht M: **Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways.** *Mol Cell Biol* 19:6742-6753 (1999)
- Hutcherson SL, Glover JM: **Immune stimulation by phosphorothioate oligonucleotide analogs.** US Patent No: 5,723,335 (1998)
- Inoue J, Aramaki Y: **Cyclooxygenase-2 inhibition promotes enhancement of antitumor responses by transcutaneous vaccination with cytosine-phosphate-guanosine-oligodeoxynucleotides and model tumor antigen.** *J Invest Dermatol* 127:614-621 (2007)
- Ishida T, Mizushima S, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, Aizawa S, Watanabe T, Mosialos G, Kieff E, Yamamoto T, Inoue J: **Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signalling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region.** *J Biol Chem* 271:28745-28748 (1996)

- 
- Janeway CA, Medzhitov R: **Innate immune recognition.** *Annu Rev Immunol* 20:197-216 (2002)
- Jang BC, Lim KJ, Paik JH, Kwon YK, Shin SW, Kim SC, Jung TY, Kwon TK, Cho JW, Baek WK, Kim SP, Suh MH, Suh SI: **Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB.** *Biochem Biophys Res Commun* 320:1026-1033 (2004)
- Jones DE, Bevins CL: **Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene.** *J Biol Chem* 267:23216-23225 (1992)
- József L, Khreiss T, El Kebir D, Filep JG: **Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signalling in human neutrophils.** *J Immunol* 176:1195-1202 (2006)
- Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S: **Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells.** *J Immunol* 166:5688-5694 (2001)
- Kang C, Zhang X, Ratliff R, Moyzis R, Rich A: **Crystal structure of four-stranded Oxytricha telomeric DNA.** *Nature* 356:126-131 (1992)
- Kapsenberg ML: **Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.** *Nat Rev Immunol* 3:984-993 (2003)
- Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K: **IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line.** *Immunology* 74:60-67 (1991)
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: **Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin.** *Immunity* 11:115-122 (1999)
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S: **Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes.** *J Immunol* 167:5887-5894 (2001)

- 
- Kerkmann M, Costa LT, Richter C, Rothenfusser S, Battiany J, Hornung V, Johnson J, Englert S, Ketterer T, Heckl W, Thalhammer S, Endres S, Hartmann G: **Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon- $\alpha$  induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells.** *J Biol Chem* 280:8086-8093 (2005)
- Kippenberger S, Loitsch S, Grundmann-Kollmann M, Simon S, Hardt-Weinelt K, Kaufmann R, Bernd A: **Activators of peroxisome proliferators-activated receptors protect human skin from UVB-light-induced inflammation.** *J Invest Dermatol* 117:1430-1436 (2001)
- Kippenberger S, Loitsch S, Thaci D, Kaufmann R, Bernd A: **Detection of human beta defensin-1 and -2 by RT-competitive multiplex PCR.** *Arch Dermatol Res* 296:539-542 (2005)
- Klenha J, Krs V: **Lysozyme in mouse and human skin.** *J Invest Dermatol* 49:396-399 (1967)
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM: **CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma.** *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2879-2883 (1996)
- Klinman DM: **Therapeutic applications of CpG-containing oligodeoxynucleotides.** *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 8:181-184 (1998)
- Klinman DM, Conover J, Coban C: **Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection.** *Infect Immun* 67:5658-5663 (1999-1)
- Klinman DM, Barnhart KM, Conover J: **CpG motifs as immune adjuvants.** *Vaccine* 17:19-25 (1999-2)
- Klinman DM: **Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides.** *Nat Rev Immunol* 4:249-258 (2004)
- Klobutcher LA, Swanton MT, Donini P, Prescott DM: **All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal**

- 
- sequence and an unusual 3' terminus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3015-3019 (1981)
- Klotman ME, Chang TL: **Defensins in innate antiviral immunity.** *Nat Rev Immunol* 6:447-456 (2006)
- Knorst MM, Kienast K, Müller-Quernheim J, Ferlitz R: **Effect of sulfur dioxide on cytokine production of human alveolar macrophages in vitro.** *Arch Environ Health* 51:150-156 (1996)
- Korting HC, Lukacs A, Braun-Falco O: **Microbial flora and odor of the healthy human skin.** *Hautarzt* 39:564-568 (1988)
- Kozar K, Kamiński R, Switaj T, Ołdak T, Machaj E, Wysocki PJ, Mackiewicz A, Lasek W, Jakóbsiak M, Gołab J: **Interleukin 12-based immunotherapy improves the antitumor effectiveness of a low-dose 5-Aza-2'-Deoxycytidine treatment in L1210 leukemia and B16F10 melanoma models in mice.** *Clin Can Res* 9:3124-3133 (2003)
- Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM: **CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.** *Nature* 374:546-549 (1995)
- Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT: **CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge.** *J Immunol* 161:2428-2434 (1998)
- Krieg AM: **CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.** *Annu Rev Immunol* 20:709-760 (2002)
- Krieg AM: **Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation.** *Nat Rev Drug Discov* 5:471-484 (2006)
- Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA: **Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family.** *J Immunol* 168:316-324 (2002)
- Krueger J, Ray A, Tamm I, Sehgal PB: **Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells.** *J Cell Biochem* 45:327-334 (1991)

- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G: **Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells.** *Eur J Immunol* 31:2154-2163 (2001)
- Kupper TS, Fuhlbrigge RC: **Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences.** *Nat Rev Immunol* 4:211-222 (2004)
- Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227:680-685 (1970)
- de Lange T, Jacks T: **For better or worse? Telomerase inhibition and cancer.** *Cell* 98:273-275 (1999)
- LaRosa G, Thomas KM, Kaufmann M, Mark R, White M, Taylor L, Gray G, Witt D, Navarro J: **Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity.** *J Biol Chem* 267:25402-25406 (1992)
- Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: **The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T-Lymphocytes.** *Science* 243:1464-1466 (1989)
- Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B, Thomsen PD, Deleuran BW, Nowak J, Skodt V, Thomsen HK, Deleuran M, Thestrup-Pedersen K: **The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody.** *J Immunol* 155:2151-2157 (1995)
- Lebre MC, von der Aar AMG, van Baarsen L, van Capel TMM, Schuitemaker JHN, Kapsenberg ML, de Jong EC: **Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5 and 9.** *J Invest Dermatol* 127:331-341 (2007)
- Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI: **Characterization of complementary DNA clones encoding the rabbit IL-8 receptor.** *J Immunol* 148:1261-1264 (1992)

- 
- Lee LF, Haskill JS, Mukaida N, Matsushima K, Ting JP: **Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter.** *Mol Cell Biol* 17:5097-5105 (1997)
- Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME: **Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity.** *J Clin Invest* 84:553–561 (1989)
- Lehrer RI, Ganz T: **Endogenous vertebrate antibiotics: defensins, protegrins and other cystein-rich antimicrobial peptides.** *Ann NY Acad Sci* 797:228-239 (1996)
- Lehrer RI, Ganz T: **Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense.** *Curr Opin Immunol* 11:23-27 (1999)
- Lehrer RI: **Primate defensins.** *Nat Rev Microbiol* 2:727-738 (2004)
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: **The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.** *Cell* 86:973-983 (1996)
- Leonova L, Kokryakov VN, Aleshina G, Hong T, Nguyen T, Zhao C, Waring AJ, Lehrer RI: **Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity.** *J Leukoc Biol* 70:461-464 (2001)
- Liang H, Nishioka Y, Reich CF, Pisetzky DS, Lipsky PE: **Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.** *J Clin Invest* 98:1119-1129 (1996)
- Lind MH, Rozell B, Wallin RP, van Hogerlinden M, Ljunggren HG, Toftgard R, Sur I: **Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition.** *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4972-4977 (2004)
- Linghua Z, Xingshan T, Fengzhen Z: **Vaccination with porcine reproductive and respiratory syndrome killed virus vaccine and immunostimulatory oligodeoxynucleotides induces specific immunity in piglets.** *Vaccine* 25:1735-1742 (2007)

- Liu L, Zhao C, Heng HH, Ganz T: **The human-beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry.** *Genomics* 43:316-320 (1997)
- Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HH, Schutte BC, McCray PB Jr, Ganz T: **Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation.** *Gene* 222:237-244 (1998)
- Liu YJ: **IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors.** *Annu Rev Immunol* 23:275-306 (2005)
- Lorenz P, Misteli T, Baker BF, Bennett F, Spector DL: **Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides.** *Nucl Acid Res* 28:582-592 (2000)
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 193:265-275 (1951)
- Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS: **Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus.** *J Biol Chem* 275:1625-1629 (2000)
- MacGregor RB: **The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure.** *Biochim Biophys Acta* 1595:266-276 (2002)
- Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honoré B, Dejgaard K, Olsen E, Kiil J, Walbum E, Andersen AH, Basse B, Lauridsen JB, Ratz GP, Celis A, Vandekerckhove J, Celis JE: **Molecular Cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "Psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin.** *J Invest Dermatol* 97:701-712 (1991)
- Makris C, Godfrey VL, Krahn-Senftleben G, Takahashi T, Roberts JL, Schwarz T, Feng L, Johnson RS, Karin M: **Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti.** *Mol Cell* 5:969-979 (2000)

- 
- Marshall JD, Fearon K, Abbate C, Subramanian S, Yee P, Gregorio J, Coffman RL, Van Nest G: **Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell function.** *J Leukoc Biol* 73:781-792 (2003)
- Marshall JD, Heeke DS, Abbate C, Yee P, van Nest G: **Induction of interferon- $\gamma$  from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon- $\alpha$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ .** *Immunology* 117:38-46 (2005)
- Mastrorarde JG, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K, Hunninghake GW: **Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium.** *J Infect Dis* 177:1275-1281 (1998)
- Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr: **Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands.** *Infect Immun* 67:2740-2745 (1999)
- Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ: **Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor.** *J Exp Med* 167:1883-1893 (1988)
- Mazzolini G, Prieto J, Melero I: **Gene therapy of cancer with interleukin-12.** *Curr Pharm Des* 9:1981-1991 (2003)
- McConnell KJ, Beveridge DL: **DNA structure: what's in charge?** *J Mol Biol* 304:803-820 (2000)
- McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ: **Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1 $\beta$  stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1859-1865 (2003)
- Medzhitov R, Janeway CA: **Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.** *Cell* 91:295-298 (1997)

- 
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA: **A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature* 388:394-397 (1997)
- Mempel M, Voelcker V, Köllisch G, Plank C, Rad R, Gerhard M, Schnopp C, Fraunberger P, Walli AK, Ring J, Abeck D, Ollert M: **Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor  $\kappa$ B controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is Toll-like receptor 2 but not Toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent.** *J Invest Dermatol* 121:1389-1396 (2003)
- Mewes KR, Raus M, Bernd A, Zöller NN, Sättler A, Graf R: **Elastin expression in a newly developed full-thickness skin equivalent.** *Skin Pharmacol Physiol* 20:85-95 (2007)
- Miller LS, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, Chung W, Starner TD, Kim J, Sieling PA, Ganz T, Modlin RL: **TGF- $\alpha$  regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes.** *J Immunol* 174:6137-6143 (2005)
- Monteith DK, Henry SP, Howard RB, Flournoy S, Levin AA, Bennet CF, Crooke ST: **Immune stimulation – a class effect of phosphorothioate oligonucleotides in rodents.** *Anticancer Drug Des* 12:421-432 (1997)
- Mosdósi B, Decsi T, Nagy K, Soltész G, Maródi L: **Early recognition and successful treatment of an infant with severe combined immune deficiency.** *Orv Hetil* 143:2081-2083 (2002)
- Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, Khabar KS, Higashi H, Mukaida N, Matsushima K: **Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF- $\kappa$ B-binding sites of the interleukin-8 gene.** *J Virol* 71:5692-5695 (1997)
- Murphy PM, Tiffany HL: **Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor.** *Science* 253:1280-1283 (1991)
- Nguyen TX, Cole AM, Lehrer RI: **Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth.** *Peptides* 24:1647-1654 (2003)

- 
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K: **The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway.** *Nature* 398:252-256 (1999)
- Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I: **Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway.** *Int Immunol* 14:421-426 (2002)
- Niyonsaba F, Ogawa H, Nagaoka I: **Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils.** *Immunology* 111:273-281 (2004)
- Noble WC: **The skin microflora and microbial disease.** *Cambridge University Press, Cambridge, UK* 210 (1992)
- Noonberg SB, Garovoy MR, Hunt CA: **Characteristics of oligonucleotide uptake in human keratinocyte cultures.** *J Invest Dermatol* 101:727-731 (1993)
- Nourbakhsh M, Kalble S, Dorrie A, Hauser H, Resch K, Kracht M: **The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element.** *J Biol Chem* 276:4501-4508 (2001)
- Oberle V, Bakowsky U, Zuhorn IS, Hoekstra D: **Lipoplex formation under equilibrium conditions reveals a three-step mechanism.** *Biophys J* 79:1447-1454 (2000)
- Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H, Nakahara Y, Ohsaki M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Moss J, Hirayama T: **Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells.** *J Biol Chem* 276:30521-30526 (2001)
- Ohkuma S, Poole B: **Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents.** *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3327-3331 (1978)

- 
- Omori E, Matsumoto K, Sanjo H, Sato S, Akira S, Smart RC, Ninomiya-Tsuji J: **Tak1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis.** *J Biol Chem* 281:19610-19617 (2006)
- O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF: **Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.** *J Immunol* 163:6718-6724 (1999)
- O'Neil DA, Cornway S, Grant G, Garden KE, Logan ET, Wilson D, Kelly D: **Bacterial flagellin, but not LPS, is required for the induction of human  $\beta$ -defensin 2 in intestinal and gastric epithelial cells.** *Reprod Nutr Dev* 42:S14 (2002)
- O'Neil DA: **Regulation of expression of beta-defensins: endogenous enteric peptide antibiotics.** *Mol Immunol* 40:445-450 (2003)
- O'Neill LA: **Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily.** *Curr Top Microbiol Immunol* 270:47-61 (2002)
- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY: **Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis.** *N Engl J Med* 347:1151-60 (2002)
- Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K: **Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family.** *Annu Rev Immunol* 99:617-648 (1991)
- Oullette AJ, Selsted ME: **Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense.** *FASEB J* 10:1280-1289 (1996)
- Pasare C, Medzhitov R: **Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance.** *Curr Opin Immunol* 15:677-682 (2003)
- Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gillitzer R, Israel A, Krieg T, Rajewsky K, Haase I: **TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2.** *Nature* 417:861-866 (2002)
- Pellme S, Mörgelein M, Tapper H, Mellqvist U-H, Dahlgren C, Karlsson A: **Localization of human neutrophil interleukin-8 (CXCL-8) to organelle(s)**

- distinct from the classical granules and secretory vesicles. *J Leukoc Biol* 79:564-573 (2006)**
- Perez L, Carrasco L: **Involvement of the vacuolar H(+)-ATPase in animal virus entry.** *J Gen Virol* 75:2595-2606 (1994)
- Pernet I, Reymermier C, Guezennec A, Branka JE, Guesnet J, Perrier E, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Viac J: **Calcium triggers beta-defensin (hBD-2 and hBD-3) and chemokine macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha/CCL20) expression in monolayers of activated human keratinocytes.** *Exp Dermatol* 12:755-760 (2003)
- Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S: **Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons.** *Cancer Res* 58:2489-2499 (1998)
- Portielje JE, Gratama JW, van Ojik HH, Stoter G, Kruit WH: **IL-12: A promising adjuvant for cancer vaccination.** *Cancer Immunol Immunother* 52:133-144 (2003)
- Prado GN, Thomas KM, Suzuki H, LaRosa GJ, Wilkinson N, Folco E Navarro J: **Molecular characterization of a novel rabbit interleukin-8 receptor isotype.** *J Biol Chem* 269:12391-12394 (1994)
- Proud D, Sanders SP, Wiehler S: **Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human  $\beta$ -defensin 2 both *in vitro* and *in vivo*.** *J Immunol* 172:4637-4645 (2004)
- Quayle A Porter EM, Nussbaum AA, Wang YM, Brabec C, Yip KP, Mok SC: **Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract.** *Am J Pathol* 152:1247-1258 (1998)
- Rennekampff H-O, Hansbrough JF, Kissing V, Doré C, Sticherling M, Schröder J-M: **Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing.** *J Surg Res* 93:41-54 (2000)
- Rescigno M, Citterio S, Thèry C, Rittig M, Medaglini D, Pozzi G, Amigorena S, Ricciardi-Castagnoli P: **Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization,**

- and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5229-34 (1998)
- Rich BE, Kupper TS: Cytokines: **IL-20 – a new effector in skin inflammation.** *Curr Biol* 11:R531-R534 (2001)
- Riches DWH: **Macrophage involvement in wound repair, remodelling and fibrosis.** *The molecular and cellular biology of wound repair 2<sup>nd</sup> ed.* (RAF Clark ed.), New York, London, Plenum 95-141 (1996)
- Roberts TL, Sweet MJ, Hume DA, Stacey KJ: **Cutting edge: Species specific TLR9-mediated recognition of CpG and Non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides.** *J Immunol* 174:605-608 (2005)
- Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Bererd F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas J-F: **Allergic contact dermatitis.** *Eur J Dermatol* 14:284-295 (2004)
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T: **Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.** *Immunol Rev* 182:18-32 (2001)
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: **Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.** *Annu Rev Immunol* 22:745-763 (2004)
- Sano K, Shirota H, Terui T, Hattori T, Tamura G: **Oligodeoxynucleotides without CpG motifs work as adjuvant for the induction of Th2 differentiation in a sequence-independent manner.** *J Immunol* 170:2367-2373 (2003)
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S: **Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses.** *Nat Immunol* 6:1087-1095 (2005)
- Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C: **Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands.** *Nat Immunol* 2:1133-1137 (2001)

- 
- Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G, Addicks K, Israel A, Rajewsky K, Pasparakis M: **NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti.** *Mol Cell* 5:981-992 (2000)
- Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R: **Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adapter protein MyD88.** *Curr Biol* 10:1139-1142 (2000)
- Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA: **Epithelial Antibiotics Induced at Sites of Inflammation.** *Science* 267:1645-1648 (1995)
- Schulz A, Kluver E, Schulz-Maronde S, Adermann K: **Engineering disulfide bonds of the novel human beta-defensins hBD-27 und hBD-28: differences in disulfide formation and biological activity among human beta-defensins.** *Biopolymers* 80:34-49 (2005)
- Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB Jr: **Discovery of five conserved  $\beta$ -defensin gene clusters using a computational search strategy.** *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2129-2133 (2002)
- Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH, Cullor JS: **Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils.** *J Biol Chem* 268:6641-6648 (1993)
- Selsted ME: **Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins.** *Curr Prot Pept Sci* 5:365-371 (2004)
- Sen R, Baltimore D: **Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequence.** *Cell* 46:705-716 (1986)
- Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ: **Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA.** *J Immunol* 165:4165-4173 (2000)
- Shapiro L, Dinarello CA: **Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro.** *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12230-12234 (1995)

- 
- Shi F, Hoekstra D: **Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense.** *J Contr Release* 97:189-209 (2004)
- Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K, Ghosh S: **TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo.** *Genes Dev* 19:2668-2681 (2005)
- Shirota H, Gursel M, Klinman DM: **Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN $\gamma$  and IL-12 mediated signaling.** *J Immunol* 173:5002-5007 (2004)
- Shirota H, Gursel I, Gursel M, Klinman DM: **Suppressive oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock.** *J Immunol* 174:4579-4583 (2005)
- Smith FW, Feigon J: **Quadruplex structure of Oxytricha telomeric DNA oligonucleotides.** *Nature* 356:164-8 (1992)
- Smith FW, Schultze P, Feigon J: **Solution structures of unimolecular quadruplexes formed by oligonucleotides containing Oxytricha telomere repeats.** *Structure* 3:997-1008 (1995)
- Sonoda Y, Kasahara T, Yamaguchi Y, Kuno K, Matsushima K, Mukaida N: **Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation.** *J Biol Chem* 272:15366-15372 (1997)
- Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T: **Differential regulation of  $\beta$ -defensin expression in human skin by microbial stimuli.** *J Immunol* 174:4870-4879 (2005)
- Staros EB: **Innate immunity: new approaches to understanding its clinical significance.** *Am J Clin Pathol* 123:305-312 (2005)
- Stein B, Baldwin AS Jr: **Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B.** *Mol Cell Biol* 13:7191-7198 (1993)

- 
- Stein CA, Subasinghe C, Shinozuka K, Cohen JS: **Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides.** *Nucl Acids Res* 16:3209-3221 (1988)
- Stein M, Bernd A, Ramirez-Bosca A, Kippenberger S, Holzmann H: **Measurement of anti-inflammatory effects of glucocorticoids on human keratinocytes in vitro (comparison of normal human keratinocytes with the keratinocyte cell line HaCaT).** *Drug Res* 47:1266-1270 (1997)
- Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, Marks RM: **Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS and IL-1 beta.** *Science* 243:1467-1469 (1989)
- Sun SC, Faye I: **Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor kappaB.** *Eur J Biochem* 204:885-892 (1992)
- Sundkötter C, Steinbrink K, Boebeler M, Bhardwaj R, Song C: **Macrophages and angiogenesis.** *J Leukoc Biol* 55:410-422 (1994)
- Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM: **Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides.** *J Immunol* 162:6284-6293 (1999)
- Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC: **Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4.** *Nature* 416:750-754 (2002)
- Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB: **TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway.** *J Mol Biol* 326:105-115 (2003)
- Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y: **Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein.** *FEBS Lett* 508:484-488 (2001)
- Takeda K, Kaisho T, Akira S: **Toll-like receptors.** *Annu Rev Immunol* 21:335-376 (2003)

- Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM: **Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells.** *J Immunol* 167:3555-3558 (2001)
- Tang YQ, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted ME: **A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leucocytes by the ligation of two truncated  $\alpha$ -defensins.** *Science* 286: 498-502 (1999)
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI: **Monocyte chemotactic activity of defensin from human neutrophils.** *J Clin Invest* 84:2017-2020 (1989)
- Thomas KM, Pyun HY, Navarro J: **Molecular cloning of the fMet-Leu-Phe receptor from neutrophils.** *J Biol Chem* 265:20061-20054 (1990)
- Thomas KM, Taylor L, Navarro J: **The interleukin-8 receptor is encoded by a neutrophil-specific cDNA clone, F3R.** *J Biol Chem* 266:14839-14841 (1991)
- Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL: **Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes.** *J Immunol* 144:2609-2613 (1990)
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T: **Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity.** *J Natl Cancer Inst* 72:955-962 (1984)
- Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T, Yamamoto S: **Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of Mycobacterium bovis BCG induce interferons and activate natural killer cells.** *Microbiol Immunol* 36:55-66 (1992)
- Tonkinson JL, Stein CA: **Patterns of intracellular compartmentalization, trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells.** *Nucl Acid Res* 22:4268-4275 (1994)

- 
- Tran D, Tran PA, Tang YQ, Yuan J, Cole T, Selsted ME: **Homodimeric  $\theta$ -defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities and bacterial binding properties of the cyclic peptides.** *J Biol Chem* 277: 3079-3084 (2002)
- Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I: **NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation.** *J Leukoc Biol* 71:154-162 (2002)
- Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I: **Modulation of human beta-defensin-2 transcription in pulmonary epithelial cells by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear phagocytes via proinflammatory cytokine production.** *J Immunol* 170:4226-4236 (2003)
- Valore EV, Ganz T: **Posttranslational Processing of Defensins in Immature Human Myeloid Cells.** *Blood* 79:1538-1544 (1992)
- Vankeerberghen A, Nuytten H, Dierickx K, Quirynen M, Cassiman JJ, Cuppens H: **Differential induction of human beta-defensin expression by periodontal commensals and pathogens in periodontal pocket epithelial cells.** *J Periodontol* 76:1293-1303 (2005)
- Varfolomeev EE, Ashkenazi A: **Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?** *Cell* 116:491-497 (2004)
- Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM: **Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs.** *J Immunol* 166:2372-2377 (2001)
- Vollmer J, Janosch A, Laucht M, Ballas ZK, Schetter C, Krieg AM: **Highly immunostimulatory CpG-free oligodeoxynucleotides for activation of human leukocytes.** *Antisense Nucl Acid Drug Dev* 12:165-175 (2002)
- Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM: **Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities.** *Eur J Immunol* 34:251-262 (2004)
- Wajant H, Scheurich P : **Tumor necrosis factor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling.** *Int J Biochem Cell Biol* 33 :19-32 (2001)

- 
- Wang W, Cole AM, Hong T, Waring AJ, Lehrer RI: **Retrocyclin, an antiretroviral theta-defensin, is a lectin.** *J Immunol* 170:4708-4716 (2003)
- Wang X, Zhang Z, Louboutin J-P, Moder C, Weiner DJ, Wilson JM: **Aiway epithelia regulate expression of human  $\beta$ -defensin 2 through toll-like receptor 2.** *FASEB J* 17:1727-1729 (2003)
- Wang Y, Patel DJ: **Solution structure of the *Oxytricha* telomeric repeat d[G4(T4G4)3] G-tetraplex.** *J Mol Biol* 251:76-94 (1995)
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF: **NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium.** *Infect Immun* 72:5750-5758 (2004)
- Wershil BK, Walker WA: **The mucosal barrier, IgE-mediated gastrointestinal events, and eosinophilic gastroenteritis.** *Gastroenterol Clin N Am* 21:387-404 (1992)
- White MV, Yoshimura T, Hook W, Kaliner MA, Leonard EJ: **Neutrophil attractant/activation protein 1 (NAP-1) causes human basophil histamine release.** *Immunol Lett* 22:151-154 (1989)
- Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E: **Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 248:904-909 (1998)
- Wu GD, Lai EJ, Huang N, Wen X: **Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor.** *J Biol Chem* 272:2396-2403 (1997)
- Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W: **Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human  $\beta$ -defensin 3.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8880-8885 (2003)

- Yamada H, Gursel I, Takeshita F, Conover J, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita S, Klinman DM: **Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation.** *J Immunol* 169:5590-5594 (2002)
- Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Tokunaga T: **Lipofection of synthetic oligodeoxyribonucleotide having a palindromic sequence of AACGTT to murine splenocytes enhances interferon production and natural killer activity.** *Microbiol Immunol* 38:831-836 (1994)
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S: **TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling.** *Mol Immunol* 40:861-868 (2004)
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ: **Beta-defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6.** *Science* 286:525-528 (1999)
- Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ: **Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37).** *J Leukoc Biol* 69:691-697 (2001)
- Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ: **Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense.** *Annu Rev Immunol* 22:181-215 (2004)
- Yoshimura T, Matsushima M, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ: **Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines.** *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9233-9237 (1987)
- Zasloff MA: **Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor.** *Proc Natl Acad Sci* 84:5449-5453 (1987)
- Zeuner RA, Ishii KJ, Lizak MJ, Gursel I, Yamada H, Klinman DM, Verthelyi D: **Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive oligodeoxynucleotides.** *Arthritis Reum* 46:2219-2224 (2002)

- Zhang JY, Tao S, Kimmel R, Khavari PA: **CDK4 regulation by TNFR1 and JNK is required for NF-kappaB-mediated epidermal growth control.** *J Cell Biol* 168:561-566 (2005)
- Zhao Q, Matson S, Herrera CJ, Fisher E, Yu H, Krieg AM: **Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides.** *Antisense Res Dev* 3:53-66 (1993)
- Zhao Q, Waldschmidt T, Fisher E, Herrera CJ, Krieg AM: **Stage-specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B-cell precursors.** *Blood* 84:3660-3666 (1994)
- Zhao Q, Temsamani J, Iadarola PL, Jiang Z, Agrawal S: **Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation.** *Biochem Pharmacol* 51:173-182 (1996)
- Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Eppenberger U, Benz CC: **The NFkB pathway and endocrine-resistant breast cancer.** *Endoc-Rel Cancer* 12:S37-S46 (2005)
- Zlotnik A, Yoshie O: **Chemokines: a new classification system and their role in immunity.** *Immunity* 12:121-127 (2000)
- Zöller N, Görg K, Mewes K, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Kippenberger S, Bernd A: **Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full thickness skin equivalent.** *Toxicol in Vitro (in press)*

## 7. Index verwendeter ODN-Sequenzen (ausfaltbar)

In der folgenden Darstellung stehen Großbuchstaben für ein Phosphorothioat-Rückgrat (PTO), Kleinbuchstaben für Phosphodiesterbindungen (PDE).

**CpG-1-PTO:** 5'- TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT -3' (20-mer)

**CpG-1-PDE „reverse“:** 5'- AAC GTC AGG AAC GTC ATG GA -3' (20-mer)

**Deletionsmutanten zu CpG-1-PTO:**

5'- TCC ATG ACG TTC CTG ACG T -3' (19-mer)

5'- TCC ATG ACG TTC CTG ACG -3' (18-mer)

5'- TCC ATG ACG TTC CTG A -3' (16-mer)

5'- CAT GAC GTT CCT -3' (12-mer)

**CpG-9-PTO:** 5'- GAC GTT -3' (6-mer)

**CpG-14C-1:** 5'- tcc tcg acg tcc ctg a -3' (16-mer)

**CpG-14C-2:** 5'- Tcc tcg acg tcc ctg A -3' (16-mer)

**CpG-14C-3:** 5'- TCc tcg acg tcc ctG A -3' (16-mer)

**CpG-14C-4:** 5'- TCC tcg acg tcc cTG A -3' (16-mer)

**CpG-14C-5:** 5'- TCC Tcg acg tcc CTG A -3' (16-mer)

**CpG-14C-6:** 5'- TCC TCg acg tcC CTG A -3' (16-mer)

**CpG-14C-7:** 5'- TcC tCg AcG tCc CtG A -3' (16-mer)

**Non-CpG-3-PTO:** 5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT -3' (20-mer)

**Non-CpG-4-PTO:** 5'- AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA -3' (20-mer)

**Non-CpG-5-PTO:** 5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC -3' (20-mer)

**Non-CpG-5A-PTO:** 5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC -3' (18-mer)

**Non-CpG-5B-PTO:** 5'- CCC CCC CCC CCC CCC C -3' (16-mer)

**Non-CpG-5C-PTO:** 5'- CCC CCC CCC CCC CC -3' (14-mer)

**Non-CpG-5D-PTO:** 5'- CCC CCC CCC CCC -3' (12-mer)

**Non-CpG-5G-PTO:** 5'- CCC CCC -3' (6-mer)

**Non-CpG-6-PTO:** 5'- GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG -3' (20-mer)

## 8. Publikationen

### Publikationen

Dorn A, Ludwig RJ, Bock A, Thaci D, Hardt K, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Bernd A, Kippenberger S: **Oligonucleotides suppress IL-8 in skin keratinocytes in vitro and offer anti-inflammatory properties in vivo.** *J Invest Dermatol* 127(4):846-854 (2007)

Dorn A, Kippenberger S: **Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators.** *Curr Opin Mol Ther* 10(1):10-20 (2008)

### Patentanmeldungen

DE102007020554.8: **Nukleinsäurehaltige kosmetische und/oder pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung epithelialen Deckgewebes.** (H6464)

DE102007044093.8: Titel aus Patentschutzgründen nicht angegeben. (H7680)

### Poster / Abstracts

Dorn A, Bock A, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Kippenberger S: **Oligodeoxynucleotides containing CpG dinucleotides mediate an anti-inflammatory response in epithelial cells.** 32. Jahrestagung der ADF, Innsbruck, Österreich. *Arch Dermatol Res* 296:413 (2005)

---

Dorn A, Graf R, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Aygün H, Kippenberger S, Bock A: **Anti-inflammatory effects of CpG oligo-nucleotides in skin keratinocytes and uptake in a full-thickness skin model.** 6. Jahrestagung der EuroTIDES, München (2005)

Dorn A, Bock A, Graf R, Zöller N, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Kippenberger S: **Uptake of CpG oligonucleotides in *in vitro* cultured HaCaT cells and in a full-thickness skin model.** 33. Jahrestagung der ADF, Aachen. *Exp Dermatol* 15: 251 (2006)

Dorn A, Bock A, Graf R, Zöller N, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Kippenberger S: **Monitoring of CpG oligodeoxynucleotide (ODN) uptake in cultured HaCaT keratinocytes and in a full-thickness skin model.** 67. Jahrestagung der SID, Philadelphia, USA. *J Invest Dermatol* 126:57 (2006)

Dorn A, Bock A, Mewes K, Zöller N, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Kippenberger S: **Oligodeoxynucleotide uptake in *in vitro* cultured HaCaT keratinocytes and in a full-thickness skin model.** 36. Jahrestagung der ESDR, Paris, Frankreich (2006)

Dorn A, Bock A, Ludwig RJ, Thaci D, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Bernd A, Kippenberger: **Oligonucleotides cause IL-8 suppression in skin keratinocytes *in vitro* and show anti-inflammatory effects *in vivo*.** 34. Jahrestagung der ADF, Freiburg. *Exp Dermatol* 16:276 (2007)

### Vortrag

Dorn A, Bock A, Ludwig RJ, Thaci D, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Bernd A, Kippenberger: **Oligonucleotides cause IL-8 suppression in skin keratinocytes *in vitro* and show anti-inflammatory effects *in vivo*.** 34. Jahrestagung der ADF, Freiburg. *Exp Dermatol* 16:276 (2007)

## 9. Danksagung

✦ Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Bereiter-Hahn für die Betreuung dieser Arbeit; der trotz seiner anspruchsvollen Aufgabe als Vizepräsidenten der Universität Zeit für Diskussionen und wissenschaftliche Ratschläge fand und die Erstellung des Gutachtens für diese Arbeit vornahm.

✦ Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Stefan Kippenberger für die Erstellung des Zweitgutachtens; vor allem jedoch für die engagierte und trotz mancher Tiefe immer rückenstärkende und durchaus humorvolle Betreuung meiner Arbeit; der immer Zeit für wissenschaftliche, aber auch persönliche und philosophische Diskussionen fand. Ich werde zukünftig immer an ihn denken, wenn ich Mais esse...

✦ Außerdem danke ich Herrn Professor August Bernd für die wissenschaftlichen Diskussionen zu meiner Arbeit, die sehr herzliche Arbeitsatmosphäre in seinem Labor und die Ermöglichung der Teilnahme an vielen interessanten Tagungen.

✦ Auch bei Herrn Professor Kaufmann möchte ich mich für die Bereitstellung des Laborplatzes und die wissenschaftlichen Ratschläge bedanken.

✦ Zudem danke ich Herrn Dr. Andreas Bock und dem übrigen Phenion-Projekt-Team, besonders Herrn Werner Bartmann, für die nette Kooperation. Insbesondere danke ich zudem Frau Andrea Wilke für die aus diesem Projekt entstandene wunderbare Freundschaft.

✦ Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Ralf Ludwig, Frau Dr. Jeanette Pfeffer, Frau Dr. Petra Schultze-Johann und Frau Katja Hardt für die Unterstützung bei der Durchführung der Maus-Versuche.

✦ Weiterhin danke ich Herrn Professor Deghani, der mich unglaublich nett und hilfsbereit am CLSM betreute und bei Fragen und neuen Einstellungen immer mit Rat und Tat zur Stelle war.

✦ Auch den Mitarbeiterinnen des B-Labors, besonders Stephanie Hoffmann und Maike Schultz, möchte ich für ihren praktischen Rat und die

persönlichen Gespräche über den Laboralltag hinaus danken; sowie Monika Stein für viele nette Diskussionen über Methoden-Optimierungen.

✦ Zudem danke ich meinen Mit-Doktoranden Dr. Matthias Hofmann, Nadja Zöller, Julijana Ivošević-Žaper und Jadranka Dujić für ihre positive Unterstützung, wissenschaftlichen Diskussionen und viele schöne Erinnerungen an verschiedene Tagungen. Besonders Nadja möchte ich danken, die mir viele Hautmodelle und das nötige Know-How dazu zur Verfügung stellte; und Matthias, der bei jeglichen Fragen immer ein offenes Ohr und gute Ratschläge hatte und der mich mal eben mit dem Auto nach New York fuhr.

✦ Ein ganz herzlicher Dank gilt außerdem meinem Symbionten Carolin Fischer, die trotz eigener Tiefen an mich glaubte und mir den Rücken stärkte.

✦ Weiterhin danke ich meinem Bruder Mathias Dorn, der bei Computer- und Nerven-Zusammenbrüchen immer alles wieder herzauberte und meinem Enantiomer Eva Kestner, die viele Probleme teilen und diskutieren konnte, auch wenn nun andere Aufgaben auf sie warten.

✦ Des Weiteren danke ich ganz herzlich Herrn Dr. Daniel Börgel für viele persönliche Diskussionen auf dem Weg zur Promotion.

✦ Außerdem möchte ich meiner langjährigen Freundin Iris Sonntag danken, die trotz eigener Promotion immer für mich da war und mich zu Schreib-Orgien nach Heidelberg einlud. Zudem danke ich natürlich allen Freunden, die mir die Daumen drückten, mich motivierten, liebe Worte fanden oder mich ganz einfach zur Ablenkung zum Sport schleiften.

✦ Auch meinem Freund Jens-Peter Kiel möchte ich für den Glauben an mich, seine Liebe und die vielen positiven Worte – oft aus mehreren tausend Kilometern Entfernung – ganz besonders danken.

✦ Abschließend danke ich ganz herzlich meinen Eltern, die mein Studium immer unterstützt haben, mir mit viel persönlichem Rat und Tat und einem unendlichen Glauben an mich zur Seite standen. Sie legten den Grundstein für dieses Projekt.

☞ Für Klaus Malinowski, der seine eigene Promotion nie abschließen konnte ☞

## 10. Ehrenwörtliche Erklärung

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Promotionsprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, 31.01.2008

Annette Dorn

### Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die im Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität angefertigte Dissertation über

#### **Neue Wirkprinzipien im Bereich Immunmodulation / Anti-Irritation an epidermalen Zellen**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, 31.01.2008

Annette Dorn

---

## 11. Curriculum vitae

### Persönliche Daten

---

Name:	Annette Dorn
Geburtsdatum:	05.04.1979 in Frankfurt/Main
Eltern:	Hans-Jochen Dorn Gerda-Maria Dorn, geb. Malinowski
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Bildungsweg

---

Schule:	1985 – 1989	Westerbach Grundschule, Eschborn
	1989 – 1998	Albert-Einstein-Schule, Schwalbach a. Ts. Abitur mit der Gesamtnote 2,4.
Studium:	1998 – 2003	Studium der Biologie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt / Main. Schwerpunkte Mikrobiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie und Genetik.
Diplom:	November 2002	Mündliche Diplomprüfungen mit der Gesamtnote 1,7.
	Oktober 2003	Abschluss der Diplomarbeit mit dem Titel: „Wirkung von Fremd-DNA auf epidermale Zellen“ unter der Leitung von Prof. J. Bereiter-Hahn (Arbeitskreis Kinematische Zellforschung) des Fachbereichs Biologie und Prof. A Bernd und PD S. Kippenberger des Labors für klinische und dermatologische

Promotion: seit 12/2003

Forschung im Zentrum der Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Frankfurt, Note 2,0

„Untersuchungen zu neuen Wirkprinzipien im Bereich Immunmodulation / Anti-Irritation an epidermalen Zellen.“ Hierbei standen der Mechanismus der Oligodeoxynukleotid (ODN)-vermittelten Anti-Inflammation und das Herausarbeiten weiterer ODN-vermittelter Wirkungen auf epidermale Zellen im Vordergrund der Arbeit.

Durchgeführt wurde diese Arbeit im Labor für klinische und dermatologische Biochemie im Zentrum der Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Frankfurt unter der Leitung von Prof. A. Bernd und PD S. Kippenberger und im Arbeitskreis Kinematische Zellforschung unter der Leitung von Prof. J. Bereiter-Hahn des Fachbereichs Biowissenschaften Frankfurt / Main.

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit der Firma Phenion / Henkel GmbH & Co. KG, Düsseldorf durchgeführt.

---

### **Berufspraxis und weitere Qualifikationen**

---

Seit 01/2001

Palmengarten Frankfurt / Main

Freie Mitarbeiterin der Grünen Schule des Palmengartens. Führungen und Praktika im Palmengarten mit unterschiedlichen Themenschwerpunkten für Kindergruppen, Schulklassen und Erwachsene.

- 08-09/2001 Hessisches Landesmuseum Darmstadt, geologisch-paläontologische & mineralogische Abteilung  
Grabungsmitarbeiterin im Rahmen einer Sondergrabung in der Grube Messel.
- 2002/2003 Fachbereich Medizin, Biologie für Mediziner  
Mitarbeit als Hilfs-Wissenschaftlerin, Betreuung von Studentenpraktika, Abnahme mündlicher Kolloquien.
- 05-10/2006 *Chondrilla juncea* – Projekt der Boise State University, USA; in Kooperation mit der *National Geographic Society*  
Koordination der Probennahme in Mitteleuropa, Kartierung