

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Mechanismen der Auslösung von Zelltod bei Erkennung  
internalisierter Fremd-DNA durch das angeborene  
Immunsystem**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Wenzel

aus

Magdeburg

2012



---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Markus Rentsch  
Prof. Dr. Elfriede Nößner  
Prof. Dr. Dolories J. Schendel

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfusser  
Dr. rer. nat. Andreas Schmidt

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2012



Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Das humane Immunsystem.....	10
1.2 <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	11
1.3 Interferone.....	14
1.4 Interleukin-1 $\beta$ .....	16
1.5 Apoptosemechanismen humaner Zellen .....	16
1.5.1 Extrinsischer Apoptosesignalweg.....	17
1.5.2 Intrinsischer Apoptosesignalweg.....	18
1.5.3 Die apoptotische Endstrecke.....	18
1.6 Pyroptose.....	20
1.7 Fragestellung .....	22
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1. Geräte und Materialien .....	24
2.1.1 Geräte.....	24
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.1.3 Reagenziensätze .....	26
2.1.4 Materialien und Medien für die Zellkultur.....	26
2.1.5 Zytokine und Antikörper .....	27
2.1.6 Oligonukleotide und Viren .....	27
2.1.7 Puffer .....	28
2.2 Zellgewinnung und –kultur .....	29
2.2.1 Zellkultur und Zellkulturmedien .....	29
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität .....	29
2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen .....	29
2.3 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	31
2.4 <i>Western blot</i> .....	31
2.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	31
2.4.2 Proteinanalyse mittels <i>Western blot</i> .....	32
2.5 Quantitative <i>real-time</i> -PCR (rt-PCR) .....	32
2.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	32
2.5.2 Durchführung der rt-PCR .....	33
2.6 <i>CellTiter-Blue</i> Zellviabilitäts-Assay .....	34
2.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	34

2.6.2 Durchführung des <i>CellTiter-Blue</i> <sup>®</sup> Zellviabilitäts-Assays .....	35
2.7 Durchflusszytometrische Zellanalyse (FACS) .....	36
2.7.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	36
2.7.2 Zelltodbestimmung mittels FACS-Analyse.....	37
2.8 <i>Small interfering</i> RNA (siRNA) .....	37
2.8.1 Allgemeines Funktionsprinzip.....	37
2.8.2 Erstellung und Anwendung von siRNA.....	38
2.9 Statistische Analyse.....	39
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1 Fremd-DNA induziert in nicht-myeloiden Zellen Apoptose	
unabhängig vom Interferonnetzwerk .....	40
3.1.1 Transfizierte Fremd-DNA induziert Zelltod.....	40
3.1.2 Der durch Transfektion von Fremd-DNA induzierte Zelltod ist	
abhängig von Caspasen .....	43
3.1.3 Die Zelltodinduktion durch transfizierte Fremd-DNA geschieht	
unabhängig vom Interferonsystem .....	44
3.2 Rolle bekannter zytoplasmatischer DNA-Rezeptoren bei Zelltodinduktion	
durch Fremd-DNA oder DNA-Virus .....	46
3.2.1 Nicht-myeloide Zellen exprimieren kein vollständiges	
Aim2-Inflammasom .....	46
3.2.2 Transfizierte Fremd-DNA induziert in nicht-myeloiden Zellen	
Apoptose unabhängig von Aim2 und DAI/ZBP1 .....	48
3.2.3 Myeloide und nicht-myeloide Zellen im Vergleich bei Transfektion	
von Fremd-DNA .....	51
3.2.4 Myeloide und nicht-myeloide Zellen im Vergleich bei Infektion	
mit MVA-Virus .....	52
3.3 Rolle des Mitochondriums bei Stimulation mit Fremd-DNA oder MVA-	
Virus in nicht-myeloiden Zellen .....	54
3.3.1 Transfizierte Fremd-DNA verursacht mitochondriale Apoptose .....	54
3.3.2 Fremd-DNA und MVA-Virus verursachen Apoptose in Abhängigkeit	
von Bax und Apaf-1.....	56
3.4 Rolle des DNA-Schadenerkennungssystems bei Apoptose durch	
zytoplasmatische Fremd-DNA oder MVA-Virus.....	60
3.4.1 p53 vermittelt den durch transfizierte DNA oder MVA-Virus	
induzierten Zelltod.....	60

---

3.4.2 ATM/ATR-Signalwege kontrollieren den durch transfizierte DNA oder MVA-Virus induzierten Zelltod .....	62
<b>4. Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1 Ergebnisübersicht.....	64
4.2 Ergebnisinterpretation.....	65
4.3 Offene Fragen .....	71
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme</b>	<b>82</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>9. Veröffentlichungen</b>	<b>86</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Der menschliche Organismus sieht sich der kontinuierlichen Gefährdung ausgesetzt, durch die Invasion pathogener Mikroorganismen seine körperliche Integrität zu verlieren. Um diese Unversehrtheit gegenüber unerwünschten Eindringlingen aufrecht zu erhalten, hat sich im Laufe der Evolution ein ausgeklügeltes System zur Detektion und Bekämpfung von Krankheitserregern herausgebildet, das Immunsystem. Um sich einer Infektion stellen zu können, ist der Mensch mit einem so genannten angeborenen (Janeway and Medzhitov, 2002) als auch adaptiven Immunsystem (Litman et al., 2010) ausgestattet. Im adaptiven System spielen hierbei auf zellulärer Ebene T- sowie B-Lymphozyten, im angeborenen so genannte *antigen presenting cells* (APC's), also Makrophagen, Monozyten oder dendritische Zellen, eine herausragende Rolle. Die Interaktion dieser beiden Teile unseres Immunsystems ist komplex reguliert. Intra- und interzelluläre Signalnetzwerke müssen dabei so effizient zusammenwirken, dass eigene Körperstrukturen stets von fremden unterschieden werden können. Auch die deutlich größere Anzahl nicht-immunologischer Zellen unseres Organismus' ist mit Teilen dieses Signalnetzwerkes ausgestattet, um auf Angriffe fremder Mikroorganismen adäquat reagieren zu können.

Vereinfacht dargestellt, führt die Erkennung und zelluläre Prozessierung sogenannter PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Vance et al., 2009) oder DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) (Bianchi, 2007) zur Aktivierung einer angeborenen Immunantwort, die zum Beispiel die Produktion von Botenstoffen zur Beeinflussung der Stoffwechselaktivität einer befallenen Zelle sowie die Ausschüttung dieser Moleküle beinhaltet, um benachbarte Zellen zu alarmieren. Die angeborene Immunität stellt die vorderste Abwehrreihe gegen Eindringlinge dar, die häufig auf unseren zellulären Stoffwechsel angewiesen sind und sich potentiell von Zelle zu Zelle schließlich im gesamten Körper ausbreiten können. Es gilt demnach im Interesse des Wirts, diesen Prozess schnellstmöglich einzudämmen. Nicht selten wählt eine infizierte Zelle hierfür selbst den "Freitod", um dem eindringenden Keim die Invasion des Körpers zu erschweren. Hierbei werden durch den Tod und den Zerfall der Zelle wiederum umgebende Zellen alarmiert.

Essentiell für eine effiziente Immunantwort ist im Zuge der Aktivierung des angeborenen Immunsystems die Präsentation von mikrobiellen Antigenstrukturen durch spezialisierte Zellen wie dendritischen Zellen oder Makrophagen (Ramachandra et al., 2009). Diese stellen nach der phagozytotischen Aufnahme solcher Strukturen jene mittels spezieller Membranproteine an ihrer Zelloberfläche zur Schau und aktivieren auf diese Weise das adaptive Immunsystem. Dies wiederum hat durch die Aktivierung von T-Zellen, der durch B-Zellen vermittelten Produktion von Antikörpern und weiteren Botenstoffen eine schließlich konzertierte Aktion des angeborenen wie adaptiven Immunsystems und schlussendlich die ultimative Beseitigung des feindlichen Keims zur Folge.

## **1.2 *Pattern-recognition*-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems**

Um PAMPs erkennen zu können, bedarf es bestimmter Rezeptoren, so genannter PRRs (*pattern recognition receptors*). Wirbeltiere haben zur Detektion von Mikroben ein ganzes Arsenal extra- und intrazellulärer Mustererkennungsrezeptoren entwickelt (Hansen et al., 2011; Kumagai and Akira, 2010; Meylan et al., 2006). Anhand ihrer molekularen Struktur kann man sie in verschiedene Rezeptorfamilien einteilen.

Zellmembrangebundene oder endosomale TLRs (*Toll-like receptors*) (Beutler, 2005; Kumagai and Akira, 2010; Takeda and Akira, 2007) detektieren beispielsweise azetylierte Lipopeptide, Lipopolysaccharide oder verschiedene mikrobielle Nukleinsäuren. Ihnen gemeinsam sind leucinreiche Domänen, die eine Plattform zur Bindung pathogener Antigenstrukturen bilden. Zytosolische RLHs (*RIG-I-like helicases*) (Takeuchi and Akira, 2008; Yoneyama and Fujita, 2009) besitzen RNA-bindende Abschnitte sowie sogenannte CARD-Interaktionsdomänen (*caspase activating and recruitment domain*) und erkennen virale RNA. Eine weitere Familie von Mustererkennungsrezeptoren stellen die intrazellulären NLRs (*NOD-like receptors*) (Franchi et al., 2009; Fritz et al., 2006) dar. Jene werden z.B. durch Peptidoglykane oder Flagellin aktiviert, auch aber durch *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) (Bianchi, 2007) wie Silica- oder Cholesterin-Kristalle (Düwell et al., 2010; Hornung et al., 2008).

NLRs, der bekannteste unter ihnen Nalp3 (NACHT, LRR *and* PYD *domain-containing protein 3*), bilden sogenannte proinflammatorische Caspase-1-Inflammasom-Komplexe (Lamkanfi and Dixit, 2009; Martinon et al., 2009). Auch andere PRRs können Caspase-1-Inflammasome bilden (Alnemri, 2010). Hier sei der kürzlich identifizierte zytosolische DNA-Rezeptor Aim2 (*absent in melanoma 2*), ein Mitglied der HIN200 Proteinfamilie (Landolfo et al., 1998), aufgeführt, der neben DAI/ZBP1 (*DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors / Z-DNA binding protein 1*) (Takaoka et al., 2007) erst zweite identifizierte Rezeptor zytosolischer Fremd-DNA (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009). Aim2 war in dieser Promotionsarbeit Gegenstand intensiver Untersuchung. Die Erkennung von PAMPs mittels PRRs führt zu mannigfaltigen Prozessen in unterschiedlichen Zellen, darunter von großer Bedeutung die Produktion der Zytokine Interferon und Interleukin-1 $\beta$  sowie die Induktion verschiedenartiger Zelltodformen. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht der wichtigsten, bis zum Abschluss der experimentellen Phase dieser Promotion identifizierten PRRs des Menschen (Kumagai and Akira, 2010; Kumar et al., 2011; Sharma and Fitzgerald, 2011)

<b>Rezeptorfamilie bzw. -name</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>PAMPs</b>	<b>Aktivierter Signalweg</b>
<b>TLRs</b>			
TLR1 - TLR2	Zelloberfläche	Triacyl-Lipopeptide	MyD88-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B
TLR2 - TLR6	Zelloberfläche, Endosom	Diacyl-Lipopetide	MyD88-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B
TLR3	Endosom	Poly(I:C)	TRIF abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF3
TLR4	Zelloberfläche	Lipopolysaccharide	MyD88-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und TRIF abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF3
TLR5	Zelloberfläche	Flagellin	MyD88-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B
TLR7 - TLR8	Endolysosom	ssRNA	MyD88 abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRFs
TLR9	Endolysosom	dsDNA	MyD88-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRFs
<b>RLRs</b>			
RIG-I	Zytoplasma	dsRNA mit 5'-Triphosphat	MAVS-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRFs und Inflammasom-Aktivierung
MDA5	Zytoplasma	dsRNA	MAVS-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRFs
LGP2	Zytoplasma	Unbekannt	RLR-Regulierung

<b>NLRs</b>			
NOD1	Zytoplasma	iE-DAP	RIP2-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen
NOD2	Zytoplasma	MDP	RIP2-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen
NALP1	Zytoplasma	MDP	Inflammasom-Aktivierung
NALP3	Zytoplasma	Kristalle, Toxine, mikrobielle RNA/DNA, ATP, Pilze, $\beta$ -Glucane u. a.	Inflammasom-Aktivierung
NLRC4	Zytoplasma	Flagellin	Inflammasom-Aktivierung
<b>Andere</b>			
DAI	Zytoplasma	dsDNA	Aktivierung von IRFs
Aim2	Zytoplasma	dsDNA	Inflammasom-Aktivierung
RNA-Polymerase III	Zytoplasma	dsDNA	RLR-Aktivierung und damit Aktivierung von IRFs

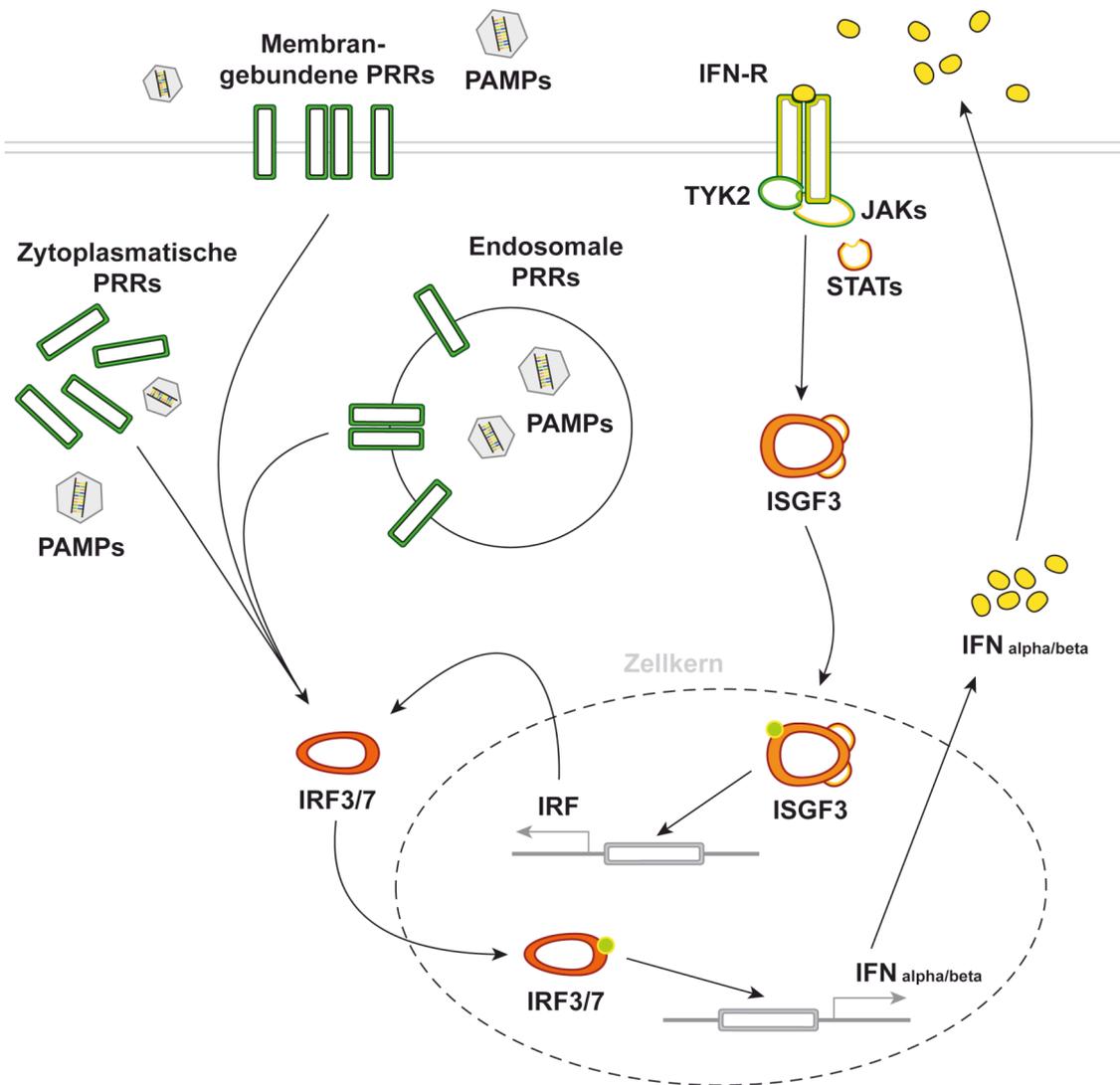
**Tabelle 1 Mustererkennungsrezeptoren des Menschen**

Übersicht über die im menschlichen Organismus vorkommenden PRRs (*pattern recognition receptors*), ihre Lokalisation, ihre jeweiligen Liganden sowie die durch Bindung des Liganden ausgelösten Signalwege.

### 1.3 Interferone

Eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr bei Infektionen spielt die Proteinfamilie der Interferone. Interferon (IFN) wurde 1957 von Isaacs und Lindenmann als ein Protein identifiziert, das bei Stimulation mit inaktivierten Influenzaviren vermehrt induziert wird (Isaacs and Lindenmann, 1957). Ihren Namen verdanken diese nur in Wirbeltieren vorkommenden Zytokine der Beobachtung, dass sie bei Hinzugabe zu mit Virus infizierten Zellen mit der viralen Replikation "interferieren". Mittlerweile sind mehr als ein Dutzend verschiedene Typ-1-Interferone bekannt, die insbesondere bei viralen Infektionen gebildet und sezerniert werden. Als alleiniger Vertreter des Typ-2-Interferon fungiert Interferon- $\gamma$  (Takaoka and Yanai, 2006).

Die große Vielfalt an biologischen Funktionen von Interferonen lassen sich grundsätzlich zu drei wichtigen, hauptsächlichen Aktivitätsfeldern destillieren: Antimikrobielle bzw. antivirale Funktion (Barber, 2001; Smith et al., 2005), antitumoröse Aktivität (Miller et al., 2009; Pasquali and Mocellin, 2010) sowie immunmodulatorische Effekte (Brierley and Fish, 2002). Sie interferieren nicht nur mit der viralen Replikation, sondern begünstigen auch die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen (Zhang et al., 1998), fördern die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten (Le Bon et al., 2001) sowie die Zytotoxizität von myeloiden Zellen oder natürlichen Killer-Zellen (Ortaldo et al., 1981) und beeinflussen Signalnetzwerke des Zellzyklus, zum Beispiel über die Regulation des Tumorsuppressorgens p53 (Der et al., 1998). Nach bisherigem Wissensstand führt die Bindung jeweiliger Liganden an TLRs, RLHs oder DAI/ZBP1 über die Aktivierung von bestimmten Transkriptionsfaktoren, sogenannten IRFs (*interferon regulatory factors*), zur Produktion von Interferon. Dieses wird daraufhin sezerniert und bindet an membranständige Interferonrezeptoren, die ihrerseits wiederum über sogenannte JAK-STAT-Signalwege zur Bildung und Aktivierung transkriptionell aktiver Komplexe wie beispielsweise ISGF3 führen (Takaoka and Yanai, 2006) (**Abbildung 1.1**). So kommt es durch den Einfluss von Interferonen zur transkriptionellen Regulation einer Vielzahl von Effektorgenen (Der et al., 1998).



**Abbildung 1.1 Das Interferonnetzwerk**

Durch den Einfluss verschiedener Signalstrukturen wie z.B. PAMPs werden durch deren Bindung zellmembrangebundene, endosomale oder zytoplasmatische Rezeptoren aktiviert, wodurch es über die verstärkte Wirkung von IRF3/7 zur vermehrten Transkription und in Konsequenz gesteigerten Sekretion von Typ-1-IFN kommt. Diese aktivieren membranständige IFN-Rs (*IFN-Receptor*), über die es via sogenannter JAK-STAT-Signalwege zur Bildung von transkriptionell aktiven Komplexen wie zum Beispiel ISGF3 kommt und damit zur Erhöhung der IRF-Transkription. Es erfolgt demnach eine positive Rückkopplung. IFN selbst reguliert die Expression verschiedenster Gene.

## 1.4 Interleukin-1 $\beta$

Die Bedeutung des in den achtziger Jahren klonierten (Auron et al., 1984), proinflammatorischen „Fieberzytokins“ Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) hat seit den ersten Beschreibungen pyrogener Zytokine vor mehr als einem halben Jahrhundert (Atkins, 1984) kontinuierlich zugenommen. Heute wird es mit einem ganzen Strauß systemisch inflammatorischer Erkrankungen, seien sie infektiöser, autoimmuner oder anderer Genese, in Verbindung gebracht (Dinarello, 2010, 2011). Die Sekretion biologisch aktiven IL-1 $\beta$  ist das Resultat zweier verschiedener Signale. Eines dieser Signale wird durch PRRs induziert und führt auf transkriptioneller Ebene zur vermehrten Produktion von Pro-IL-1 $\beta$ . Ein weiteres Signal wird durch Inflammasom-Komplexe vermittelt, das die proteolytische Spaltung von Pro-IL-1 $\beta$  in aktives IL-1 $\beta$  nach sich zieht. Die Proteolyse geschieht durch aktivierte Caspase-1, die einen essentiellen Bestandteil dieser Komplexe darstellt (Martinon et al., 2009; Martinon and Tschopp, 2004; Netea et al., 2010).

Von verschiedenen Zelltypen sezerniert, gelangt IL-1 $\beta$  über den Blutstrom zum Hypothalamus, wo es an thermoregulatorischen Einheiten wirkt und so zur Entstehung von Fieber führt. In der Peripherie führt seine Bindung an IL-1 $\beta$ -Rezeptoren über mehrere Zwischenschritte unter anderem zur Förderung der Produktion akuter Phase Proteine in der Leber. Eine weitere sehr wichtige proinflammatorische Wirkung von IL-1 $\beta$  ist sein fördernder Einfluss auf die Proliferation und Ausdifferenzierung von Immunzellen im Knochenmark (Dinarello, 1997). Schließlich führt die Produktion von aktivem IL-1 $\beta$  zur Auslösung von Pyroptose, einer erst kürzlich beschriebenen Zelltodform in myeloiden Zellen, auf die in dieser Arbeit noch weiter eingegangen werden wird.

## 1.5 Apoptosemechanismen humaner Zellen

Das apoptotische Absterben von Zellen hat sich über die evolutorische Geschichte hinweg zu einem komplexen Entscheidungssystem entwickelt, das überall im Tierreich auffindbar ist und es Zellen ermöglicht, auf bestimmte exogene und endogene Reize hin kontrolliert zu sterben. Im Gegensatz zum „unkontrollierten“, nekrotischen Zelluntergang, bei dem das Zugrundegehen der Zelle durch Schwellung und Zerplatzen eine Entzündungsreaktion hervorruft, schrumpft und zerfällt eine apoptotische Zelle in

kleinere abgeschnürte Körperchen und wird anschließend von Phagozyten beseitigt (Aslan and Thomas, 2009; Dragovich et al., 1998; Duprez et al., 2009). Apoptotischen Mechanismen kommt in vielen bioorganischen Abläufen eine große Bedeutung zu, so wäre beispielsweise die Ausdifferenzierung der Finger eines Embryos ohne kontrollierten Gewebsuntergang ebenso unmöglich wie die Beseitigung von gegen den eigenen Körper gerichteten naiven T-Lymphozyten während der Reifung in lymphatischen Organen wie dem Thymus (Montero and Hurle, 2010; Strasser et al., 2008). Eine zentrale Rolle in apoptotischen Zelltodmechanismen spielen so genannte Caspasen, eine aus Cysteinproteasen bestehende Proteinfamilie (Kumar, 2007).

Neben der Rolle in Reifungsprozessen, der Beseitigung alter oder entarteter Zellen und der Regulierung von Zellzahl und Organgröße ist Apoptose auch wichtig bei infektiösen Geschehnissen (Duprez et al., 2009; Labbe and Saleh, 2008; Lamkanfi and Dixit, 2010; Weinrauch and Zychlinsky, 1999; Williams, 1994). Virusinfizierte Zellen zum Beispiel gehen in Apoptose, um die Replikation und Verbreitung des Eindringlings zu verhindern, der hierfür die intakte Biosynthesemaschinerie der befallenen Zelle benötigt. Grundsätzlich kann eine Zelle über zwei klassischerweise in extrinsisch und intrinsisch unterteilte Signalwege Apoptose auslösen.

### 1.5.1 Extrinsischer Apoptosesignalweg

Bei extrinsischer Apoptose geschieht die Auslösung der Zelltodsignalkaskade über die Aktivierung von Rezeptoren der membranständigen Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptorfamilie, die eine intrazelluläre, zytosolische Todesdomäne besitzen (Ashkenazi, 2002; Thorburn, 2004). Eine Vielzahl von Liganden, darunter TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  oder TRAIL, führen bei der Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor zu einer Bildung eines intrazellulären, ebenfalls membranständigen sogenannten *death-inducing signaling complex* (DISC), der durch die Rekrutierung von Initiator-Caspase-8 bzw. 10 und Cofaktoren wie FADD, TRADD oder anderen Adaptermolekülen entsteht (Mace and Riedl, 2010; Peter and Kramer, 2003). An diesem Punkt kann und sollte man extrinsische Apoptose noch einmal unterteilen, da bei bestimmten Zellen (Typ 1) die Aktivierung des DISC für die definitive Initiation des Zelltods suffizient ist, bei anderen Zellen (Typ 2) jedoch nicht (Scaffidi et al., 1998). Hier geschieht die schließliche, definitive Einleitung über eine zusätzliche Aktivierung mitochondrialer Zelltodsignalwege. Dieser als *Cross-talk* bezeichnete Mechanismus zwischen

extrinsischer und intrinsischer Apoptose erfolgt zum Beispiel durch das Protein Bid, das zur proapoptotischen Subgruppe der Bcl-2-Proteinfamilie gehört und durch Caspase-8 aktiviert wird (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

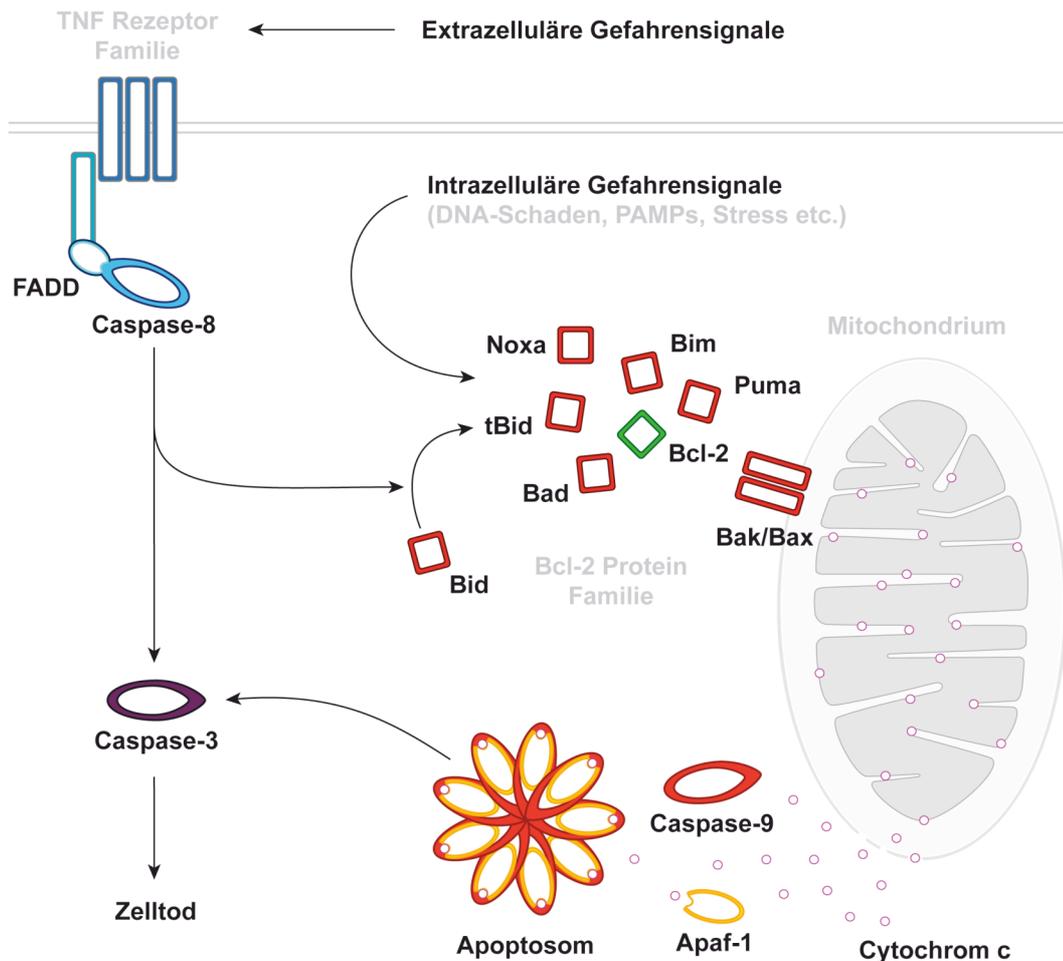
### 1.5.2 Intrinsischer Apoptosesignalweg

Im Gegensatz zum extrinsischen Apoptosesignalweg spielt bei der intrinsischen Apoptose das Mitochondrium stets eine essentiell wichtige Rolle (Aslan and Thomas, 2009). Ist die Zelle "gesund", führt der Einfluss einer Reihe von am Mitochondrium wirkenden antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 selbst oder BclXL zur Inhibition der Wirkung proapoptotischer Bcl-2-Familienangehöriger wie Bim, Bid oder Bax/Bak (Leibowitz and Yu, 2010; Youle and Strasser, 2008). In Gegenwart proapoptotischer Reize wie z.B. dem Einwirken von Strahlung, Fehlen von an der Zelle wirkenden Wachstumsfaktoren, intrazellulären Organellschäden oder mikrobiellen Eindringlingen (Aslan and Thomas, 2009; Eriksson and Stigbrand, 2010; Mollinedo and Gajate, 2003; Rudel et al., 2010) verändert sich nun das Gleichgewicht dieser entgegengesetzt wirkenden Bcl-2-Familienmitglieder zugunsten der proapoptotischen Fraktion. Dadurch werden Bax/Bak an der äußeren Mitochondrienmembran aktiviert, wobei diese Aktivierung von bestimmten Proteinen auch direkt geschehen kann (Lalier et al., 2007; Ohtsuka et al., 2004). Dieser Prozess zieht die als MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) bezeichnete Desintegration der äußeren Mitochondrienmembran nach sich (Tait and Green, 2010), wobei das Molekül Cytochrom c aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytosol gelangt. Es oligomerisiert unter ATP-Verbrauch mit dem Protein Apaf-1 zu einer Plattform, an die Initiator-Caspase-9 andocken kann. Hierdurch kommt es zur Bildung des zytosolischen, so genannten Apoptosoms (Bratton and Salvesen, 2010) (**Abbildung 1.2**).

### 1.5.3 Die apoptotische Endstrecke

Als aktiver Komplex ist das zytosolische Apoptosom des intrinsischen und der membrangebundene DISC des extrinsischen Apoptosesignalwegs in der Lage, Effektor-Caspasen, zum Beispiel Caspase-3 oder Caspase-6, zu aktivieren, was unter anderem zur Degradierung des Erbguts, Zytoskeletts und Destruktion des Biosyntheseapparats und in Konsequenz letztlich zum Tod der Zelle führt (Kumar, 2007). Hat das Signal das Mitochondrium einmal passiert, ist keinerlei Regulation des

Vorgangs durch die Bcl-2-Proteinfamilie mehr möglich, wobei es durchaus durch weitere pro- (z.B. Smac / Diablo) und antiapoptotische (z.B. IAPs) Modulatoren noch möglich ist, den bevorstehenden Zellelaxitus gegebenenfalls zu verhindern (Shi, 2002). Sind Initiator-Caspasen sowie ihr jeweils ihnen angehöriger Signalkomplex jedoch einmal aktiviert und aktivieren diese ihrerseits daraufhin die Effektor-Caspasen-3, -6 und andere, ist der Tod der Zelle vorprogrammiert.



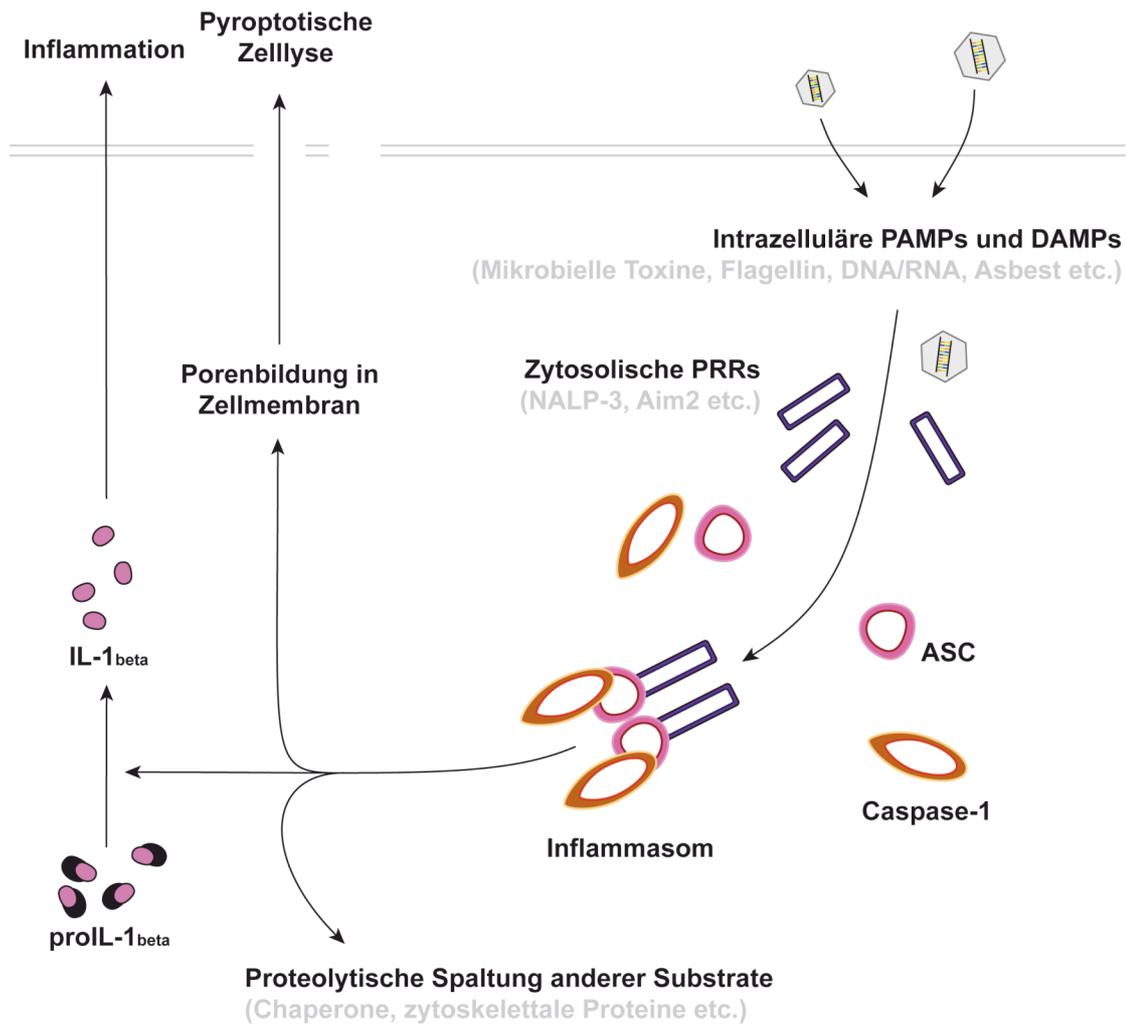
**Abbildung 1.2 Klassische Apoptosesignalkaskaden**

Durch die Anwesenheit extra- oder intrazellulärer Signalstrukturen wie z.B. PAMPs kommt es auf der einen Seite zur Aktivierung des membranständigen DISC. Dies führt neben anderem zu einer Aktivierung der Initiator-Caspase-8, die ihrerseits Caspase-3 aktiviert, aber auch andere Substrate maturiert wie z.B. Bid. Über die Aktivierung von Bid werden mitochondriale Todessignalwege getriggert. Mitochondriale Apoptose auf der anderen Seite geschieht durch Konkurrenz verschiedener pro- als auch antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie am Mitochondrium. Verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten proapoptotischer Familienmitglieder, kommt es zur Aktivierung von Bak/Bax in der äußeren Mitochondrienmembran. Dies führt zu deren Desintegration, der sogenannten MOMP und damit zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranspalt. Es kommt zur Bildung des zytosolischen, so genannten Apoptosoms, bestehend aus Initiator-Caspase-9, Apaf-1 und Cytochrom c. Das Apoptosom aktiviert schließlich Caspase-3. Die Aktivierung solcher Effektor-Caspasen führt zum unwiederbringlichen Zelltod.

## 1.6 Pyroptose

Bei Pyroptose handelt es sich um eine erst vor kürzerem, bisher ausschließlich für Monozyten, dendritische Zellen sowie Makrophagen beschriebene Zelltodform, die sich von klassischer Apoptose unterscheidet (Bergsbaken and Cookson, 2007; Bergsbaken et al., 2009; Fink and Cookson, 2006; Lamkanfi et al., 2008). Im Gegensatz zu jener ist hier die Initiation des darum auch pyroptotischer Zelltod genannten Vorgangs ausschließlich abhängig von der inflammatorischen Caspase-1 und nach bisheriger Meinung unabhängig von gängigen Initiator-Caspasen wie Caspase-8 oder -9 sowie der Effektor-Caspase-3.

Die Aktivierung von Caspase-1 geschieht durch bakterielle (Fernandes-Alnemri et al., 2010; Franchi et al., 2010; Hilbi et al., 1998; Lara-Tejero et al., 2006) und virale Einflüsse (Hornung et al., 2009; Ichinohe et al., 2009; Poeck et al., 2010; Rathinam et al., 2010) sowie durch Gefahrensignale (Düwell et al., 2010; Hornung et al., 2008; Petrilli et al., 2007). Diese PAMPs oder DAMPs induzieren die durch eine Reihe verschiedener Rezeptoren vermittelte Bildung der sogenannten Inflammasome (Latz, 2009). Bisher wurden vier verschiedene, jeweilig ihrem beteiligten Rezeptor zufolge benannte, Inflammasome identifiziert. Das Nalp-1-, Nalp-2- und Nlrp4-Inflammasom (alle zugehörig zur Familie der NLRs) sowie das Aim2-Inflammasom (HIN-200 Proteinfamilie). Inflammasome rekrutieren über das Adaptorprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruit domain*) Caspase-1. Hierdurch prozessiert aktivierte Caspase-1 neben anderen Proteinen an erster Stelle das inflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  und induziert die Formation von Membranporen, durch die es zum Flüssigkeitseinstrom, zur Zellanschwellung und schließlich zur Zellyse kommt (Fink and Cookson, 2006) (**Abbildung 1.3**).



**Abbildung 1.3 Caspase-1-vermittelte Zellreaktionen**

Durch Einwirken verschiedenster Gefahrensignale wie z.B. PAMPs werden durch deren Bindung zytosolische Rezeptoren aktiviert. Durch die anschließende Rekrutierung des Adaptorproteins ASC sowie Caspase-1 bilden sich sogenannte Inflammasome. Bisher sind vier Inflammasome bekannt: Nalp-1, Nalp-3, Nlrp4- und Aim2-Inflammasom. Das aktive Inflammasom enthält aktivierte Caspase-1, die i) die Maturierung von proIL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$ , ii) die Entstehung von Membranporen und dadurch pyroptotischer Zellyse sowie iii) die Prozessierung von verschiedenen anderen Substraten wie Chaperonen, Zellskelettproteinen, glykolytischen und weiteren Proteinen bewerkstelligt.

## 1.7 Fragestellung

Bakterielle und virale RNA werden durch TLRs an Zelloberflächen und Endosomen erkannt (Takeda and Akira, 2007), RLHs detektieren zytoplasmatische, doppelsträngige Triphosphat-RNA (Schmidt et al., 2009). Hinsichtlich der zytoplasmatischen Erkennung von Fremd-DNA jedoch ist die Situation weniger geklärt. Es ist gezeigt worden, dass transfizierte nicht-CpG-DNA oder zytoplasmatisch replizierende DNA-Viren wie beispielsweise MVA (*modified vaccinia virus Ankara strain*) (Schepis et al., 2006) eine Induktion und Aktivierung von IL-1 $\beta$  (Muruve et al., 2008) sowie eine Interferonantwort hervorrufen, die von IRF-3 und dem kürzlich identifizierten Protein STING (*stimulator of interferon genes*) abhängig ist (Ishii et al., 2006; Ishikawa and Barber, 2008; Stetson and Medzhitov, 2006; Zhong et al., 2008). Bisher sind zudem mehrere zytoplasmatische DNA-Rezeptoren identifiziert worden. DAI/ZBP1 sowie RNA-Polymerase III spielen *in vitro* eine Rolle im Interferonnetzwerk, die Relevanz von DAI/ZBP1 *in vivo* bleibt jedoch bisher unklar, da Ergebnisse mit *knock-out*-Mäusen vermuten lassen, dass die Funktion bezüglich Interferonproduktion und Virusabwehr redundant ist (Ishii et al., 2008; Takaoka et al., 2007; Wang et al., 2008). Das erst kürzlich als DNA-Sensor identifizierte Protein Aim2 scheint in myeloiden Zellen bezüglich der Erkennung zytoplasmatischer Fremd-DNA nicht nur für die Produktion und Maturierung von IL-1 $\beta$ , sondern auch für die durch Transfektion von Fremd-DNA oder DNA-Virusinfektion verursachte Induktion von Zelltod eine gewichtige Bedeutung zu haben (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009).

Die Untersuchungen im Hinblick auf die eben beschriebene Zelltodinduktion beschränken sich bisher allerdings weitestgehend auf myeloide Zellen. Dort zeigt sich der durch transfizierte Fremd-DNA oder Infektion mit MVA verursachte Zelltod als vom Aim2-Inflammasom abhängig und wird als Pyroptose qualifiziert (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009). Diese läuft nach derzeitigem Wissensstand unabhängig von Caspase-3 ab. Roberts et al. berichten jedoch von einer Aktivierung von Caspase-3 bei zytoplasmatischer Anwesenheit von Fremd-DNA in Makrophagen (Roberts et al., 2009). Die Kenntnislage der genauen Zelltodmechanismen bleibt bereits in myeloiden Zellen somit kontrovers. Noch weit weniger klar sind die Mechanismen der Zelltodinduktion durch zytosolische Fremd-DNA in nicht-myeloiden Zellen, die den Großteil der Zellen unseres Körpers ausmachen. Als Epithel-, Endothel-

und Hautzellen sind sie im Rahmen bakterieller und viraler Infektionen jedoch häufig erstes Angriffsziel.

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es daher, zu klären, ob und welche Zelltodmechanismen durch zytosolische Fremd-DNA in nicht-myeloiden Zellen ausgelöst werden. Hierfür wurden folgende grundsätzliche Fragen untersucht:

- Sterben nicht-myeloide Zellen in Anwesenheit fremder, zytosolischer DNA?
- Wenn ja, hängt der Zelltod mit der bereits bekannten Aktivierung des Interferonsystems zusammen?
- Besitzen nicht-myeloide Zellen die nötige Proteinausstattung für den in Makrophagen als Antwort auf zytosolische DNA beschriebenen pyroptischen Zelltod?
- Falls der Zelltod in nicht-myeloiden Zellen unabhängig von Pyroptose erfolgt, welche anderen Zelltodsignalwege werden durch zytosolische Fremd-DNA oder DNA-Virusinfektion aktiviert?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Geräte

Alpha Imager ( <i>gel documentation</i> )	Alpha Innotech, San Leandro, USA
Zellkultur CO <sub>2</sub> Inkubator (BD 6220)	Heraeus, Hanau, Germany
Zellkultur <i>laminar flows</i>	Heraeus, Hanau, Germany
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Germany
FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Gelelektrophorese-Systeme	Bio-RAD, Hercules, USA
LAS-4000mini <i>luminescent image analyzer</i>	Fuji Film, Tokyo, Japan
Light Cycler 480 II	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
Mithras LB940 multilabel plate reader	Berthold Tech., Bad Wildbad, Germany
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, Germany
Nanodrop ND-1000	NanoDrop, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Germany
pH-Meter	WTW, Weilheim, Germany
Power Supply 200/2.0	Bio-RAD, Hercules, USA
Kühl-, Gefrierschränke (4°C, -20°C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Germany
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Shaker	NeoLab, Heidelberg, Germany
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Germany
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Germany
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Staufen, Germany

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Germany
Agarose LE	Biozym, Hess. Oldendorf, Germany
Annexin <i>binding buffer</i> (10x)	BD Biosciences, San Diego, USA
Annexin-V-FLUOS	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth, Karlsruhe, Germany
Aqua ad injectabilia	Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
Blot Paper extra thick	Bio-RAD, Hercules, USA

Koffein	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
CellTiter-Blue <i>cell viability reagent</i>	Promega, Madison, USA
Chymostatin	EMD Biosciences, La Jolla, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
DreamFect <i>transfection reagent</i>	OZ Biosciences, Marseille Cedex, France
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Germany
ECL WB <i>detection reagents</i>	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
FACSFlow, FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
GeneJuice <i>transfection reagent</i>	Novagen, San Diego, USA
Immobilion PVDF Membran (0,2µm)	Millipore, Billerica, MA, USA
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke Innenstadt, LMU Munich
Lämmli <i>sample buffer</i>	Bio-RAD, Hercules, USA
Leupeptin, Hemisulfat	EMD Biosciences, La Jolla, USA
Lipofectamine 2000 <i>reagent</i>	Invitrogen, San Diego, USA
Lipofectamine RNAiMAX <i>reagent</i>	Invitrogen, San Diego, USA
Milchpulver ( <i>blotting grade</i> )	Roth, Karlsruhe, Germany
Natriumfluorid (NaF)	Roth, Karlsruhe, Germany
Natrium Chlorid (NaCl 0.9%)	Baxter S. A., Lessines, Belgium
NuPage Novex Bis-Tris <i>gels</i>	Invitrogen, San Diego, USA
NuPage MES SDS <i>running buffer</i> (20x)	Invitrogen, San Diego, USA
NuPage <i>transfer buffer</i> (20x)	Invitrogen, San Diego, USA
OptEIA <i>substrate reagent</i>	BD Biosciences, San Diego, USA
pcDNA3 Leervektor	Addgene, Cambridge, USA
PMSF (Phenylmethanesulfonylfluorid)	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
Poly(dA) • Poly(dT)	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
Poly(dA-dT) • Poly(dA-dT)	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
Pepstatin A, synthetisch	EMD Biosciences, La Jolla, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2N)	Apotheke Innenstadt, LMU München
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> , 10%)	Roth, Karlsruhe, Germany
Staurosporin (streptom. sp., >95% HPLC)	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
TEMED	Roth, Karlsruhe, Germany
Trypan Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Austria
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Germany

### 2.1.3 Reagenziensätze

High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
Human IL-1 $\beta$ ELISA	eBioscences, San Diego, USA
LightCycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
OptEIA Human IP-10 ELISA Set	BD Bioscences, San Diego, USA
Protoscript First Strand cDNA Synth. Kit	NewEngland BioLabs, Ipswich, USA
Universal Probe Library Set, human	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany

### 2.1.4 Materialien und Medien für Zellkultur

$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
DMEM, <i>high glucose</i>	PAA, Pasching, Austria
Fetales Kälber Serum (FCS)	GibcoBRL (invitrogen), Karlsruhe, Germany
Hank's <i>balanced salt solution</i> (HBSS)	PAA, Pasching, Austria
Insulin sol. ( <i>bovine pancreas</i> , 10 mg/ml)	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
Leibotiz' L-15 Medium	PAA, Pasching, Austria
L-Glutamin 200mM	PAA, Pasching, Austria
MCDB153 Medium Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
MEM-NEAA (nicht essentielle AS)	GibcoBRL (invitrogen), Karlsruhe, Germany
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Austria
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	PAA, Pasching, Austria
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Austria
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, Austria
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, Germany

#### MCDB153 Medium

17,6 g MCDB153 in 900 ml ddH<sub>2</sub>O  
 15,7 ml 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>  
 pH 7,4 einstellen (mit NaOH)  
 ad 1000 ml ddH<sub>2</sub>O

#### 1205Lu Medium

400 ml MCDB153 Medium (80 %)  
 100 ml L-15 Leibovitz' Medium (20 %)  
 10 ml FCS (2 %)  
 0,5 ml Insulin (5  $\mu$ g/ml)  
0,42 CaCl<sub>2</sub> 2M (1,68 mM)  
 511 ml, Sterilfiltration

Kunststoffverbrauchsmaterialien für Zellkulturexperimente wurden von Becton Dickinson (Heidelberg, Germany), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, Germany), Falcon (Heidelberg, Germany), Greiner (Frickhausen, Germany), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, Germany) oder Sarstedt (Nümbrecht, Germany) gekauft.

## 2.1.5 Zytokine und Antikörper

Anti Caspase-8 (1C12) <i>mouse</i> mAb	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti Caspase-9 ( <i>human specific</i> )	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti Caspase-3 (#9662)	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti Bax (#2772)	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Anti $\beta$ -Aktin HRP <i>conjugate</i>	Santa Cruz Biotechnology, California, USA
Anti <i>mouse</i> IgG HRP <i>conjugate</i>	Promega, Madison, USA
Anti <i>rabbit</i> IgG HRP <i>conjugate</i>	Promega, Madison, USA
Humanes Interferon- $\alpha$	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany

## 2.1.6 Oligonukleotide und Viren

Alle für diese Arbeit verwendeten siRNAs wurden von Eurofins MWG Operon gekauft. Die angezeigten Sequenzen sind jeweils in 5'-3' Richtung notiert und korrespondieren mit der kodierenden Sequenz der jeweiligen Ziel-mRNA. Jeder Sequenz wurde am 3'-Ende ein Überhang von zwei Tyrosinen hinzugefügt.

si hu IRF3 (1)	CCUUCAUUGUAGAUCUGAU
si hu IRF3 (2)	CACCACCUCAACCAAUAAA
si huIFNAR	UCCUCCAGAAGUACAUUUA
si huDAI	CCAAAGCAUGGACGAUUUA
si huAim2	GCACCAUAAAGGUUAUUAA
si huCasp8	GCUCUCCGAAUUAUAGA
si huCasp9	GAUGCCUGGUUGCUUUAAU
si huApaf-1	CAGAGGCUUCCACUUAUA
si huBax	GCUCUGAGCAGAUCAUGAA
si hup53	GAAGGCAGUUAGUCCUUUA
si CO4 (control)	GCGCAUCCAGCUUACGUA

Alle in dieser Arbeit verwendeten rt-PCR-Primer wurden von Metabion synthetisiert. Die Primersequenzen wurden mithilfe eines *Assay-Design* Programms von Roche gestaltet, das gleichzeitig geeignete Primersonden der in dieser Arbeit verwendeten Sondenbibliothek errechnet ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)):

Aim2 (primer 1: caccaaaagtctctcctcatgtt; primer 2: aaacccttctctgatagattcctg; Sonde #49)  
 Apaf-1 (primer 1: ctgctgatgggtgcaaggata; primer 2: ccaataggccactagatgaatgct; Sonde #87)

ASC (primer 1: ctcaccgctaacgtgctg; primer 2: ccggctgctggctataaagtg; Sonde #81)  
 Caspase-1 (primer 1: atgcctgttcctgtgatg; primer 2: ctctttcagtgggtgggcatc; Sonde #71)  
 DAI (primer 1: gaggagtcgcagggtctg; primer 2: gacttctggattgtgtgtctgc; Sonde #36)  
 IFNAR (primer 1: ttacaccatttcgcaaagctc; primer 2: tgttccaggagagatgtgtatca; Sonde #65)  
 IRF3 (primer 1: cttggaagcacggcctac; primer 2: atccctcccgggaacata; Sonde #18)  
 p53 (primer 1: ctttccacgacggtgaca; primer 2: tcctccatggcagtgacc; Sonde #71)  
 STING (primer 1: gatattctgctggctgatcctg; primer 2: gcaggttgttgaatgctgatt; Sonde #1)

Alle stimulatorischen Oligonukleotide dieser Arbeit wurden von Sigma Aldrich gekauft:

Poly (dAdT:dAdT) Doppelsträngiges DNA-Heteropolymer, alternierend dA und dT

Poly (dA:dT) Doppelsträngiges DNA-Homopolymer, poly A- an poly T-Strang

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden freundlicherweise von der AG Prof. G. Sutter, LMU München, zur Verfügung gestellt:

MVA wt *modified vaccinia virus Ankara wildtype*

MVA  $\Delta$ F1L *modified vaccinia virus Ankara F1L Gendeletionsvariante*

## 2.1.7 Puffer

### Fixationspuffer für FACS Proben

2% PFA  
 in PBS

### TAE-Puffer (50x)

242,3 g Tris (2 M)  
 Essigsäure 57,1 ml (1 M)  
 18,61 g EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O (Titriplex III, 50 mM)  
 ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

### ELISA Coating Puffer 1

0.2 M Natrium Phosphat  
 in ddH<sub>2</sub>O  
 pH 6,5

### ELISA Coating Puffer 2

0.1 mM Natrium Carbonat  
 in ddH<sub>2</sub>O  
 pH 9,5

### ELISA Assay diluent

10 % FCS  
 in PBS  
 pH 7,0

### ELISA Waschpuffer

0.05 % Tween 20  
 in PBS

### Tris-HCl Puffer (Sammelgel)

121,4 g Tris  
 ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml  
 pH 6,8

### Tris-HCl Puffer (Laufgel)

121,4 g Tris  
 ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml  
 pH 8,8

### SDS-PAGE WB Laufpuffer (10x)

30,28g TRIS (0,25 M)  
 150,14 g Glycin (2 M)  
 10 g SDS (1 %)  
 ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml  
 pH 8,3

### Western blot Transferpuffer (semi-dry, 10x)

3,03 g TRIS (25 mM)  
 18,77 g Glycin (250 mM)  
 20 % Methanol  
 ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

Western blot Transferpuffer (wet, 10x)

3,03 g TRIS (25 mM)  
14,27 g Glycin (190 mM)  
20 % Methanol  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

Stripping Puffer (50°C, 10-30 min)

6,98 ml β-Mercaptoethanol (100 mM)  
9,85 g TRIS-HCl (62,5 mM, pH 6,7)  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

## 2.2 Zellgewinnung und –kultur

### 2.2.1 Zellkultur und Zellkulturmedien

Alle verwendeten Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einem atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % in Kultur gehalten. Als Kulturmedium wurde für Hek293 Zellen, Huh7.0 Zellen, H1339 Zellen DMEM Medium verwendet. Für alle aus Vollblut gewonnenen Zellen (periphere mononukleäre Zellen, Monozyten, aus Monozyten abgeleitete dendritische Zellen), THP1 Zellen sowie Jurkat Zellen kam RPMI bzw. VLE RPMI Medium zur Anwendung. Dem Medium wurden pro Gesamtvolumen 10 % fetales Kälberserum, 1 % L-Glutamin sowie 1 % Penicillin/Streptomycin an Volumen zugesetzt. Für die verwendeten 1205Lu Zellen wurde ein spezielles Medium, bestehend aus MCDB-Medium (17,6 g/l), NaHCO<sub>3</sub> (15,7 ml/l), Ca<sub>2</sub>Cl (2 mM), Insulin, 2 % fetalem Kälberserum und 0,5 % Penicillin/Streptomycin, hergestellt. Das Spezialmedium wurde mit Hilfe von Natronlauge auf einen pH von 7,4 eingestellt und abschließend sterilfiltriert.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Hierbei färben sich tote Zellen aufgrund der Desintegration ihrer Zellmembran im Gegensatz zu lebenden Zellen blau an. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

### 2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen

Zur Isolation peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs = *peripheral blood mononuclear cells*) wurde frisches Spenderblut von gesunden Probanden aus der Kollegschaft im Labor verwendet. Die Isolation der PBMCs erfolgte durch Dichtegradienten-

zentrifugation über *Ficoll-Hypaque*-Lösung. Die Zentrifugation führt aufgrund spezifischer Dichteunterschiede zu unterschiedlich starker Migration verschiedener Zellpopulationen im Reagenzröhrchen. Durch seine hohe molekulare Dichte bewirkt die Hinzugabe von Ficoll zur Blutzellsuspension (Mischverhältnis Vollblut:PBS = 1:2) bei Zentrifugation (1000 g, 30 min) die Ausbildung einer Interphase, die nahezu ausschließlich mononukleäre Zellen enthält. Diese kann vorsichtig mit einer Pipette abgenommen werden. Nach zwei Waschschrinen in PBS (Zentrifugation 10 min, 400 g, 4°C) wurden die Zellen fünf Minuten in Ortholyse-Reagenz inkubiert, um verbliebene Erythrozyten zu eliminieren. Schließlich wurde nach einem weiteren Waschschrin die Viabilität der Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt.

Die Subisolation von Monozyten aus PBMCs wurde mithilfe der MACS (*magnetic activated cell sorting*) Technologie durchgeführt. Hierbei werden Zellpopulationen anhand spezifischer Oberflächenstrukturen durch an Magnetpartikel (sogenannte *micro-beads*) gebundene Antikörper voneinander getrennt. Tragen die Partikel Antikörper gegen spezifische Oberflächenstrukturen der zu isolierenden Zellpopulation, werden diese Zellen beim Durchfluss des Zellgemisches durch eine Säule in einem Magnetfeld zurückgehalten, die restlichen Zellen herausgewaschen. Man spricht in diesem Fall von Positivselektion. Die Isolation der gewünschten Zellpopulation kann auch mittels Negativselektion erfolgen, bei der die gewünschten Zellen allein keinerlei Magnetpartikel binden und demnach selektiv ausgewaschen werden. In dieser Arbeit wurden Monozyten aus PBMCs per Negativselektion gewonnen. Die Effizienz der Selektion wurde mittels FACS-Analyse (in Abschnitt 2.7. ausführlich beschrieben) durch Detektion des Anteils CD14 positiver Monozyten erhoben.

Zur Gewinnung monozytärer dendritischer Zellen (mDCs) wurden Monozyten für fünf Tage in Interleukin-4 (Endkonzentration 500 U/ml) und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (Endkonzentration 500 U/ml) kultiviert (5 Mio Zellen / 5 ml RPMI-Medium, 6-Well). Die so gewonnenen, unreifen mDCs wurden daraufhin zur Ausreifung für weitere zwei Tage mit Prostaglandin E2 (PGE2) (Endkonzentration 1  $\mu$ M), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) (Endkonzentration 1000 U/ml) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Endkonzentration 10 ng/ml) behandelt. Die Effizienz der Gewinnung reifer mDCs wurde schließlich mittels FACS-Analyse durch Detektion des Anteils HLA-DR- und CD83-positiver sowie gleichzeitig CD14-negativer mDCs erhoben.

## 2.3 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* ist eine Technik, die für die Detektion von Antikörpern oder Antigenen durch Enzym-gekoppelte Antikörper genutzt wird. Dadurch können Gehalte von zu untersuchenden Molekülen durch die Umsetzung eines zunächst farblosen Substrates in ein farbiges Reagenz colorimetrisch gemessen werden. Selbst sehr kleine Mengen von zu untersuchenden Molekülen können mit diesem Verfahren nachgewiesen und anhand eines Standards absolut quantifiziert werden. Das Prinzip der Technik basiert darauf, dass das zu untersuchende Molekül an einer festen Oberfläche, die mit einem spezifischen Antikörper versehen ist, gebunden wird. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper hinzu gegeben, der an ein Enzym gekoppelt ist, das für den colorimetrischen Nachweis benutzt werden kann. Zur Quantifizierung von sezerniertem humanem IP-10, einem durch Interferon induzierbaren Gen, wurde ein IP-10 ELISA Kit BD Bioscience, zum Nachweis von sezerniertem humanem Interleukin-1 $\beta$  wurde ein IL-1 $\beta$  ELISA Kit von eBioscience verwendet.

## 2.4 *Western blot*

### 2.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Bei der *Western blot* Methode wird ein Proteingemisch nach einer gelelektrophoretischen Größenauftrennung elektrophoretisch auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose, PVDF oder Nylon transferiert. Der Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran kann durch mehrere Techniken erfolgen. Beim *semi-dry* Transfer werden beispielsweise auf mehrere übereinander gelegte, in Transfer-Puffer eingeweichte so genannte *Whatman*-Papiere die Trägermembran, darauf das Gel, in dem sich die elektrophoretisch nach Größe aufgetrennten Proteine befinden, und darauf wiederum mehrere in Transfer-Puffer eingeweichte *Whatman*-Papiere geschichtet. Der Transfer kann auch mittels *wet*-Transfer erfolgen, bei dem man das eben erläuterte Konstrukt vollständig in eine Kammer einbringt, die mit Transfer-Puffer gefüllt ist. Bei beiden Verfahren wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf die Trägermembran wandern.

Auf der Trägermembran können beim *Western blot* bestimmte Proteine spezifisch markiert werden. Dazu versieht man die Membran mit einem primären Antikörper, der

gegen ein spezifisches Protein gerichtet ist. Daraufhin gibt man einen sekundären Antikörper hinzu, der wiederum gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist und an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Durch mehrfache Waschschrte zwischen den einzelnen Arbeitsschritten werden unspezifische Antikörperbindungen minimiert. Durch die anschließende Applikation eines spezifischen Substrats kommt es durch die HRP zu einer Lumineszenzreaktion, die maschinell detektiert werden kann. Auf diese Weise können mit Hilfe der *Western blot*-Methodik spezifische Proteine eines Zelllysates nachgewiesen werden. Die Technologie eignet sich zum Nachweis von Proteinen generell, deren Expression, zur Bestimmung von *knock-down*-, *knock-out*- oder Überexpressionserfolgen sowie Proteinmodifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierungen.

## 2.4.2 Proteinanalyse mittels *Western blot*

Zur Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Trägermembran, die zuvor durch 30sekündiges Schwenken in Methanol, anschließender 2-minütiger Inkubation in ddH<sub>2</sub>O und abschließender Einlage in Transfer-Puffer aktiviert worden war, wurde die Methode des *wet*-Transfers genutzt. Es wurde für 1,5 h ein elektrisches Feld der Stärke 444 mA angelegt. Im Anschluss wurde die Membran 2 h bei Raumtemperatur in Milch (5% w/v, in TBST) geblockt, um unspezifische Bindungsmöglichkeiten für den im folgenden Schritt applizierten primären Antikörper zu minimieren. Dann wurde die Membran 2 x 5 min in TBST gewaschen. Hierauf wurde sie entweder 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in der Primärantikörperlösung belassen. Nach dreimaligem Waschen in TBST für je 5 min wurde für 1-2 h der sekundäre Antikörper angewandt. Es folgten erneut drei Waschschrte für je 5-10 min und daraufhin abschließend die Hinzugabe von ECL Entwicklungssubstrat. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe eines Fuji Film LAS-4000 Chemolumineszenz Lesegeräts.

## 2.5 Quantitative *real-time*-PCR

### 2.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Technik der *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (*reverse-transcribed*-PCR = *rt*-PCR) wird eingesetzt, um quantitative Aussagen über die mRNA-Expression bestimmter Gene treffen zu können. Durch Vervielfältigung der zu untersuchenden

mRNAs können kleinste Mengen des Moleküls messbar gemacht werden. Eine Quantifizierung ist nur im linearen Bereich der PCR-Reaktion möglich, wenn pro Amplifikationszyklus eine Verdopplung der vor der rt-PCR in cDNA umgeschriebenen mRNA erfolgt. Der Vorteil der quantitativen rt-PCR gegenüber der konventionellen PCR liegt darin, dass bei diesem Verfahren die neu gebildete DNA-Menge während der rt-PCR bei jedem Amplifikationszyklus gemessen wird. So kann auch der Eintritt in die abschließende Plateauphase, in der keine neue DNA mehr entsteht, detektiert werden.

Bei der rt-PCR findet eine kontinuierliche Überwachung der entstehenden DNA-Amplifikate während der Reaktion statt. Dies geschieht durch die Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der rt-PCR proportional zur Menge der entstehenden Amplifikate ansteigt. Die Erzeugung des Fluoreszenzsignals geschieht mit Hilfe von Sonden, die sequenzspezifisch an die zu untersuchende cDNA binden. Solche Sonden tragen einen so genannten *Quencher*, der initial einen ebenfalls in der Sonde enthaltenen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am Freiwerden hindert.

Wenn nun während einer rt-PCR die verwendete Polymerase, die zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die spezifisch gebundene Sonde während der Synthese des Gegenstranges abbaut, werden der *Quencher*, der bis dahin das Fluoreszenzsignal unterdrückt hat, und der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff voneinander getrennt. Dies führt zu einem messbaren Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge der Amplifikate ist. Unterschiede von spezifischen mRNAs in verschiedenen experimentellen Bedingungen können entweder anhand von Standards absolut, oder relativ bei gleichzeitiger Messung einer mRNA-Menge eines Referenzgens, dessen Expression unabhängig von Zellstimulationszuständen konstant bleibt, quantifiziert werden.

### 2.5.2 Durchführung der rt-PCR

Zur Messung von mRNA-Expressionszuständen wurde der *LightCycler 480 Probes-Master-Polymerase-Enzym-Mastermix* und Sonden der *Universal Probe Library* von Roche benutzt. Die jeweils benötigten, genspezifischen Primer wurden mit Hilfe eines auf der Internetpräsenz von Roche zur Verfügung gestellten *Assay-design*-Programms gestaltet ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)), mit einer geeigneten Probe aus der *Universal Probe Library* kombiniert und bei Metabion gekauft. Es wurden je Bedingung 10  $\mu$ l zweifach konzentrierter Polymerase Enzym Mastermix, 5  $\mu$ l reinstes ddH<sub>2</sub>O, je 0,4

$\mu\text{l}$  aus 10- $\mu\text{molarer}$  Lösung des Vorwärts- und Rückwärts-Primers, 0,2  $\mu\text{l}$  aus 10- $\mu\text{molarer}$  Lösung der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff-Sonde und schließlich 4  $\mu\text{l}$  der zuvor in cDNA umgeschriebenen mRNA zu einem Gesamteinzelbedingungsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  in einer speziellen rt-PCR 96-Well Platte zusammenpipettiert. Zur Schonung der lichtempfindlichen Sonden wurde das Experiment bis zu diesem Punkt bei reduziertem Licht durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Platte kurz zentrifugiert, mit einer hitzestabilen Folie beklebt und in einen *LightCycler 480* von Roche eingespeist. Die Kettenreaktion erfolgte über 45 Amplifikationszyklen nach einer Vorerhitzung auf 95°C für 10 min. Die Steuerung der Reaktion und Analyse erfolgte mit Hilfe der *LightCycler 480* Software. Als Analyseart wurde eine relative Quantifizierung gewählt. Dazu wurde die mRNA-Menge des zu untersuchenden Gens stets in Referenz zur mRNA-Menge eines *housekeeping*-Gens innerhalb derselben Probe, im Falle dieser Arbeit mit der des Gens für das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), betrachtet.

## 2.6 *CellTiter-Blue* Zellviabilitäts-Assay

### 2.6.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Neben der Zellmembranbeschaffenheit einer sterbenden Zelle, ihrer zelltodspezifischen Morphologie sowie ihrer sich während des Sterbeprozesses auf Zelltod hin verändernde Proteinzusammensetzung verändert sich auch der Metabolismus in seiner Gesamtheit. Bei der Messung des Zellstoffwechsels macht man sich zunutze, dass der Stoffwechsel einer unter optimalen Bedingungen lebenden Zelle stärker ausgeprägt ist als der einer im Extremfall bereits gestorbenen Zelle, die keinerlei Proteinsynthese mehr betreibt und deren Proteinmaschinerie nicht mehr aktiv ist. Diese unterschiedlichen Stoffwechsellagen von Zellen lassen sich mit Hilfe des *CellTiter-Blue* Zellviabilitäts-Assays bestimmen.

Bei dem sogenannten *CellTiter-Blue* handelt es sich um den Farbstoff Resazurin, der bei bloßer in Augenscheinnahme tief blau erscheint und eine geringe Eigenfluoreszenz innehat. Ist eine Zelle "lebendig", verstoffwechselt sie Resazurin durch Reduktion zu Resorufin, das pink erscheint und stark fluoresziert (579 nm<sub>Exzitation</sub> / 584 nm<sub>Emission</sub>). Je mehr Resazurin also in einem bestimmten Zeitraum durch Zellen reduziert wird, desto mehr ändert sich die Farberscheinung der experimentellen Einzelbedingung, der der

Farbstoff beigemischt wurde, von tief blau über lila hin zu pink. Gleichzeitig ändert sich damit das Fluoreszenzlevel dieser Einzelbedingung. Durch die Fluoreszenzveränderung in einem bestimmten Zeitraum kann man unterschiedliche Stoffwechselzustände von Zellen so durch die Aufzeichnung ihrer jeweiligen Fluoreszenz messen und Rückschlüsse auf ihre "Lebendigkeit" ziehen.

Diese Form der Zelltodmessung lässt jedoch keine Rückschlüsse auf spezifische Zelltodformen zu, wie etwa der Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose. Sie zeigt lediglich Unterschiede der bereits erwähnten "Lebendigkeit" von Zellen zwischen verschiedenen experimentellen Einzelbedingungen. Zur weiteren Differenzierung spezifischer Zelltodmechanismen ist die Kombination mit zusätzlichen anderen Messmethoden wie *Western blot* oder FACS-Analyse nötig, die in dieser Arbeit an anderer Stelle erläutert und für die Gewinnung einer differenzierteren Datenlage bezüglich der Fragestellung genutzt wurden.

### **2.6.2 Durchführung des *CellTiter-Blue* Zellviabilitäts-Assays**

Zur Bestimmung der Stoffwechsellage von Zellen wurden pro experimenteller Bedingung jeweils 5  $\mu$ l *CellTiter-Blue* / 100  $\mu$ l Medium zugesetzt. Daraufhin wurde der Farbstoff durch leichtes Schwenken der 96-Well- bzw. 24-Well-Platten verteilt, bis die Einzelbedingungen homogen blau erschienen. Jetzt wurden die Platten in den Begasungsbrutschrank zurückgestellt und 1 bis 4 h dort belassen. Der Zeitpunkt der Messung der Fluoreszenz differierte von Zelllinie zu Zelllinie, da der Grundstoffwechsel zwischen verschiedenen Zelllinien stark abweichen kann, je nachdem wie stoffwechselaktiv sie sind. Die Fluoreszenz der jeweiligen experimentellen Bedingungen wurde mithilfe eines Mithras *Multiplate Readers* bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

Im Anschluss an die Messung wurden die jeweiligen Fluoreszenzlevel der Einzelbedingungen in Relation zueinander gesetzt. In dieser Arbeit wurde jeweils der Fluoreszenzwert der Negativkontrolle des jeweiligen Experiments zur Normierung verwendet und als 100 % Zellviabilität bzw. 0 % Verlust der Zellviabilität gesetzt. Dies bedeutet, dass in allen in dieser Arbeit dargestellten Balkendiagrammen, die den *CellTiter-Blue* Zellviabilitäts-Assay zum Inhalt haben, der maximal mögliche Wert von 100 % einem 100-%igen Verlust des Zellstoffwechsels entspricht.

## 2.7 Durchflusszytometrische Zellanalyse (FACS)

### 2.7.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*), allgemein als Durchflusszytometrie bezeichnet, erlaubt es gleichzeitig mehrere physikalische Eigenschaften sowie Fluoreszenz-Parameter von Zellen einer größeren Zellpopulation zu bestimmen. Dadurch wird es möglich, die zu untersuchende Zellgesamtheit in Subpopulationen von Zellen mit bestimmten Eigenschaften zu differenzieren. So werden diese anhand ihrer Größe, Granularität sowie ihrer spezifischen Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe qualitativ erfasst, bestimmten Untergruppen zugeordnet und quantitativ dargestellt. Dazu werden die Zellen mit an Fluorochromen gebundenen Antikörpern gegen zu messende Oberflächenantigene beziehungsweise mit direkt gegen Zellbestandteile gerichteten Farbstoffen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch eine Messkammer geführt. Hier wird der Zellstrom in der Trägerflüssigkeit auf das Küvettenzentrum verengt und beschleunigt, so dass die Zellen einzeln in ausreichendem Abstand voneinander am Messpunkt vorbeifließen. An diesem Messpunkt werden durch je einen Photodetektor in Verlaufsrichtung (Vorwärtsstreulicht oder *forward-scatter*) die Beugung des Laserstrahls und damit die Zellgröße sowie rechtwinklig zum Strahl (Seitwärtsstreulicht oder *side-scatter*) die Brechung des Lichts und damit die Struktur der Zelle registriert und in elektrische Signale umgewandelt.

Durchflusszytometer können je nach Konfiguration mit verschiedenen Lasern ausgestattet werden, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlängen emittieren und somit die benutzten Fluorochrome zur Fluoreszenz anregen. Das für diese Arbeit benutzte Gerät enthält zwei verschiedene Laser. Ein luftgekühlter Argonlaser emittiert monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm, ein Diodenlaser monochromatisches Licht der Wellenlänge 635 nm.

Filter und Spiegel sammeln die verschiedenen registrierten Lichtparameter und lenken es nach Anregungs- und Emissions-Wellenlängenbereichen aufgetrennt zu verschiedenen Photodetektoren. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen farbstoffgekoppelten Antikörper oder gebundenen Farbstoffe. Die

Auftrennung verschiedener Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der verwendeten Fluorochrome teilweise überschneiden. Deshalb ist es nötig, im Falle mehrerer gleichzeitig applizierter Fluorochrome diese Überschneidung rechnerisch zu korrigieren, indem von detektierten Fluoreszenzsignalen derjenige Anteil abgezogen wird, der zur Überschneidung der Signalspektren führt. Diesen Vorgang nennt man Kompensation.

## 2.7.2 Zelltodbestimmung mittels FACS-Analyse

Für FACS Analysen wurden 25000 bis 60000 Zellen in FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln auf Eis bei 4°C mit 0,5-1,0 µl Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, Bandpassfilter 530 nm; Anregung 488 nm) gekoppeltem Annexin für 15-30 min inkubiert. Annexine sind in mehrere alpha-helikale Domänen mit einem zentralen hydrophoben Bereich gefaltet und bilden Calcium abhängige Bindungen zu sauren Phospholipiden. Phospholipide stellen einen essentiellen eukaryontischen Zellmembranbestandteil dar und klappen während apoptotischer Zellzustände im Zuge der Membranalteration vom Membraninneren nach außen um. So kann FITC-gekoppeltes Annexin an Phospholipide alterierender Membranen binden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die FACS-Analyse durchgeführt, um mögliche apoptotische Zellzustände nach DNA-Transfektion unter bestimmten Voraussetzungen zu messen und darzustellen. Der angeführte fluoreszierende Farbstoff strahlt im verwendeten FACSCalibur®-Gerät in den Kanal 1. Die Analyse erfolgte mithilfe des Programms CellQuest® und wurde anschließend im Bearbeitungsprogramm FlowJo® ausgewertet.

## 2.8 *Small interfering RNA* (siRNA)

### 2.8.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Mit Hilfe von *small interfering RNA* (siRNA) lässt sich die Aktivität von Genen gezielt transient herunterregulieren. Nach der Transfektion eines solchen kurzen, in der Regel 20-25 Nukleotide langen, Doppelstranges wird die RNA durch den *RNA-induced silencing complex* (RISC) entwunden und in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Der komplementär zu einer bestimmten mRNA entworfene Einzelstrang wird durch

spezifisch gestaltete Stabilitätsunterschiede der beiden Enden des zu Anfang transfizierten Doppelstrangs bevorzugt in den RISC Komplex aufgenommen, der andere Einzelstrang wird abgebaut. So kann der Komplex mit der aufgenommenen siRNA gezielt an komplementäre mRNAs des auszuschaltenden Gens binden. Es entsteht ein Doppelstrang, der nicht mehr durch Ribosomen translational umgesetzt werden kann und durch den DICER-Komplex abgebaut wird. Auf diese Weise wird die Herstellung des Proteins, das man aus dem Signalnetzwerk der Zelle entfernen möchte, verhindert. Im Laufe von Stunden bis Tagen verschwindet das Zielprotein aus der Zelle, weil bereits synthetisierte Proteine entsprechend ihrer Lebensdauer nach und nach abgebaut werden, jedoch keine weitere Neusynthese stattfinden kann. Man spricht bei siRNA Experimenten, im Gegensatz zu Versuchen mit *knock-out*-Zellen oder -Tieren (bei welchen das Zielgen direkt und stabil ausgeschaltet worden ist), von *knock-down*-Versuchen. Das Ausmaß des *Knock-downs* hängt vom Design der siRNA, vom Transfektionserfolg und der Proteinstabilität ab und kann im besten Fall annähernd 100 % erreichen.

Der große Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, schnell viele Zielproteine auf ihren Stellenwert in Signalnetzwerken hin untersuchen zu können, der Nachteil darin, dass ein vollständiger *knock-down* selten gelingt, was zu Verringerung des Effektausmaßes führen kann. Ein weiterer Nachteil ergibt sich aus möglicherweise auftretenden, so genannten *Off-target*-Effekten. Hierbei kommt es durch die zusätzliche Bindung der siRNA an mRNAs, die für andere Proteine als das Zielprotein des Versuchs kodieren, zur unerwünschten Beeinflussung der Aktivität anderer Gene. Dies kann zur Verfälschung des Versuchsergebnisses führen, weshalb die Spezifität der erstellten siRNA vor ihrer Nutzung überprüft werden muss. Die individuelle Erstellung von siRNA-Molekülen geschieht heute programm basiert, wobei solche Faktoren wie Gehalt und Kombination spezifischer Basen, Länge, Bindungsstabilität und andere Parameter wunschgemäß berücksichtigt werden. Zudem erfährt man durch den Abgleich mit dem gesamten Genom des Zielorganismus' mögliche *off-target*-Effekte potentieller siRNA-Sequenzen.

## 2.8.2 Erstellung und Anwendung von siRNA

Die Erstellung von siRNA Molekülen erfolgte mit Hilfe des siRNA *target-finder*-Programms des *Whitehead Institute for Biomedical Research*. Zur Synthetisierung der benötigten siRNA Sequenzen wurde stets Eurofins MWG Operon beauftragt. Für

siRNA-Versuche in 1205Lu Zellen wurden die Zellen in 24-Well Platten in einer Dichte von 30000 Zellen pro Well in 300  $\mu$ l Medium ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Hierauf wurden die Zellen für 48 h mit 0,7  $\mu$ l *Lipofectamine* RNAiMAX pro Bedingung und einer Endkonzentration von 50 nM siRNA in OPTIMEM transfiziert. Dazu wurden zunächst Transfektionsreagenz und siRNA getrennt in je 60  $\mu$ l pro Bedingung pipettiert und 5 min zur gleichmäßigen Verteilung stehen gelassen. Danach wurden die beiden halben Ansätze zu einem Gesamtvolumen von 120  $\mu$ l pro Bedingung zusammengeführt. Abschließend erfolgte nach ungefähr 20 min Inkubation bei Raumtemperatur die Transfektion. Nach 48 h und einem erneuten Mediumwechsel wurde die eben beschriebene Prozedur wiederholt. Die Transfektion der siRNA wurde zeitgleich mit der Stimulation durchgeführt.

Für siRNA Experimente in THP1 Suspensionszellen wurden die Zellen ebenfalls in 24-Well Platten in einer Dichte von 30000 Zellen pro Well ausplattiert. Im Anschluss daran wurde die siRNA in einer Endkonzentration von 50 nM mit 3  $\mu$ l DreamFect pro Bedingung in OPTIMEM pipettiert. Auch hier erfolgte zunächst die getrennte Lösung der siRNA und des Transfektionsreagenz im jeweils halben Ansatz zur gleichmäßigen Verteilung der Komponenten. Das Gesamtvolumen des Transfektionsansatzes pro Bedingung betrug 120  $\mu$ l. Die Transfektionsdauer der siRNA betrug 24 h, wobei den Zellen ungefähr 8 h nach Transfektion der siRNA zur Ausdifferenzierung zu Makrophagen Phorbol-12-Myristyl-13-acetat (PMA) in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M hinzugefügt wurde. Nach 24 h siRNA Applikation wurden die zu Makrophagen ausdifferenzierten und nun adherenten Zellen erneut mit siRNA behandelt. Diesmal jedoch wurde die Transfektion der siRNA genau so durchgeführt, wie bereits weiter oben bei 1205Lu Zellen beschrieben. Zeitgleich dazu geschah die Stimulation der Zellen. Eine Liste aller in dieser Arbeit verwendeten siRNA Sequenzen befindet sich auf Seite 27.

## 2.9 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der jeweiligen Versuchsreihen wurde stets ein *2-tailed Student's t-Test* angewandt, um Signifikanzen der Mittelwerte zu berechnen. Als signifikant wurden p Werte von kleiner 0,05 erachtet. Die statistische Signifikanz wird angegeben als ns für  $p > 0,05$ , \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ . Die Daten werden dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (*standard error of means*).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Fremd-DNA induziert in nicht-myeloiden Zellen

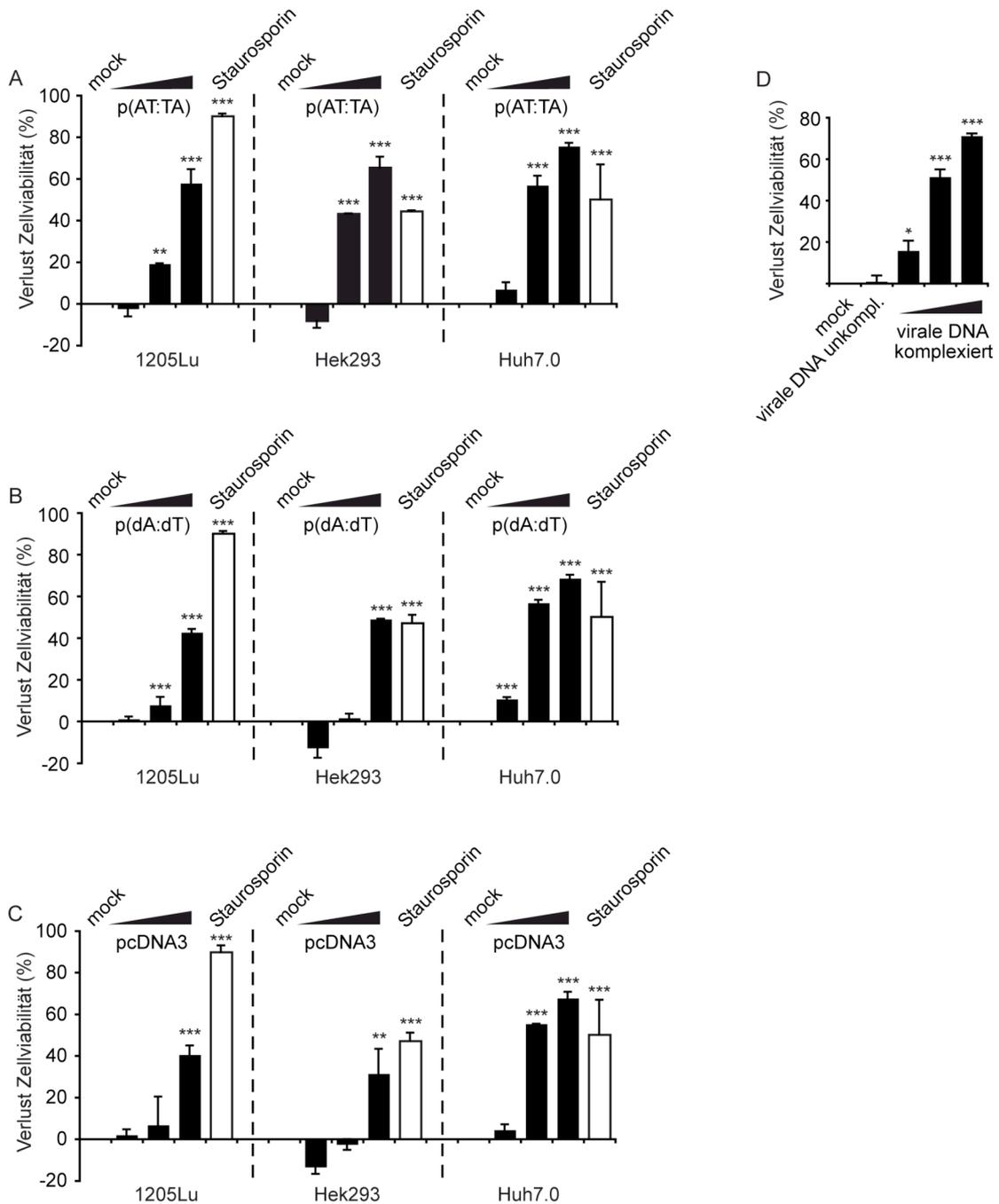
#### Apoptose unabhängig vom Interferonnetzwerk

##### 3.1.1 Transfizierte Fremd-DNA induziert Zelltod

Bis vor kurzem war bezüglich eines durch zytosolische DNA induzierten Zelltods lediglich bekannt, dass Makrophagen in Anwesenheit zytosolischer DNA sterben (Stacey et al., 1993). Roberts et al. veröffentlichten, dass zytosolische DNA in Makrophagen Caspase-3 aktiviert (Roberts et al., 2009). Andere Forschungsgruppen berichteten von einem Caspase-1 abhängigen Zelltod in myeloiden Zellen (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009).

Zur Beleuchtung der Frage, ob zytoplasmatische DNA in nicht-myeloiden Zellen Zelltod zu induzieren vermag, wurden verschiedene nicht-myeloide Zelllinien mit verschiedenen Arten synthetischer oder mikrobieller DNA transfiziert. Dazu wurde, nachdem die Zellen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Transfektionsreagenzien getestet worden waren, entweder *Lipofectamine* RNAiMAX oder *GeneJuice* verwendet. Nach 18h Inkubation wurde nun zunächst die Zellviabilität mithilfe des metabolischen *CellTiter-Blue* Zellviabilitäts-Assays (5  $\mu$ l *CellTiter Blue* pro 100  $\mu$ l Medium, Inkubationszeit 1-4 h) bestimmt.

Wie **Abbildung 3.1.1.1** zu entnehmen ist, zeigten alle getesteten nicht-myeloiden Zellen (1205Lu, HEK293, Huh7.0) einen ausgeprägten Viabilitätsverlust. In Übereinstimmung mit Untersuchungen zur Induktion von Interferon durch transfizierte DNA erfolgte die Zelltodinduktion unabhängig von der Beschaffenheit der DNA (Ishii et al., 2006). Synthetisches poly(dAdT:dAdT) (im Folgenden, wenn nicht anders angezeigt, bezeichnet als p(AT:TA)) (**Abbildung 3.1.1.1 A**) führte ebenso wie synthetisches poly(dA:dT,) (**Abbildung 3.1.1.1 B**) oder Plasmid-DNA (**Abbildung 3.1.1.1 C**) konzentrationsabhängig zum Zelltod. Auch eine aus MVA Virus (*modified vaccinia virus Ankara*) isolierte DNA erzielte einen vergleichbaren Effekt (**Abbildung 3.1.1.1 D**). Die Induktion des Zelltods hing dabei kritisch von einer erfolgreichen Transfektion, das heißt der Aufnahme der DNA in die Zellen, ab, da die unkomplexierte Hinzugabe von DNA zu den Zellen ohne Transfektion keinerlei Zellmetabolismus beeinträchtigende Wirkung entfalten konnte.



**Abbildung 3.1.1.1 Nicht-myeloide Zellen sterben infolge Transfektion synthetischer, mikrobieller und viraler DNA**

1205Lu, HEK293 und Huh7.0 Zellen (30.000 / 200 $\mu$ l, 96-Well Format) wurden entweder mit 2  $\mu$ M Staurosporin, Transfektionsreagenz allein (mock) oder komplexierter (200 ng, 800 ng, 1500 ng) synthetischer und mikrobieller DNA behandelt. Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium) 18 h nach Stimulation. Dargestellt ist jeweils der Viabilitätsverlust in % zur allein mit Transfektionsreagenz behandelten Referenz (mock), die auf den Referenzwert 0% normiert wurde. Angezeigt jeweils Mittelwerte + SEM von n=4 unabhängigen Versuchen.

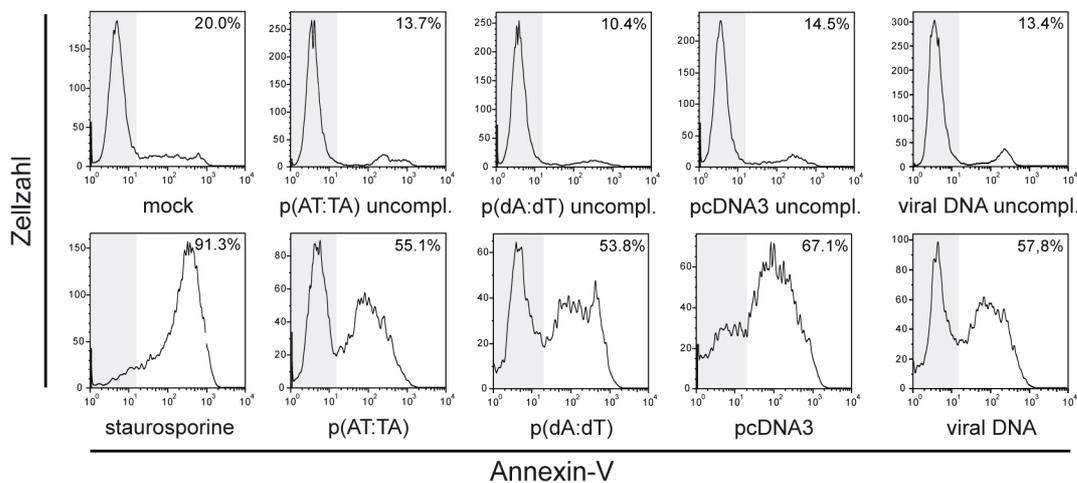
**A:** Behandlung mit aufsteigenden Mengen p(AT:TA)

**B:** Behandlung mit aufsteigenden Mengen p(dA:dT)

**C:** Behandlung mit aufsteigenden Mengen Plasmid-DNA (pcDNA3)

**D:** Behandlung mit aufsteigenden Mengen von aus MVA isolierter, unkomplexierter oder komplexierter viraler DNA

Neben der metabolischen Messung mittels *CellTiter-Blue* wurde zudem eine durchflusszytometrische Analyse nach Transfektion von DNA durchgeführt, durch die Phosphatidylserinpolaritätsänderungen der Zellmembranen, wie sie beim apoptotischen Zelltod vorkommen, nachgewiesen werden konnten (**Abbildung 3.1.1.2**). Auch hier spielte die Art der transfizierten DNA keine entscheidende Rolle bezüglich der Zelltodinduktion. Zur Detektion von Membranalterationen wurden behandelte wie unbehandelte 1205Lu Zellen für 20 Minuten im Dunkeln mit an Fluoreszin gekoppeltem Annexin inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie ausgelesen.

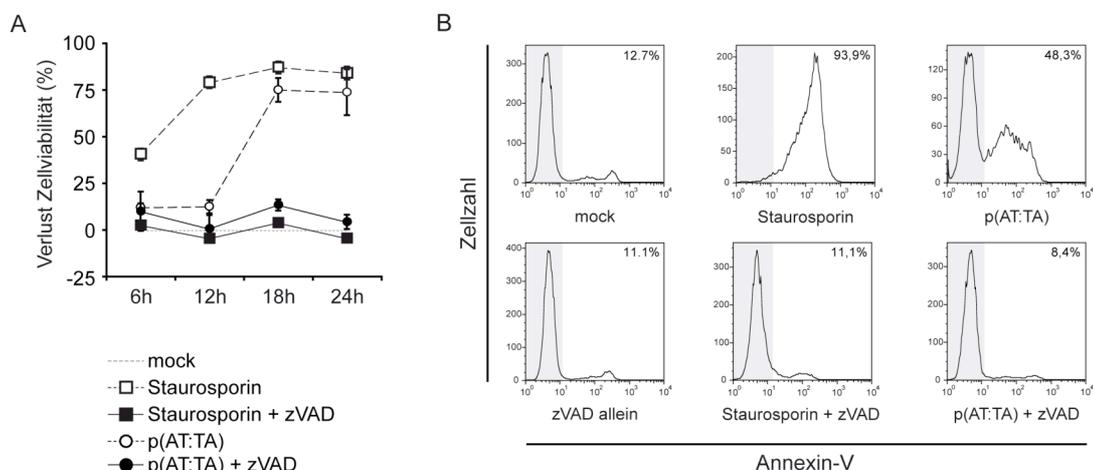


**Abbildung 3.1.1.2 Transfektion von Fremd-DNA löst in nicht-myeloiden Zellen Apoptose aus**

1205Lu Zellen (30.000 / 200  $\mu$ l, 96-Well Format) wurden entweder mit 2  $\mu$ M Staurosporin, Transfektionsreagenz allein, unkomplexierter (1500 ng) oder komplexierter (1500 ng) synthetischer und mikrobieller DNA behandelt. Durchflusszytometrische Analyse 18 h nach Stimulation. Zur Detektion von Zellmembranlipidalterationen wurden die Zellen vor der Analyse für 20 min im Dunkeln mit Annexin-V-Fluos inkubiert. Dargestellt sind die Zellzahl (y-Achse) und die Annexin-Positivität (x-Achse, grau markierter Bereich durch Negativkontrolle definiert als Annexin negativ). Angezeigt ein repräsentatives Beispiel von n=3 unabhängigen Versuchen mit äquivalenten Ergebnissen.

### 3.1.2 Der durch Transfektion von Fremd-DNA induzierte Zelltod ist abhängig von Caspasen

Um festzustellen zu können, ob es sich bei dem hier beobachteten Zelluntergang tatsächlich um einen apoptotischen, also Caspase-abhängigen Zelltod handelt (Aslan and Thomas, 2009) wurden 1205Lu Zellen vor der DNA-Transfektion für 30 Minuten mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-FMK inkubiert. Es stellte sich heraus, dass die Vorbehandlung mit zVAD-FMK den durch die Transfektion von p(AT:TA) verursachten Zelltod selbst bei einer sehr hohen transfizierten DNA-Konzentration von 12  $\mu\text{g/ml}$  ähnlich gut revertieren konnte wie die Applikation des bekanntermaßen Apoptose auslösenden Kinase-Inhibitors Staurosporin, der als Positivkontrolle genutzt wurde. Die Reversion des Zelltods bei Vorbehandlung mit zVAD-FMK konnte 6 h, 12 h, 18 h sowie 24 h nach der Stimulation mit DNA durch Anwendung des *CellTiter-Blue* Zellviabilitäts-Assays (**Abbildung 3.1.2 A**) sowie zusätzlich 18 h nach der Stimulation durch durchflusszytometrische Analyse (**Abbildung 3.1.2 B**) nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.1.2 Die Zelltodinduktion durch zytoplasmatische Fremd-DNA ist abhängig von Caspasen**

1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu\text{l}$ , 24-Well Format) wurden entweder mit Transfektionsreagenz allein (mock), dem Caspaseinhibitor zVAD-FMK (Endkonzentration 50  $\mu\text{M}$ ) allein, Staurosporin (2  $\mu\text{M}$ ) oder komplexiertem p(AT:TA) (6000 ng/ml) behandelt. Die Stimulation mit Staurosporin und DNA erfolgte mit und ohne 30-minütige Vorbehandlung mit zVAD-FMK.

**A:** Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu\text{l}$  / 100  $\mu\text{l}$  Medium) 6 h, 12 h, 18 h und 24 h nach Stimulation. Angezeigt ein repräsentatives Beispiel (Mittelwert + SEM von Duplikaten) von n=3 unabhängigen Versuchen mit äquivalentem Ergebnis.

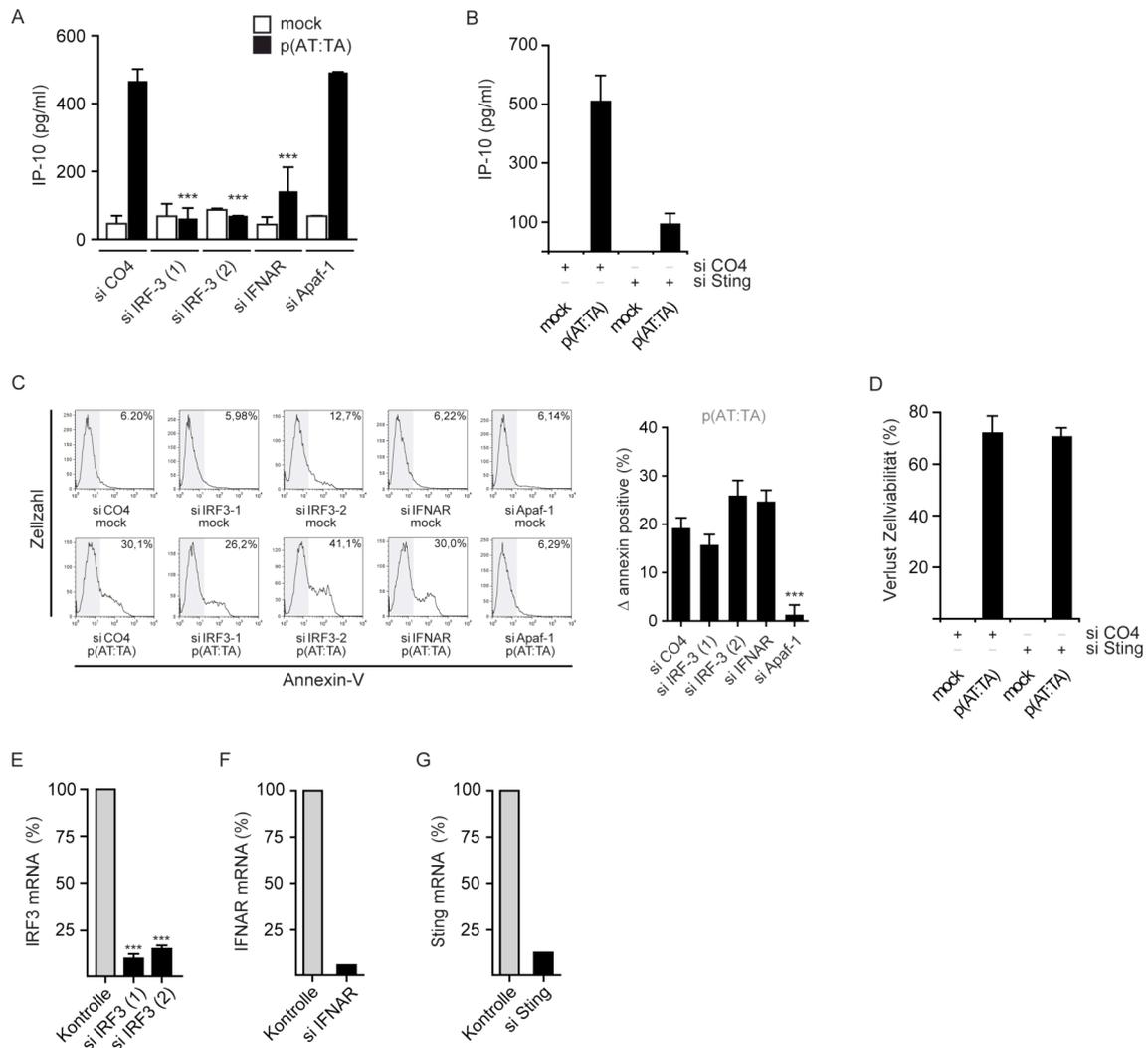
**B:** Durchflusszytometrische Messung der Zellen 18 h nach Stimulation. Zur Detektion von Zellmembranlipidalterationen wurden die Zellen vor der Analyse für 20 min im Dunkeln mit Annexin-V-Fluos inkubiert. Angezeigt ein repräsentatives Beispiel von n=3 unabhängigen Versuchen mit äquivalentem Ergebnis.

### 3.1.3 Die Zelltodinduktion durch transfizierte Fremd-DNA geschieht unabhängig vom Interferonsystem

Es ist gezeigt worden, dass zytosolische, immunstimulatorische DNA das Interferonsystem, einen gewichtigen Bestandteil der antiviralen Immunabwehr, abhängig von IRF-3 (*interferon regulating factor 3*) und STING (*stimulator of interferon genes*) aktiviert (Cheng et al., 2007; Ishii et al., 2006; Ishikawa and Barber, 2008; Stetson and Medzhitov, 2006). Um zu untersuchen, ob die Wirkung von Interferon und die Induktion von Zelltod durch zytoplasmatische DNA verbunden sind, wurde untersucht, ob die Wirkung von Interferon eine Voraussetzung für den beobachteten Zelltod darstellt.

**Abbildung 3.1.3** zeigt, dass die Zellen bei DNA-Transfektion IP-10 produzieren, ein durch Interferon induzierbares Zytokin (**Abbildung 3.1.3 A und B**). Weiter wird deutlich, dass die Zytokinproduktion bei Vorbehandlung mit siRNAs gegen IRF-3, IFNAR (**Abbildung 3.1.3 A**) und STING (**Abbildung 3.1.3 B**) nach Stimulation mit DNA komplett aufgehoben bzw. kritisch reduziert ist. Nicht der Fall ist dies für die als zusätzliche Kontrolle mit Apaf-1 siRNA vorbehandelten Zellen (**Abbildung 3.1.3 A**), da dieses Protein bekanntermaßen keine Rolle im Interferonnetzwerk spielt. Dies bestätigte die bekannte essentielle Rolle von IRF-3, IFNAR sowie STING in der Interferoninduktion durch zytoplasmatische, immunstimulatorische DNA. **Abbildung 3.1.3 C und D** zeigen jedoch deutlich, dass intrazelluläre DNA den Tod der Zellen unabhängig von der Interferonproduktion auslöst. Es zeigte sich unter Stimulationsbedingungen keinerlei Überlebensvorteil von Zellen, in denen IRF-3, IFNAR oder STING mittels siRNA herunterreguliert worden waren im Vergleich zu lediglich mit CO4 Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Als Positivkontrolle sind in **Abbildung 3.1.3 C** Zellen dargestellt, die mit Apaf-1 siRNA vorbehandelt worden waren. Hier zeigte sich bei Transfektion von p(AT:TA) ein deutlicher Überlebensvorteil im Vergleich zu solchen Zellen, bei welchen CO4 siRNA oder siRNAs gegen Proteine des Interferonsystems appliziert worden war. Die Rolle von Apaf-1 im durch zytosolische DNA ausgelösten Zelltod wird in dieser Arbeit in Abschnitt 3.3.2 ausführlich behandelt und darum hier noch nicht näher erläutert.

**Abbildung 3.1.3 E, F und G** zeigen die jeweilige *knock-down*-Effizienz der in dieser Abbildung verwendeten siRNAs gegen IRF-3, IFNAR und STING im Vergleich zu CO4 Kontroll-siRNA behandelten Zellen unter Stimulationsbedingungen, gemessen mittels rt-PCR. Alle siRNAs dieser Abbildung führten zu einer Reduktion der jeweiligen mRNA-Level um mindestens 85 Prozent.



**Abbildung 3.1.3 Zelltod durch zytoplasmatische Fremd-DNA geschieht unabhängig vom Interferonsystem**

1205Lu Zellen (30.000 / 500 $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M), verschiedenen IRF-3 siRNAs (20  $\mu$ M), IFNAR siRNA (20  $\mu$ M), STING (20  $\mu$ M) oder Apaf-1 (20  $\mu$ M) siRNA vorbehandelt. Nach 48 h wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18 h mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng/ml) transfiziert. **A:** Messung der IP-10 Produktion im Überstand durch ELISA 18 h nach Stimulation bei Vorbehandlung mit CO4, zwei verschiedenen IRF-3 siRNAs, IFNAR oder Apaf-1 siRNA. Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

**B:** Wie A, Vorbehandlung mit CO4 oder STING siRNA. Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=2 unabhängigen Versuchen.

**C:** Links: Angezeigt repräsentative Histogramme eines Versuchs von n=3 unabhängigen Versuchen mit äquivalenten Ergebnissen. Rechts: Zum linken Bildabschnitt gehörendes Balkendiagramm. Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

**D:** Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium) nach 18h Stimulation bei Vorbehandlung mit CO4 oder STING siRNA. Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=2 unabhängigen Versuchen.

**E:** Erzielte Kock-down-Effizienz der verwendeten IRF-3 siRNAs, bestimmt mit rt-PCR. Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

**F:** Erzielte Kock-down-Effizienz der verwendeten IFNAR siRNA. Procedere wie in E. Drei mit siRNA behandelte Proben wurden vor der RNA-Isolation gepoolt.

**G:** Erzielte Kock-down-Effizienz der verwendeten STING siRNA. Procedere wie in E. Drei mit siRNA behandelte Proben wurden vor der RNA-Isolation gepoolt.

Zusammenfassend bestätigten diese Messungen den bereits bekannten Umstand, dass die Produktion und damit auch die Wirkung von Interferon bei zytoplasmatischer Stimulation mit DNA abhängig ist von IRF-3, IFNAR und STING. Der beobachtete Zelltod allerdings geschieht unabhängig von Interferon und seinen Auswirkungen.

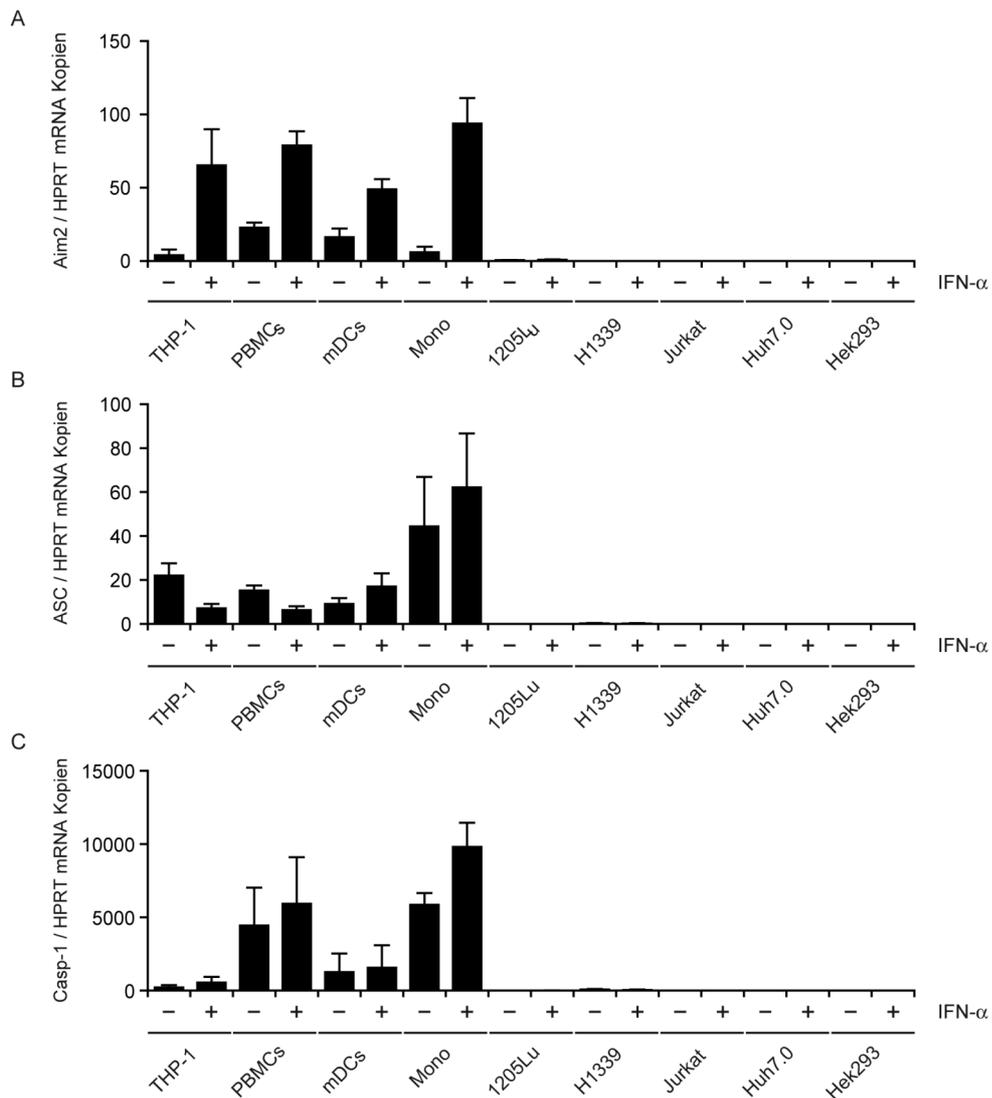
## **3.2 Rolle bekannter zytoplasmatischer DNA-Rezeptoren bei Zelltodinduktion durch Fremd-DNA oder DNA-Virus**

### **3.2.1 Nicht-myeloide Zellen exprimieren kein vollständiges Aim2-Inflammasom**

Es ist gezeigt worden, dass zytosolische DNA in Makrophagen über den kürzlich identifizierten intrazellulären DNA-Rezeptor Aim2 einen Aim2-ASC-Caspase-1-Inflammasom Komplex aktiviert und hierdurch zur Sekretion von aktivem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aus der Zelle sowie zum Zelltod führt (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009). Es bleibt jedoch unklar, ob für den durch zytoplasmatische DNA induzierten Zelltod in anderen Zelltypen ebenfalls Aim2 benötigt wird, gesetzt den Fall, dass Aim2 in diesen anderen Zelltypen überhaupt vorhanden ist. Um das Vorhandensein eines Aim2-Inflammasoms in verschiedenen Zelltypen genauer zu untersuchen, wurde die relative mRNA Expression von Aim2, ASC und Caspase-1 in verschiedenen myeloiden und nicht-myeloiden Zellen mittels rt-PCR gemessen. Dabei wurde die jeweilige mRNA Expression mit und ohne vierstündige Vorbehandlung mit Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) ermittelt, um zu untersuchen, ob und wie die Expression von Aim2, ASC und Caspase-1 durch Typ-I Interferon beeinflusst wird.

**Abbildung 3.2.1** zeigt den Expressionsvergleich von Aim2, ASC und Caspase-1, in isolierten humanen mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs), humanen monozytären dendritische Zellen (mDCs), humanen Monozyten (M $\emptyset$ ), einer humanen monozytären Zelllinie (THP-1) und einer Reihe von nicht-myeloiden Zelllinien [Humane Melanomzellen (1205Lu), humane Lungenepithelzellen (H1339), humane T-Lymphozyten (Jurkat), humane Leberzellen (Huh7.0), humane embryonale Nierenzellen (HEK293)]. Interessanterweise wiesen die getesteten myeloiden Zellen schon basal durchschnittlich sehr viel höhere Mengen an Aim2, ASC und Caspase-1 mRNA auf als die untersuchten nicht-myeloiden Zellen. In jenen war Aim2 mRNA meist

gar nicht oder nur in sehr geringer Menge detektierbar, ASC und Caspase-1 mRNA fehlten gänzlich. Die Vorstimulation der Zellen mit IFN- $\alpha$  führte bei allen myeloiden Zellen zur deutlichen Steigerung der Aim2 sowie milden Erhöhung der Caspase-1 mRNA Menge, wohingegen bei den getesteten nicht-myeloiden Zellen kein Effekt oder sogar eine Verringerung der Aim2 Expression feststellbar war.



**Abbildung 3.2.1 mRNA Expression von Aim2, ASC und Caspase-1 in myeloiden und nicht-myeloiden Zellen**

Zellpräparationen und Zelllinien myeloiden und nicht-myeloiden Ursprungs (500.000 Zellen / ml, 6-Well Format) wurden unbehandelt belassen oder für 4 h mit rekombinantem IFN- $\alpha$  (1000 U/ml) behandelt. Die RNA-Präparationen dieser Zellen wurden anschließend mittels quantitativer rt-PCR analysiert. Darstellung als Aim2, ASC oder Caspase-1 Kopien pro 100 HPRT Kopien. Angezeigt jeweils der Mittelwert + SEM von n=4 verschiedenen Spendern für primäre Zellen sowie n=3 unabhängig getesteten Chargen der verwendeten Zelllinien.

Diese Versuche zeigten, dass die Expression der Aim2-Inflammasom Komponenten Aim2, ASC sowie Caspase-1 in verschiedenen Zelltypen starke Unterschiede aufweist, wobei sich das Vorhandensein eines funktionsfähigen, also kompletten Aim2-Inflammasoms auf Zellen myeloiden Ursprungs zu beschränken scheint. Dies steht auch in Einklang mit der Arbeit der Gruppe um Burckstummer, in der durch künstliche Expression aller Aim2-Inflammasom Komponenten in HEK293 Zellen die Produktion von aktivem IL-1 $\beta$  bei DNA Stimulation erst möglich gemacht werden konnte (Burckstummer et al., 2009). Nichtsdestotrotz sterben HEK293 Zellen, wie in dieser Arbeit bereits gezeigt, nach Transfektion von DNA, auch ohne Rekonstruktion eines Aim2-Inflammasoms.

### **3.2.2 Transfizierte Fremd-DNA induziert in nicht-myeloiden Zellen Apoptose unabhängig von Aim2 und DAI/ZBP1**

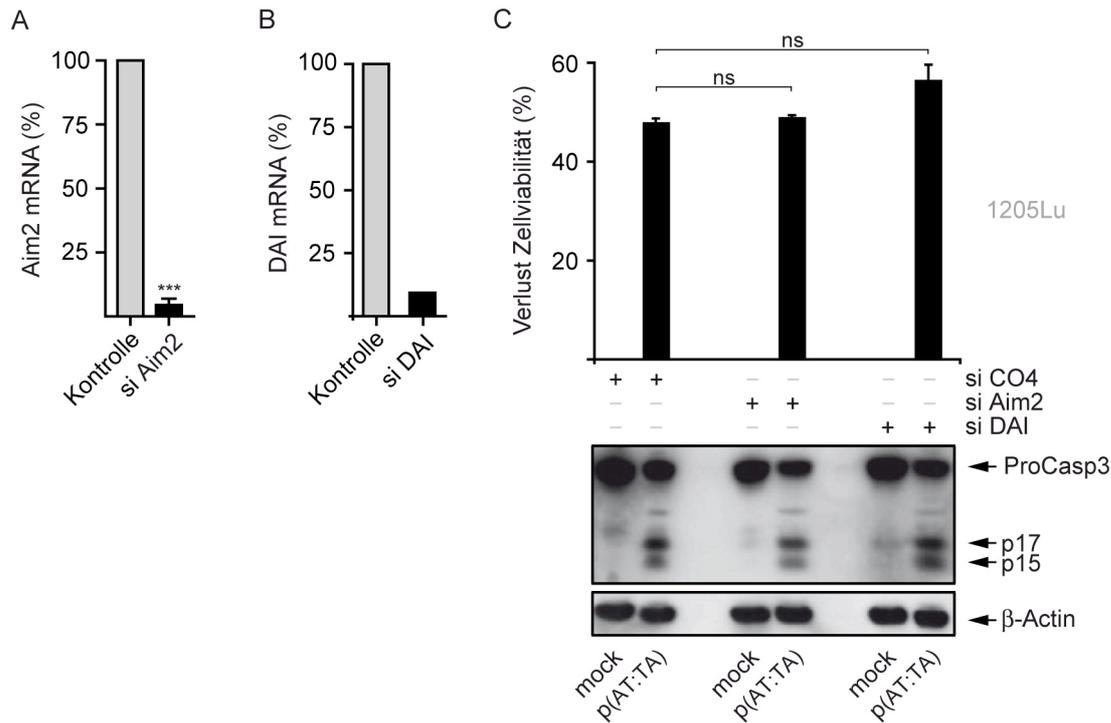
Bisher wurden als zytoplasmatische DNA-Rezeptoren DAI/ZBP1 (*DNA-dependent activator of interferon genes / Z-DNA binding protein 1*) (Takaoka et al., 2007) und Aim2 (*absent in melanoma 2*) (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009) identifiziert (Ranjan et al., 2009). DAI/ZBP1 wurde als essentieller Bestandteil der Erkennung zytosolischer DNA im Hinblick auf die zelluläre Aktivierung des Interferonnetzwerkes beschrieben, blieb wie bereits erwähnt, seine *in vivo* Relevanz aber schuldig (Takaoka et al., 2007; Wang et al., 2008). Ausschließlich Aim2 wurde bisher mit durch zytosolische DNA verursachtem Zelltod in Verbindung gebracht, wobei sich diese Beobachtungen bisher auf myeloide Zellen beschränken (Schroder et al., 2009).

Die von der Arbeitsgruppe um Roberts gemachte Beobachtung einer durch Aim2 vermittelten Aktivierung von Caspase-3 steht nach aktuellem Kenntnisstand im Widerspruch zu den Untersuchungen der Gruppe um Alnemri-Fernandez, die von Caspase-1 abhängiger, sogenannter Pyroptose ausgeht. Pyroptose ist eine bisher ausschließlich in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen beschriebene Zelltodform, die nach aktuellem Stand unabhängig von Caspase-3 abläuft (Labbe and Saleh, 2008). Sicher scheint, dass Aim2 in Makrophagen essentiell am durch zytosolische DNA induzierten Zelltod beteiligt ist. In Aim2-depletierten Makrophagen konnte der nach Stimulation mit poly(dA:dT) oder MVA (*modified vaccinia virus Ankara strain*) ausgelöste Tod nahezu komplett verhindert werden (Hornung et al., 2009).

Bezüglich dieser Kenntnislage sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche Aufschluss darüber geben, ob die bekannten zytoplasmatischen DNA-Rezeptoren DAI/ZBP1 und Aim2 - trotz geringer bis nicht vorhandener Expression - in nicht-myeloiden Zellen in die Vermittlung von durch zytosolische DNA ausgelösten Zelltod involviert sind. Hierzu wurde in 1205Lu Zellen mittels siRNA die Expression von Aim2 und DAI gehemmt und mit p(AT:TA) transfiziert.

**Abbildung 3.2.2 A** und **B** verdeutlichen die *knock-down*-Effizienz der in dieser Abbildung verwendeten siRNAs gegen Aim2 (**Abbildung 3.2.2 A**) bzw. DAI/ZBP1 (**Abbildung 3.2.2 B**) im Vergleich zu CO4 Kontroll-siRNA behandelten Zellen unter Stimulationsbedingungen, erhoben mittels quantitativer rt-PCR. Das Ausmaß der Herunterregulation der Zielproteine überstieg jeweils 90 Prozent.

Von denselben Zellbedingungen wurde gleichzeitig die Zellviabilität bestimmt und ein Caspase-3 *Western blot* angefertigt. Aus der **Abbildung 3.2.2 C** wird klar ersichtlich, dass die durch rt-PCR gesicherte Herunterregulation von Aim2 oder DAI/ZBP-1 im Vergleich zu lediglich mit CO4 Kontroll-siRNA behandelten Zellen keinen Einfluss auf den Viabilitätsverlust nach der Transfektion von p(AT:TA) hat. Zusätzlich konnte die Aktivierung von Caspase-3 im *Western blot*, wie von der Gruppe um Roberts für Makrophagen beschrieben (Roberts et al., 2009), durch die Vorbehandlung mit Aim2 oder DAI/ZBP1 siRNA bei p(AT:TA) Transfektion in 1205Lu Zellen nicht aufgehoben werden. Die Schnittfragmente p17/p19 der aktivierten Caspase-3 waren in allen Bedingungen klar detektierbar. Die Infektion von Aim2 depletierten 1205Lu Zellen mit MVA wt oder MVA  $\Delta$ F1L offenbarte hinsichtlich der Zellviabilität keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Zellen, die lediglich mit CO4 Kontroll-siRNA vorbehandelt worden waren.



**Abbildung 3.2.2 Zytoplasmatische Fremd-DNA verursacht in nicht-myeloiden Zellen Apoptose unabhängig von Aim2 und DAI/ZBP1**

1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M), Aim2 (20  $\mu$ M) oder DAI/ZBP1 (20  $\mu$ M) siRNA behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18 h mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde eine Messung der Zellviabilität sowie entweder eine RNA- oder Protein-Isolation aus den verwendeten Zellen durchgeführt.

**A:** Erzielte *knock-down*-Effizienz der verwendeten Aim2 siRNA, bestimmt mit rt-PCR. Das Expressionsniveau wurde jeweils in Referenz zum Haushaltsgen bestimmt und ist in Prozent des Expressionslevels von mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen angegeben. Angezeigt Mittelwert + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

**B:** Erzielte *knock-down*-Effizienz der verwendeten DAI/ZBP1 siRNA, bestimmt mit rt-PCR. Procedure wie in A. Drei mit siRNA behandelte Proben wurden vor der RNA-Isolation gepoolt.

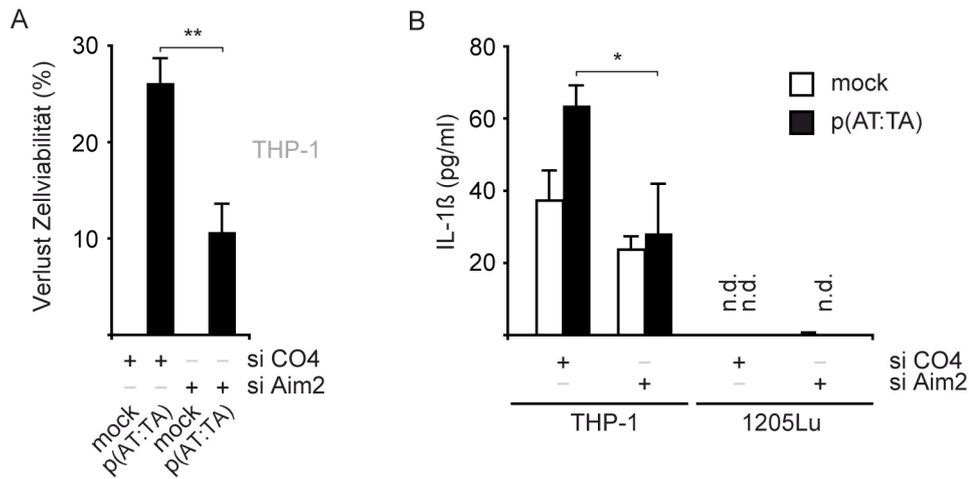
**C:** Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium) nach 18 h Stimulation mit p(AT:TA) bei CO4, Aim2 oder DAI/ZBP1 siRNA Vorbehandlung. Zusätzlich Darstellung der Proform sowie der bei Aktivierung entstehenden Schnittfragmente (p15/p17) der Caspase-3 im *Western blot*. Darstellung von  $\beta$ -Actin zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung von Protein. Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

Diese Versuche legen nahe, dass die beiden bisher bekannten zytosolischen DNA Rezeptoren DAI/ZBP1 bzw. Aim2 bei der Induktion von Zelltod durch transfizierte DNA in nicht-myeloiden Zellen keine Rolle spielen.

### 3.2.3 Myeloide und nicht-myeloide Zellen im Vergleich bei Transfektion von Fremd-DNA

Um zu unterstreichen, dass bezüglich der zytoplasmatischen DNA-Erkennung zwischen myeloiden und nicht-myeloiden Zellen tatsächlich ein grundsätzlicher Unterschied besteht, wurde nun versucht, die bereits für myeloide Zellen beschriebene wichtige Rolle von Aim2 in der Erkennung zytoplasmatischer DNA (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009) zu verifizieren. Es wurden dazu myeloide THP-1 Suspensionszellen mit Aim2 siRNA behandelt, daraufhin über Nacht mit Phorbol-12-Myristyl-13-Acetat (PMA) zu Makrophagen ausdifferenziert und anschließend erneut mit siRNA sowie zeitgleich für 18 h mit p(AT:TA) oder MVA wt bzw. MVA  $\Delta$ F1L stimuliert. Neben der üblichen Messung der metabolischen Zellviabilität wurde mittels ELISA zusätzlich ein Vergleich der IL-1 $\beta$  Produktion von THP-1 Zellen und 1205Lu Zellen angestellt.

**Abbildung 3.2.3 A** zeigt die Bestätigung der für myeloide Zellen beschriebenen Funktion von Aim2 in der Erkennung zytosolischer DNA. Die Messung der Zellviabilität nach Aim2-Suppression mittels siRNA ergab eine deutliche Reduktion der p(AT:TA)-induzierten Zelltodantwort in THP-1 Zellen, die bei nicht-myeloiden Zellen nicht beobachtet werden konnte. **Abbildung 3.2.3 B** bekräftigt weiter die ebenfalls bereits beschriebene wichtige Rolle von Aim2 in der IL-1 $\beta$  Zytokinproduktion in Makrophagen als Reaktion auf die Anwesenheit zytoplasmatischer DNA. Durch Unterdrückung der Genexpression von Aim2 mittels siRNA konnte die p(AT:TA)-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  in mit PMA vorbehandelten THP-1 Zellen annähernd auf Hintergrundproduktionsniveau verringert werden. Sehr eindrücklich war zudem die Zytokinantwort der zum Vergleich herangezogenen 1205Lu Zellen. Im Prinzip war hierbei weder bei Kontroll- noch bei mit Aim2-siRNA behandelten Zellen eine IL-1 $\beta$ -Produktion detektierbar, was in konsistenter Weise gegen ein funktionell wirksames Aim2-Inflammasom in 1205Lu Zellen und damit auch gegen die bereits in Makrophagen beobachtete Caspase-1 abhängige pyroptotische Zelltodform spricht.



**Abbildung 3.2.3 Apoptose und Interleukin-1 $\beta$ -Produktion durch transfizierte Fremd-DNA in myeloiden und nicht-myeloiden Zellen**

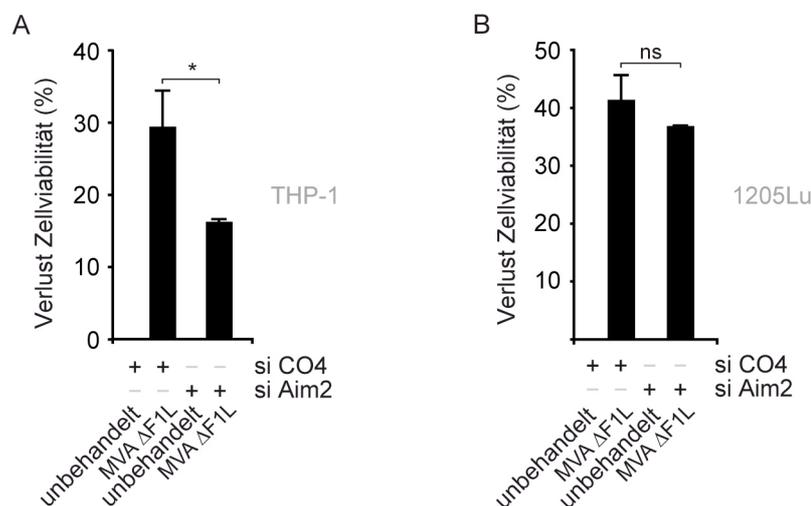
**A:** THP-1 Suspensionszellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M) oder Aim2 (20  $\mu$ M) siRNA behandelt. 4h nach siRNA Transfektion wurden die Zellen über Nacht mit PMA (100 nM) zu Makrophagen ausdifferenziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18 h mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng/ml) behandelt. Anschließend zur Messung von Zytokinen im ELISA Abnahme eines Teils des Überstands sowie Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium). Angezeigt Mittelwert + SEM von n=4 unabhängigen Versuchen.

**B:** Messung der IL-1 $\beta$ -Produktion von mit PMA ausdifferenzierten THP-1 Zellen und 1205Lu Zellen im ELISA nach 18 h Stimulation mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng/ml) bei CO4 (20  $\mu$ M) oder Aim2 (20  $\mu$ M) siRNA Vorbehandlung. Dargestellt jeweils die Zytokinproduktion der Kontrollzellen (weiße Balken) im Vergleich zu mit p(AT:TA) transfizierten Zellen (schwarze Balken). Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=4 unabhängigen Versuchen.

### 3.2.4 Myeloide und nicht-myeloide Zellen im Vergleich bei Infektion mit MVA-Virus

Zur abschließenden Untersuchung der Rolle von Aim2 in der Erkennung zytosolischer DNA wurden 1205Lu Zellen sowie THP-1 Zellen mit dem zytoplasmatisch replizierenden (Schepis et al., 2006) DNA-Virus MVA (*modified vaccinia virus Ankara strain*) infiziert und ihr Zelltodverhalten beobachtet. Dazu wurden die Zellen, wie in dieser Arbeit bereits mehrfach beschrieben, mit Aim2 siRNA vorbehandelt und daraufhin mit MVA Wildtyp oder einer MVA Mutante (soweit nicht anders angezeigt, im Folgenden bezeichnet als MVA  $\Delta$ F1L) infiziert, die das normalerweise als antiapoptotisches Bcl-2 Homolog exprimierte virale Protein F1L entbehrt und dadurch eine stärkere Zelltodantwort hervorruft (Boya et al., 2004).

In **Abbildung 3.2.4** bestätigen sich auch hinsichtlich der Infektion mit dem DNA-Virus MVA unterschiedliche Erkennungsmechanismen zwischen myeloiden und nicht-myeloiden Zellen. **Abbildung 3.2.4 A** zeigt, dass Aim2 depletierte THP-1 Zellen nach MVA  $\Delta$ F1L Infektion (Die Infektion erfolgte stets mit einem *multiplicity of infection* Level von 3, im Folgenden stets abgekürzt als 3 MOI) deutlich weniger sterben als lediglich mit CO4 Kontroll-siRNA behandelte, infizierte Zellen. In **Abbildung 3.2.4 B** dagegen bestätigt sich, dass Aim2 auch für den durch MVA-induzierten Zelltod in nicht-myeloiden Zellen keine Rolle spielt. 1205Lu Zellen, die entweder mit CO4- oder Aim2-siRNA vorbehandelt worden waren, zeigten hinsichtlich ihres Verhaltens nach darauf folgender MVA Infektion keine nennenswerten Unterschiede im Ausmaß des entstehenden Zelltods.



**Abbildung 3.2.4 Der durch MVA Infektion verursachte Zelltod geschieht in myeloiden Zellen abhängig, in nicht-myeloiden Zellen unabhängig von Aim2**

**A:** THP-1 Suspensionszellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M) oder Aim2 (20  $\mu$ M) siRNA behandelt. 4 h nach siRNA Transfektion wurden die Zellen über Nacht mit PMA (100 nM) zu Makrophagen ausdifferenziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18 h mit MVA  $\Delta$ F1L behandelt (3 MOI). Anschließend Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium). Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

**B:** 1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst für 48 h entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M) oder Aim2 (20  $\mu$ M) siRNA behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18 h mit MVA  $\Delta$ F1L behandelt (3 MOI). Anschließend Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium). Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=4 unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Versuche, dass myeloide und nicht-myeloiden Zellen bezüglich der Transfektion von DNA bzw. Infektion mit dem DNA-Virus MVA auf unterschiedliche Erkennungsmechanismen zurückgreifen.

In myeloiden THP-1 Zellen konnte die wichtige Rolle von Aim2 als Rezeptor bei zytosolischer DNA-Transfektion sowie MVA Infektion bestätigt werden. In nicht-myeloiden Zellen hingegen hatte Aim2 - wie bereits vorher in dieser Arbeit für transfizierte DNA beobachtet - keinen Einfluss auf den durch MVA Infektion bzw. transfizierte DNA verursachten Zelltod. Diese Unterschiede zeigten sich auch hinsichtlich der Produktion von IL-1 $\beta$  nach DNA-Transfektion, wobei bemerkenswerterweise bei 1205Lu Zellen eine IL-1 $\beta$  Produktion nie festzustellen war.

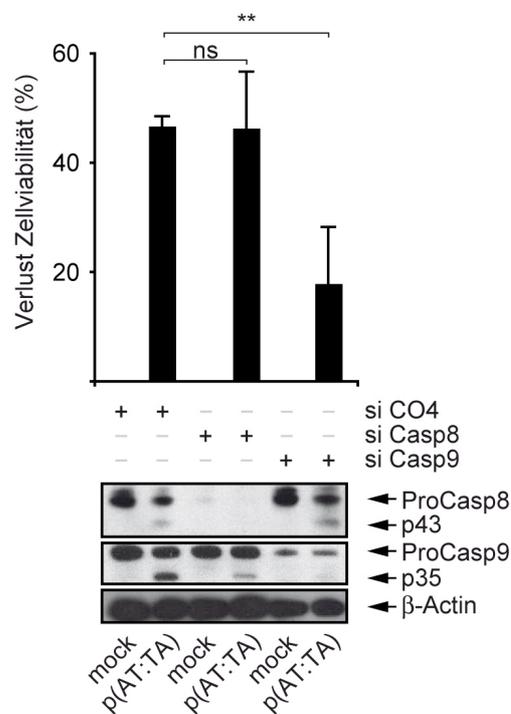
### **3.3 Rolle des Mitochondriums bei Stimulation mit Fremd-DNA oder MVA-Virus in nicht-myeloiden Zellen**

#### **3.3.1 Transfizierte Fremd-DNA verursacht mitochondriale Apoptose**

Bezüglich nicht-myeloider 1205Lu Zellen ist deutlich geworden, dass es sich bei dem durch transfizierte DNA verursachten Zelltod nicht um Pyroptose handeln kann, da 1205Lu Zellen und alle anderen in dieser Arbeit getesteten nicht-myeloiden Zellen kein funktionelles Inflammasom besitzen. Zusätzlich konnte eine Aktivierung von Caspase-3 gesichert werden. Deshalb sollte der beobachtete apoptotische Zelltod in nicht-myeloiden Zellen am Beispiel von 1205Lu Zellen näher untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen zur grundsätzlichen Einordnung zunächst entweder mit siRNA gegen Caspase-8, einer Initiatorcaspase des sogenannten extrinsischen Apoptoseweges, der über membranrezeptorgebundene Komplexe der TNF-Rezeptorfamilie ausgelöst wird (Ashkenazi, 2002; Mace and Riedl, 2010), oder gegen Caspase-9, einer Initiator-Caspase intrinsischer Apoptose, die über mitochondriale Todessignalwege abläuft (Bratton and Salvesen, 2010; Mace and Riedl, 2010), vorbehandelt und anschließend mit p(AT:TA) stimuliert.

**Abbildung 3.3.1** zeigt, dass in 1205Lu Zellen der durch p(AT:TA) ausgelöste Zelltod stark abhängig ist von Caspase-9. Caspase-8 hatte jedoch keinen Einfluss auf das Ausmaß der induzierten Apoptose. Dies zeigt, dass es sich beim beobachteten Zelltod

vorwiegend um mitochondriale, intrinsische Apoptose handelt. Um die *knock-down*-Effizienz der siRNAs zu belegen, wurde von denselben Zellbedingungen, die mittels Zellviabilitäts-Assay metabolisch gemessen worden waren, ein *Western blot* angefertigt, der in **Abbildung 3.3.1** unterhalb des Zellviabilitäts-Assays dargestellt ist. Dies bestätigte nicht nur die starke Herunterregulation der jeweiligen Caspase und damit den intensiven siRNA Effekt, sondern auch, dass unter Stimulationsbedingungen prinzipiell beide Caspasen aktiviert werden. Dies wurde durch das Auftreten von Schnittfragmenten der Caspase-Proformen deutlich (p43 bei Caspase-8, p35 bei Caspase-9). Trotz grundsätzlicher Aktivierung von Caspase-8 jedoch hat die Entfernung dieses Proteins aus der Signalkaskade keinen Effekt auf den ausgelösten Zelltod.



**Abbildung 3.3.1** Transfektion von Fremd-DNA induziert in nicht-myeloiden Zellen Apoptose in Abhängigkeit von Caspase-9

1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst für 48 h entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M), siRNA gegen Caspase-8 (20  $\mu$ M) oder Caspase-9 (20  $\mu$ M) behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18h mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng/ml) behandelt. Anschließend Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium).

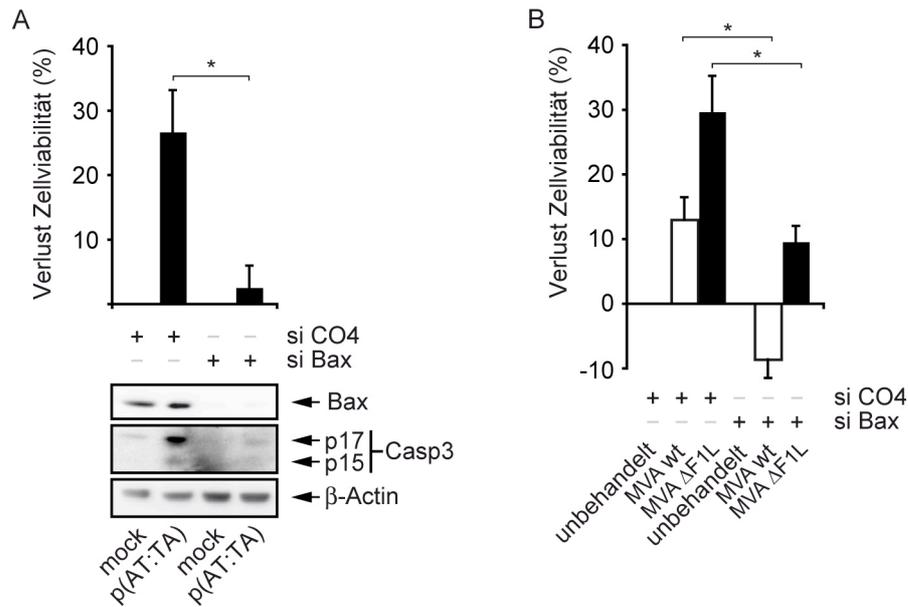
Im unteren Abschnitt Darstellung der Proform als auch der bei Aktivierung entstehenden Schnittfragmente (p43 bei Caspase-8, p37 bei Caspase-9) aktivierter Caspase-8 bzw. -9 im *Western blot* sowie  $\beta$ -Actin zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung von Protein. Geladen wurden jeweils 10-20  $\mu$ g pro Bedingung.

### 3.3.2 Fremd-DNA und MVA-Virus verursachen Apoptose in Abhängigkeit von Bax und Apaf-1

In **Abbildung 3.3.2.1** sowie **3.3.2.2** wurden die Ergebnisse bezüglich des intrinsischen Apoptosesignalpfades bestätigt durch die ebenfalls starke Beteiligung weiterer essentieller Proteine mitochondrialer Apoptose (Tait and Green, 2010). In **Abbildung 3.3.2.1** wurden 1205Lu Zellen mit siRNA gegen Bax (*Bcl-2-associated X protein*), einem für die Induktion mitochondrialer Apoptose wichtigen Protein in der äußeren Mitochondrienmembran, vorbehandelt und anschließend mit p(AT:TA) respektive MVA stimuliert. Die Vorbehandlung mit siRNA gegen Bax führte in **Abbildung 3.3.2.1 A** zu einer überaus starken Reduktion des Verlusts an Zellviabilität bei DNA-Transfektion.

Das erfolgreiche transiente Entfernen von Bax aus der Proteinsignalkaskade wurde im unteren Abschnitt der **Abbildung 3.3.2.1 A** durch die Anfertigung eines *Western blot* bestätigt. Der *Western blot* zeigte darüber hinaus unter Bedingungen mit supprimiertem Bax das Fehlen von Schnittfragmenten der Caspase-3, die von extrinsischen wie intrinsischen Apoptosesignalwegen aktiviert wird. Schnittfragmente, wie bei den Initiator-Caspasen-8 und -9 in dieser Arbeit bereits beschrieben, sind Zeichen einer Aktivierung der zuvor inaktiv vorliegenden Proform der jeweiligen Caspase. Jene Caspase-3 Schnittfragmente (p15/17) waren in der Kontrollbedingung deutlich auszumachen, wohingegen in der Bax siRNA Bedingung kaum mehr eine Aktivierung zu sehen war. Dies unterstrich die Rolle intrinsischer Apoptose in der Auslösung von Zelltod durch transfizierte DNA in nicht-myeloiden Zellen.

Derselbe Mechanismus zeigte sich bei 1205Lu Zellen, die statt mit DNA mit MVA stimuliert wurden. Auch hier zeigte sich, wie in **Abbildung 3.3.2.1 B** dargestellt, eine Reduktion des Verlusts an Zellviabilität unter Stimulationsbedingungen.



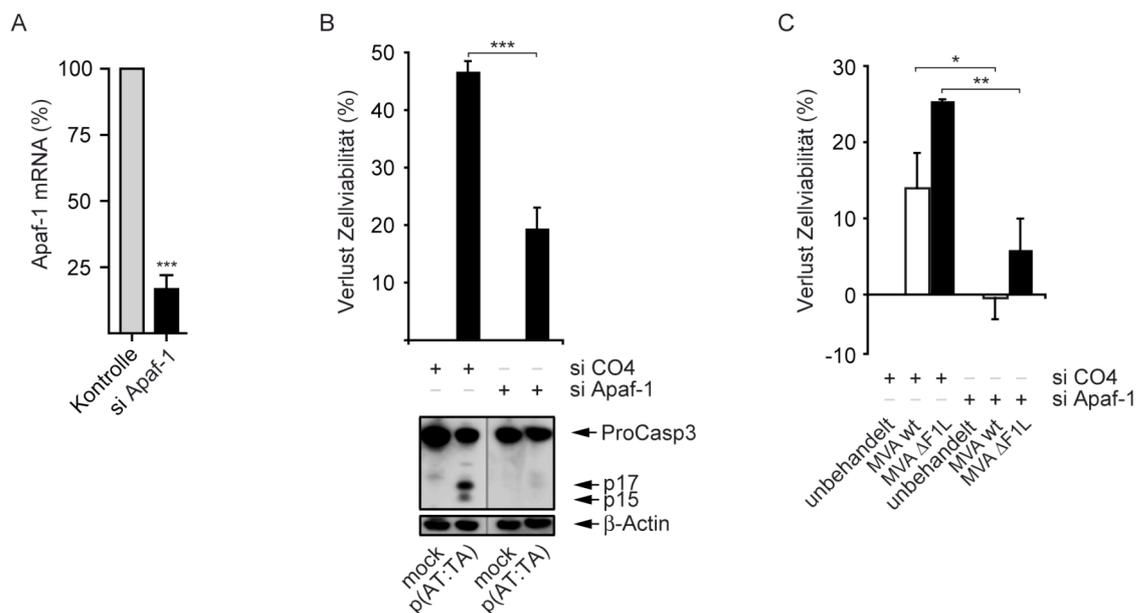
**Abbildung 3.3.2.1 Transfektion von Fremd-DNA oder MVA-Infektion induziert in nicht-myeloiden Zellen Apoptose in Abhängigkeit von Bax**

**A:** 1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst für 48 h entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M) oder siRNA gegen Bax (20  $\mu$ M) behandelt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18 h mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng/ml) behandelt. Anschließend Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium). Im Balkendiagramm angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

Im unteren Abschnitt Darstellung der Bax Proteinexpression bei Bax siRNA Behandlung im *Western blot* sowie der bei Caspase-3 Aktivierung entstehenden Schnittfragmente (p15 / p17) und  $\beta$ -Actin zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung von Protein.

**B:** siRNA Applikationsprocedere wie in A, Stimulation für 18h mit MVA wt oder MVA  $\Delta$ F1L (3 MOI). Anschließend Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium). Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

In **Abbildung 3.3.2.2** wurden 1205Lu Zellen mit siRNA gegen Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*), einem wichtigen Bestandteil des sogenannten Caspase-9 Apoptosoms, vorbehandelt und anschließend mit p(AT:TA) bzw. MVA stimuliert. **Abbildung 3.3.2.2 A** zeigt die *knock-down*-Effizienz der in dieser Abbildung verwendeten siRNAs gegen Apaf-1 im Vergleich zu CO4 Kontroll-siRNA behandelten Zellen unter Stimulationsbedingungen, erhoben mittels rt-PCR. Das Ausmaß der Herunterregulation von Apaf-1 belief sich durchschnittlich auf über 80 Prozent. Auch in diesen Experimenten zeigte sich (**Abbildung 3.3.2.2 B**), konsistent mit den bisherigen Beobachtungen dieser Arbeit, bei Vorbehandlung mit siRNA gegen Apaf-1 eine starke Reduktion des Verlusts an Zellviabilität unter Stimulationsbedingungen. Die unter Kontrollbedingungen auftretenden Schnittfragmente aktivierter Caspase-3 im darunter dargestellten *Western blot* verschwanden wie bei siRNA gegen Bax bei Vorbehandlung mit siRNA gegen Apaf-1 bei Transfektion mit DNA. Derselbe Mechanismus zeigte sich bei Zellen, die anstatt mit DNA mit MVA stimuliert wurden (**Abbildung 3.3.2.2 C**).



**Abbildung 3.3.2.2 Transfektion von Fremd-DNA oder MVA-Infektion induziert in nicht-myeloiden Zellen Apoptose in Abhängigkeit von Apaf-1**

**A:** Erzielte Knock-down-Effizienz der verwendeten Apaf-1 siRNA, bestimmt mit rt-PCR. Das Expressionsniveau wurde jeweils in Referenz zum Haushaltsgen bestimmt und ist in Prozent des Expressionslevels von mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen angegeben. Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

**B:** Oberer Abschnitt: 1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden für 48 h mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M) oder siRNA gegen Apaf-1 (20  $\mu$ M) behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und für 18 h mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng / ml) behandelt. Anschließend Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium). Im Balkendiagramm angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

Im unteren Abschnitt Darstellung der Proform als auch der bei Aktivierung entstehenden Schnittfragmente (p15 / p17) der Caspase-3 im *Western blot* sowie  $\beta$ -Actin zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung von Protein.

**C:** siRNA Applikationsprocedere wie in A, Stimulation für 18 h mit MVA wt oder MVA  $\Delta$ F1L (3 MOI). Anschließend Messung der Zellviabilität mittels *CellTiter-Blue* (5  $\mu$ l / 100  $\mu$ l Medium). Angezeigt Mittelwerte + SEM von n=3 unabhängigen Versuchen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Transfektion von p(AT:TA) sowie Infektion mit MVA zu mitochondrialer Apoptose führt. Die Hemmung der an intrinsischer Apoptose beteiligten Proteine Caspase-9, Bax und Apaf-1 mittels siRNA führte zu einer Verringerung des Verlusts an Zellviabilität sowie zum Unterbleiben der Aktivierung von Caspase-3 unter Stimulations- im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Caspase-8 vermittelte, extrinsische Apoptose hingegen spielt eine untergeordnete Rolle in der Zelltodinduktion durch p(AT:TA) oder MVA in nicht-myeloiden Zellen.

## 3.4 Rolle des DNA-Schadenerkennungssystems bei Apoptose durch zytoplasmatische Fremd-DNA oder MVA-Virus

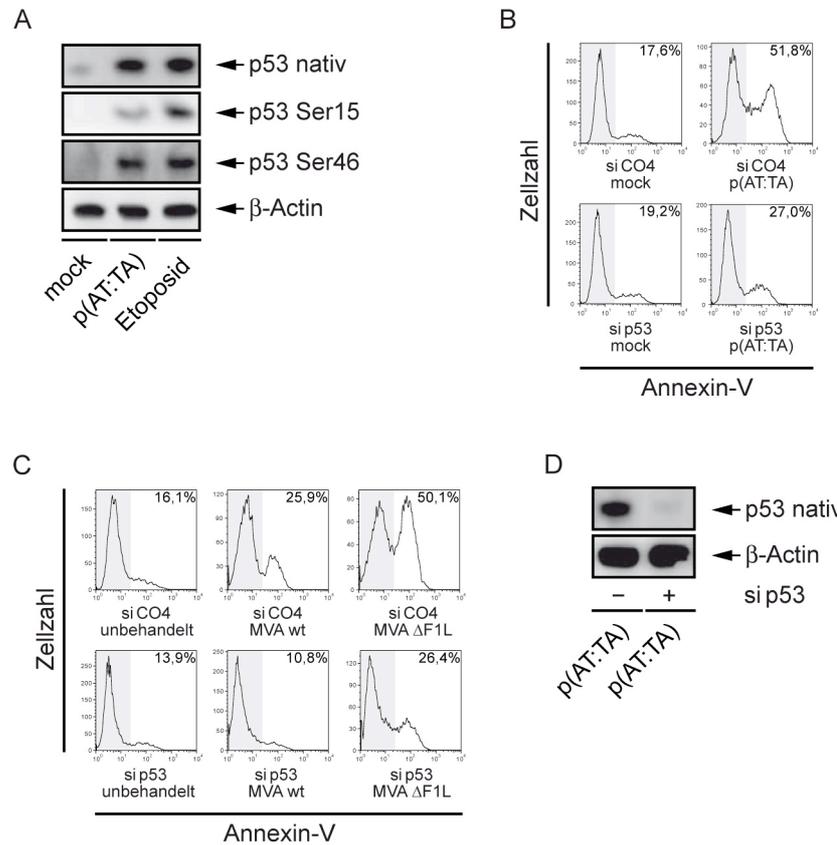
### 3.4.1 p53 vermittelt den durch transfizierte DNA oder MVA-Virus induzierten Zelltod

Es ist beschrieben, dass DNA-Viren wie beispielsweise HBV (Hepatitis-B-Virus), EBV (Epstein-Barr-Virus) oder Adenoviren p53-abhängige DNA-Schaden-Signalwege aktivieren, ja sogar aktiv ausnutzen können (Klein et al., 2010; Levine, 2009; Qu et al., 2009; Schwartz et al., 2009). Diese Viren jedoch entpacken ihr Genom ausschließlich im Zellkern und umgehen somit das Zellzytosol, wohingegen MVA im Zytoplasma repliziert (Schepis et al., 2006). Die Rolle von p53 Signalwegen nach MVA Infektion bzw. Stimulation mit zytosolischer, DNA ist bisher unbekannt und wurde daher im Folgenden getestet.

Zunächst wurde untersucht, ob p53 in Anwesenheit zytosolischer DNA aktiviert wird. Als Positivkontrolle wurde Etoposid genutzt, das zellgängig ist und bei Applikation zur Schädigung des Genoms von Zellen und infolgedessen zur Aktivierung des DNA-Schadenerkennungssystems und p53 führt. **Abbildung 3.4.1 A** zeigt einen *Western blot*, bei dem 4 Stunden nach Transfektion von p(AT:TA) bzw. Applikation von Etoposid das native Protein sowie Phosphorylierungen an Serin 15 als auch Serin 46 von p53 gemessen wurden. Die untersuchten Serine befinden sich in der Transaktivierungsdomäne von p53 (Kruse and Gu, 2009). Es zeigte sich, dass in Anwesenheit zytosolischer DNA oder bei Applikation von Etoposid sowohl die Expression von p53 ansteigt als auch Phosphorylierungen an Serin 15 und Serin 46 auftreten.

Nach der Sicherung des Verdachts, dass p53 in Anwesenheit zytosolischer DNA aktiviert wird, wurde nun der Frage nachgegangen, ob p53 bei der Auslösung von Zelltod durch die Transfektion von p(AT:TA) oder Infektion mit MVA eine Rolle spielt. Dazu wurden 1205Lu Zellen nach dem in dieser Arbeit bereits ausführlich beschriebenen Prinzip mit p53 siRNA vorbehandelt, anschließend mit p(AT:TA) oder MVA stimuliert und 18 h später durchflusszytometrisch auf Apoptose hin analysiert. **Abbildung 3.4.1 B** und **Abbildung 3.4.1 C** verdeutlichen, dass die Vorbehandlung der Zellen mit p53 siRNA zu einer starken Reduktion des induzierten Zelltods gegenüber

solchen Zellen führte, die nur mit CO4 Kontroll-siRNA vorbehandelt worden waren. Dies galt gleichermaßen für die Transfektion von p(AT:TA) sowie Infektion mit MVA. **Abbildung 3.4.1 D** veranschaulicht die effiziente Herunterregulation von p53 durch die in den Experimenten verwendete p53 siRNA mittels *Western blot*.



**Abbildung 3.4.1 p53 vermittelt den durch p(AT:TA) oder MVA induzierten Zelltod**

**A:** Darstellung von nativem bzw. an Serin 15 oder 46 phosphoryliertem p53 4 h nach Transfektion mit p(AT:TA) (4000 ng/ml) oder Applikation von Etoposid (50  $\mu$ M).  $\beta$ -Actin zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung von Protein.

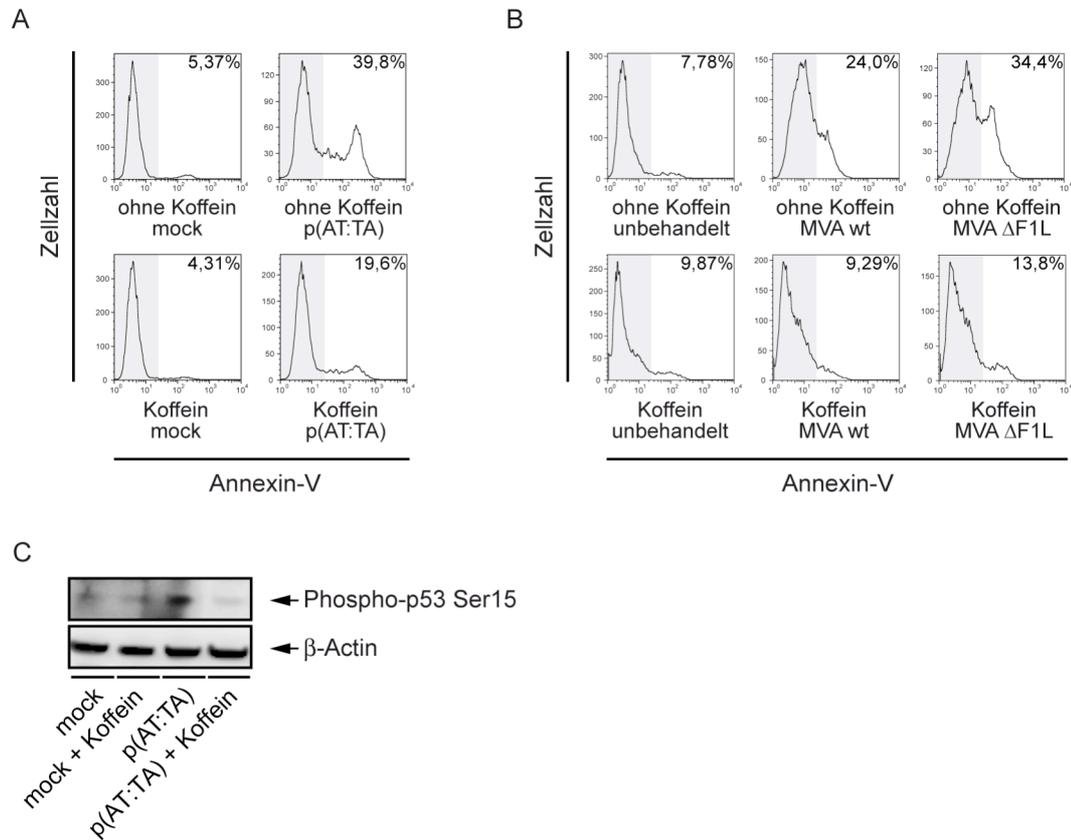
**B und C:** 1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden zunächst für 48 h entweder mit Kontroll-siRNA CO4 (20  $\mu$ M) oder siRNA gegen p53 (20  $\mu$ M) behandelt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen erneut mit siRNA versehen und gleichzeitig für weitere 18 h mit komplexiertem p(AT:TA) (4000 ng/ml) oder mit MVA (3 MOI) stimuliert. Durchflusszytometrische Messung auf Apoptose 18 h nach Transfektion. Angezeigt jeweils repräsentative Histogramme eines Versuchs von n=3 unabhängigen Versuchen mit äquivalenten Ergebnissen.

**D:** Darstellung von nativem p53 zur Sicherung der *knock-down*-Effizienz der verwendeten p53 siRNA (20  $\mu$ M) im *Western blot*.  $\beta$ -Actin zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung von Protein.

### 3.4.2 ATM/ATR-Signalwege kontrollieren den durch transfizierte DNA oder MVA-Virus induzierten Zelltod

Die Entdeckung der Phosphorylierung von p53 bei Anwesenheit zytosolischer DNA war in dieser Arbeit insbesondere hinsichtlich des Serins 15 von großem Interesse, da diese Modifikation neben anderen von den Proteinen ATM/ATR (*ataxia telangiectasia-mutated* / *ataxia telangiectasia-mutated and RAD3-related*) bewerkstelligt wird. Diese Kinasen spielen für die Erkennung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen genomischer DNA eine maßgebliche Rolle (Bode and Dong, 2007; Eriksson and Stigbrand, 2010; He et al., 2003; Roos and Kaina, 2006). Die Beobachtung der Phosphorylierung von p53 an Serin 15 führte zu der Vermutung, dass das zelleigene DNA-Schadenerkennungssystem rund um ATM/ATR auch im Netzwerk der angeborenen Immunität bei der Detektion mikrobieller Nukleinsäuren im Zytoplasma von Bedeutung sein könnte.

Um dies zu untersuchen, wurden 1205Lu Zellen für zwei Stunden mit Koffein vorbehandelt oder unvorbehandelt belassen und anschließend mit p(AT:TA) transfiziert oder MVA infiziert. Koffein ist ein Trimethylxanthin, das experimentell als Inhibitor für das DNA-Schadenerkennungssystem genutzt wird und als dessen molekulare Ziele die genannten Kinasen ATM/ATR gelten (Bode and Dong, 2007; Sabisz, 2008). Wie in **Abbildung 3.4.2** dargestellt, führte die Vorbehandlung mit Koffein zu einer drastischen Reduktion der durchflusszytometrisch gemessenen Apoptose bei Transfektion mit p(AT:TA) (**Abbildung 3.4.2 A**) oder Infektion mit MVA (**Abbildung 3.4.2 B**) im Gegensatz zu solchen Zellbedingungen, die unvorbehandelt stimuliert worden waren. Auch die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 wurde durch Koffein bei Stimulation mit p(AT:TA) klar inhibiert (**Abbildung 3.4.2 C**).



**Abbildung 3.4.2 Koffein inhibiert die durch transfizierte Fremd-DNA und MVA induzierte Apoptose durch Blockade von ATM/ATR**

**A und B:** 1205Lu Zellen (70.000 / 500  $\mu$ l, 24-Well Format) wurden für 2 h mit Koffein (5 mM) vor-behandelt oder unbehandelt belassen. Im Anschluss Stimulation mit p(AT:TA) (4000 ng/ml) oder MVA (3 MOI). Durchflusszytometrische Analyse 18 h nach der Stimulation. Angezeigt jeweils repräsentative Histogramme eines Versuchs von n=3 unabhängigen Versuchen mit äquivalenten Ergebnissen.

**C:** Darstellung von Phospho-p53 (Serin 15) mit oder ohne Koffein (5 mM) Vorbehandlung 4 h nach Transfektion von p(AT:TA) (4000 ng/ml) im *Western blot*.  $\beta$ -Actin zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung von Protein.

Abschließend zusammengefasst, bestätigen die in diesem Abschnitt durchgeführten Experimente die Vermutung, dass das DNA-Schadenerkennungssystem, im Speziellen p53 sowie ATM/ATR involvierende Signalwege, an der Erkennung zytoplasmatischer DNA sowie MVA beteiligt ist. Es scheint demnach neben seiner so wichtigen Rolle in der Erkennung genomischer DNA Schäden auch einen Teil des antimikrobiellen Abwehrschirms einer Zelle zu bilden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Ergebnisübersicht

In Zusammenschau zeigt diese Arbeit, dass die untersuchten nicht-myeloiden Zellen nur geringe Mengen des kürzlich identifizierten zytoplasmatischen DNA Rezeptors Aim2 aufweisen bzw. diesen gänzlich entbehren. Darüber hinaus wird klar, dass weitere essentielle Komponenten des sogenannten Aim2-Inflammasoms in diesen nicht-myeloiden Zellen nicht exprimiert werden. Allerdings sterben diese Zellen - wie bereits für myeloide Zellen beschrieben - in Anwesenheit zytosolischer DNA oder bei Infektion mit dem DNA-Virus MVA. Der in dieser Arbeit beobachtete Zelltod trägt dabei Merkmale mitochondrialer Apoptose. Er wird von apoptotischen Zellmembranlipidalterationen sowie der Aktivierung der Effektor-Caspase-3 begleitet und ist abhängig von BAX, Apaf-1 sowie Caspase-9. Er geschieht jedoch unabhängig von bekannten Komponenten des durch zytosolische DNA aktivierten Interferonsignalnetzwerkes (IFNAR, IRF-3, STING, DAI/ZBP-1) und ist unabhängig vom Aim2-Inflammasom, das in myeloiden Zellen bei DNA-Transfektion und MVA Infektion entscheidend ist für die Caspase-1 abhängige Produktion von aktivem IL-1 $\beta$  sowie Pyroptose. Desweiteren zeigt diese Arbeit für nicht-myeloide 1205Lu Zellen, dass p53 bei Transfektion von p(AT:TA) in seiner Transaktivierungsdomäne phosphoryliert wird. Durch Herunterregulation von p53 mittels siRNA kann der durch p(AT:TA) oder MVA ausgelöste Zelltod signifikant reduziert werden. Die Blockade von ATM/ATR Signalwegen durch Koffein führt in nicht-myeloiden Zellen schließlich zur Inhibition von Phosphorylierungen an p53 sowie zu einem deutlichen Überlebensvorteil nach DNA Transfektion oder Infektion mit MVA.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden innerhalb der Arbeitsgruppe durch die Promotionsarbeit von Herrn Michael Wunderlich bestätigt, ergänzt und weitergeführt. Die auf Grund der hier vorliegenden Ergebnisse entstandene Vermutung, dass Komponenten des DNA-Schadenerkennungssystems bei der Apoptoseauslösung durch mikrobielle Fremd-DNA eine Rolle spielen, wurde dadurch weiter bestärkt. Die Resultate jener Arbeit möchte ich daher an dieser Stelle kurz aufführen, um die Diskussion klarer und aktueller ausgestalten zu können.

Die Experimente von Herrn Wunderlich belegen, dass ATM nach Stimulation mit p(AT:TA) oder MVA phosphoryliert bzw. aktiviert wird. Die Inhibierung von ATM/ATR

mit Hilfe von siRNA zeigte die Abhängigkeit des durch zytosolische DNA bzw. MVA induzierten Zelltodes von diesen Proteinen. FACS- sowie Zellviabilitäts-Analysen zeigten bei Stimulation einen klaren Überlebensvorteil von Zellen, die mit ATM/ATR siRNA vorbehandelt worden waren, gegenüber solchen, die lediglich mit CO4 Kontroll-siRNA vorbehandelt worden waren. Desweiteren konnte neben Aim2 ein weiterer erst kürzlich beschriebener Mechanismus der zytosolischen Erkennung von immunstimulatorischer DNA hinsichtlich einer substantiellen Bedeutung für den in dieser und Herrn Wunderlichs Dissertation beobachteten Zelltod ausgeschlossen werden. Die Inhibition des RNA Polymerase III - RIG-I abhängigen Erkennungsmechanismus von DNA (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009) führte zwar zu einer Hemmung der Interferon-Produktion von p(AT:TA), nicht aber zu einer Inhibition des durch p(AT:TA) induzierten Zelltodes in nicht-myeloiden Zellen.

## 4.2 Ergebnisinterpretation

Bei Infektion mit einem Pathogen, das DNA trägt, wird diese als molekulares Muster vom wirtseigenen Immunsystem erkannt, wobei sich myeloide Zellen wie Makrophagen, aber wohl sehr viel häufiger nicht-myeloide Zellen solchen Angriffen ausgesetzt sehen. Nicht-myeloide Zellen bilden unsere Körperoberflächen, welche ihrerseits die primären Angriffsflächen für eindringende Keime darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nicht-myeloide Zellen in der Lage sind, fremde DNA, mit der sie konfrontiert werden, erkennen zu können und dadurch eine Aktivierung des Interferonsystems sowie Zelltod ausgelöst wird.

Um festzustellen, ob das aktivierte Interferonsystem und der induzierte Zelltod in Zusammenhang stehen, wurden mehrere essentielle Komponenten (IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*), IFNAR (*interferon- $\alpha$  receptor*), STING (*stimulator of Interferon genes*)) des Interferonsystems in nicht-myeloiden 1205Lu Zellen mittels siRNA herunterreguliert und die Zellen nach Transfektion von p(AT:TA) sowie Infektion mit dem DNA-Virus MVA auf Zelltod hin untersucht. Die Ergebnisse zeigten keinen Einfluss des Interferonnetzwerkes auf den beobachteten Zelltod. Dies steht in Kontrast zu zwei kürzlich veröffentlichten Studien, in denen der durch zytosolische DNA oder MVA Infektion ausgelöste Zelltod abhängig ist von IRF-3 (Chattopadhyay et al., 2011; Eitz Ferrer et al., 2011). Ferrer et. al hatten für ihr Resultat, dass der durch MVA Infektion induzierte Zelltod abhängig von IRF-3 ist, hauptsächlich Zellen von IRF-3 *knock-out*-

Mäusen verwendet, die ursprünglich von Taniguchi's Gruppe generiert worden waren (Sato et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um Chattopadhyay hatte eine humane Fibroblastenzelllinie mit poly(dAdT:dAdT) transfiziert, die ein shRNA Konstrukt tragen, das humanes IRF-3 zum Ziel hat. Chattopadhyay et al. hatten für ihre Untersuchungen darüber hinaus ebenfalls IRF-3 *knock-out*-Mäuse aus Taniguchi's Arbeitsgruppe genutzt. Diese hatte jedoch schon 2009 publiziert, dass bei der Erzeugung der IRF-3 *knock-out*-Maus versehentlich eine *double-knock-out*-Maus entstanden war (Nakajima et al., 2009). Ihr fehlte nicht nur das Gen für IRF-3, sondern zusätzlich das direkt angrenzende und mit IRF-3 überlappende Gen für das antiapoptotische Bcl-2-ähnliche Protein Bcl2L12. In derselben Publikation wurde gezeigt, dass bei Re-Expression von IRF-3 in diesen Mäusen ein intaktes Interferonsystem wiederhergestellt werden konnte, zur Inhibition des durch poly(dAdT:dAdT) Transfektion verursachten Zelltods jedoch die Re-Expression von Bcl2L12 notwendig war. Bei näherer Betrachtung der Studie von Chattopadhyay et al. ergab sich überraschenderweise, dass in der verwendeten Fibroblastenzelllinie die Ziel-mRNA Sequenz des shRNA Konstrukts gegen IRF-3 zu 100 Prozent auch die mRNA des benachbarten Bcl2L12 Gens zum Ziel hatte. Es scheint also, dass beide Studien zumindest in Teilen versehentlich IRF-3 eine Rolle in der Zelltodinduktion durch zytosolische DNA zugeschrieben haben, die durch Bcl2L12 ausgefüllt wird. Dies könnte die widersprüchlichen Daten der beiden Studien und dieser Arbeit erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Zelltodantwort auf zytoplasmatische DNA in myeloiden und nicht-myeloiden Zellen unterschiedlich ausfällt. Für myeloide Zellen wurde bei DNA-Transfektion sowie MVA Infektion kürzlich ein pyroptotischer Zelltod (Bergsbaken et al., 2009; Duprez et al., 2009; Fink and Cookson, 2006; Labbe and Saleh, 2008) beschrieben (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009), der kritisch abhängig ist vom vor kurzem identifizierten, zytoplasmatischen DNA-Rezeptor Aim2. Aim2 ist durch ungerichtete Screens und der Komposition seiner Domänen gefunden worden (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009), die auf seine Rolle in einer von DNA abhängigen Inflammasom-Aktivierung hindeuteten. Bisher ist keine umfassende Analyse bezüglich der Expression von Aim2 in unterschiedlichen Zelltypen vorgenommen worden. Durch unsere Ergebnisse nun ist es in Zusammenschau mit der beschriebenen Gewebs- bzw. Organverteilung von Aim2 (DeYoung et al., 1997) sehr wahrscheinlich, dass Aim2 nur in einer limitierten Anzahl von Zelltypen vorkommt beziehungsweise funktionsfähig vorliegt. Die gleichzeitige

Expression von ASC, Caspase-1 und Aim2 - die Komponenten eines funktionstüchtigen Aim2-Inflammasoms also - beschränkt sich wohl auf myeloide Zelltypen (Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen u.a.). Die Expression all dieser Komponenten aber ist sowohl nötig, um aktives IL-1 $\beta$  zu bilden, als auch um einen pyroptischen Zelltod auslösen zu können. Um die Bildung von aktivem IL-1 $\beta$  bei DNA-Transfektion in nicht-myeloiden Zellen erst möglich zu machen, mussten die beschriebenen Inflammasom Komponenten in HEK293 Zellen künstlich exprimiert werden (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2010), da sie unter Normalbedingungen nicht vorlagen.

Die Resultate dieser Arbeit stützen die Beobachtung, dass Aim2 beim in myeloiden Zellen durch zytoplasmatische DNA ausgelösten Zelltod eine wichtige Rolle spielt (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2010; Hornung et al., 2009). Nicht-myeloide Zellen jedoch nutzen den Daten dieser Dissertation zufolge in Anwesenheit zytoplasmatischer, immunstimulatorischer DNA andere Mechanismen zur Zelltodinduktion. Sie erfolgt unabhängig vom Aim2-Inflammasom.

Es wurde herausgearbeitet, dass bei der Vermittlung des durch transfizierte DNA bzw. MVA Virusinfektion induzierten Zelltods in nicht-myeloiden 1205Lu Zellen das Mitochondrium im Mittelpunkt steht. Mehrere wichtige Komponenten mitochondrialer Apoptose stellten sich als bedeutend für die beobachteten apoptotischen Vorgänge heraus. Bax siRNA Vorbehandlung konnte den verursachten Zelltod bei Stimulation im Vergleich zu Kontrollzellen mehr als halbieren, ebenso Apaf-1. Die Herunterregulierung von Caspase-9 als essentiell Baustein des Apoptosoms, gebildet aus Caspase-9 zusammen mit Apaf-1 und Cytochrom C (Bratton and Salvesen, 2010; Kumar, 2007), führte zu vergleichbaren Effekten. Interessanterweise wurde Caspase-8, die primär über membrangebundene Rezeptoren der TNF- (Tumor Nekrose Faktor) Familie aktiviert wird (Ashkenazi, 2002), bei Stimulation mit p(AT:TA) ebenfalls aktiviert. Das bloße Hinzugeben von DNA ohne Transfektionsreagenz sowie Überstände von stimulierten Zellen allerdings konnten nach Übertragung auf unbehandelte Zellen keine Apoptose auslösen. Es fand also weder eine direkte Stimulation der TNF-Rezeptorfamilie durch hinzugegebene, unkomplezierte DNA statt noch indirekt durch TNF-Rezeptoren aktivierende Moleküle in Überständen von zuvor mit DNA transfizierten Zellen. Demnach geschah die von uns beobachtete Aktivierung von Caspase-8 nicht primär über Zellmembranrezeptoren, sondern eher über *cross-talk*- und *feedback*-Mechanismen, beispielsweise über durch mitochondriale Apoptose

aktivierte Caspase-3, die ihrerseits Caspase-8 aktivieren kann (Wieder et al., 2001). Diese Daten verdeutlichten zudem, dass das tatsächliche Gelangen der immunstimulatorischen DNA in die Zelle von zentraler Bedeutung für die Auslösung des beobachteten Zelltods war.

Nach Transfektion von immunstimulatorischer DNA in Makrophagen wird neben Caspase-1 auch Caspase-3 aktiviert (Roberts et al., 2009). Unsere Beobachtung, dass MVA  $\Delta$ F1L - das Virus entbehrt das normalerweise als antiapoptotisches Bcl-2-Homolog exprimierte virale Protein F1L und führt dadurch als Konsequenz einer geringeren Hemmung mitochondrialer Apoptose zu einem stärkeren Zelltod (Boya et al., 2004) - in nicht-myeloiden, allerdings auch in myeloiden THP-1 Zellen eine stärkere Zelltodinduktion zur Folge hat, lässt vermuten, dass mitochondriale Apoptose auch in myeloiden Zellen von Bedeutung ist. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass der in Makrophagen induzierte Zelltod nach DNA-Transfektion lediglich partiell durch Depletion von Aim2 verhindert werden konnte (Fernandes-Alnemri et al., 2009). Mitochondriale Apoptose sowie durch Aim2 vermittelte Pyroptose könnten sich also in myeloiden Zellen ergänzen. Nicht dargestellten Befunden dieser Arbeit zufolge zeigten sich in Bezug auf Zelltodinduktion auch myeloide THP-1 Zellen resistenter gegenüber Stimulation mit DNA bzw. MVA Virus Infektion, wenn die mitochondrialen Proteine Bax und Apaf-1 mittels siRNA herunterreguliert wurden.

Es ist, wie in dieser Arbeit bereits erläutert wurde, bekannt, dass nukleär replizierende DNA-Viren wie beispielsweise HBV (Hepatitis-B-Virus), EBV (Epstein-Barr-Virus) oder Adenoviren p53 abhängige DNA-Schaden-Signalwege aktivieren und teils sogar zu ihrem Vorteil nutzen (Klein et al., 2010; Levine, 2009; Qu et al., 2009; Schwartz et al., 2009). In Bezug auf ausschließlich zytoplasmatisch replizierende Poxviren (Schepis et al., 2006) ist beschrieben worden, dass beispielsweise überexprimierte Vaccinia B1 Kinase, deren Äquivalent in Säugetieren als VRK1 (*mammalian vaccinia-related kinase 1*) bezeichnet wird, p53 phosphorylieren kann und so zu seinem Abbau führt (Santos et al., 2004). Die Situation bezüglich der Aktivierung des DNA-Schadenerkennungssystems bei Infektion mit MVA, das in dieser Arbeit als Modellvirus verwendet wurde, ist weitgehend unklar. Gleichwohl wurde für MVA seine DNA als entscheidendes zytoplasmatisches Mustererkennungsmerkmal beschrieben (Fernandes-Alnemri et al., 2010; Hornung et al., 2009; Rathinam et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Rolle des DNA-Schadenerkennungssystems in der Immunabwehr bei DNA-Transfektion sowie MVA

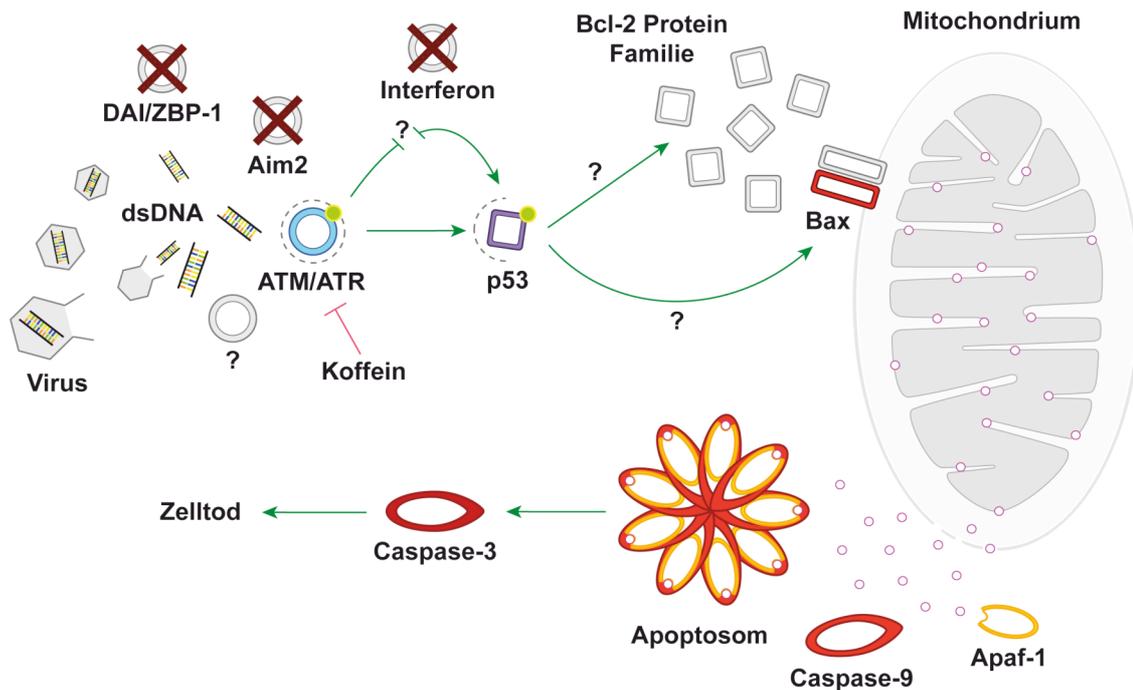
Infektion hin. Dieses System ist nach klassischem Verständnis rund um beschädigte Strukturen des Genoms, also primär im Zellkern aktiv (Eriksson and Stigbrand, 2010; Roos and Kaina, 2006). Die Rolle des DNA-Schadenerkennungssystems oder dessen Signalkomponenten im Zytoplasma ist wenig erforscht. Es gibt jedoch Hinweise, dass beispielsweise ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) neben seiner Präsenz im Zellkern nicht nur ebenfalls im Zytoplasma anwesend, sondern auch aktiv ist (Hinz et al.; Li et al., 2009). Im Hinblick auf p53 und seiner zytoplasmatischen Funktionen gibt es bereits einen sehr viel profunderen Wissensstand (Green and Kroemer, 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass p53 nach DNA-Transfektion in seiner Transaktivierungsdomäne phosphoryliert wird. Mit p53 siRNA vorbehandelte Zellen zeigten darüber hinaus einen deutlich reduzierten Zelltod nach DNA-Transfektion sowie Virusinfektion im Vergleich zu Kontrollzellen. Durch Versuche mit dem ATM-Inhibitor Koffein konnte in nicht-myeloiden Zellen gezeigt werden, dass die ATM/ATR Kinasefamilie (*ataxia telangiectasia mutated / ataxia telangiectasia and Rad3 related*) (Eriksson and Stigbrand, 2010; Roos and Kaina, 2006) von wichtiger Bedeutung für den beobachteten Zelltod bei DNA-Transfektion sowie MVA Infektion ist. Die Gabe von Koffein führte zur Blockade der zuvor beobachteten Phosphorylierung von p53 und konnte den ausgelösten Zelltod stark reduzieren. Durch Vorbehandlung der Zellen mit p53 siRNA konnte der Zelltod ebenfalls stark verringert werden. Dass das DNA-Schadenerkennungssystem tatsächlich an der Erkennung mikrobieller Nukleinsäuren beteiligt sein könnte, wird durch die Ergebnisse der weiter oben diskutierten Studien von Chattopadhyay et al. sowie Ferrer et al. noch bestärkt. Bcl2L12 nämlich, das wohl anstatt IRF-3 eine wichtige Funktion in der Induktion von Zelltod durch zytoplasmatische DNA innehat (Nakajima et al., 2009), scheint mit p53 zu interagieren (Stegh and DePinho, 2011), was sehr gut zu den Ergebnissen dieser Arbeit passt. Insgesamt ist die Funktion von Bcl2L12 allerdings noch nicht hinreichend erforscht, weshalb hierfür noch eingehendere Untersuchungen nötig sind. Für zukünftige Studien zur Rolle des DNA-Schadenerkennungssystems sei auch erwähnt, dass in vielen Zelllinien wie zum Beispiel die von Ferrer et al. verwendeten HeLa Zellen, p53-Signalwege inaktiviert sind. Dadurch werden durch p53 vermittelte Effekte maskiert.

Die tatsächlichen molekularen Eigenschaften, anhand deren immunstimulatorische DNA von intrazellulären DNA Rezeptoren erkannt wird, sind, abgesehen von der Tatsache, dass die DNA doppelsträngig vorliegen muss, bisher nicht entschlüsselt. Erst kürzlich allerdings wurde interessanterweise RNA-Polymerase III als Sensor für

transfiziertes poly(dA:dT), verschiedene Herpesviren sowie Legionella pneumophila beschrieben (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009). Den Beobachtungen zufolge wurde hierbei intrazelluläre DNA von RNA-Polymerase III in 5'-Triphosphat tragende RNA umgeschrieben, die ihrerseits durch RIG-I erkannt wurde. Die dadurch induzierte Generierung von Interferon hing hierbei kritisch von RNA-Polymerase III ab. Diese Veröffentlichung ließ die Vermutung zu, dass zytoplasmatisch transfizierte DNA einen RIG-I abhängigen Zelltod auslösen könnte. Dem zuwider steht jedoch, dass RIG-I vermittelte Apoptose bisher als von p53 unabhängig beschrieben wurde (Besch et al., 2009), wohingegen unsere Untersuchungen des in dieser Arbeit beschriebenen Zelltods eine klare Abhängigkeit von p53 ergeben. Weiterhin führte die Inhibition von RNA-Polymerase III in der Weiterführung dieser Dissertation durch Herrn Wunderlich zu keiner relevanten Reduktion des durch zytosolische DNA ausgelösten Zelltods. Die Herunterregulation von RIG-I schließlich hatte bei Transfektion von poly(dAdT:dAdT) einen starken Einfluss auf das Interferonsystem, da die Sekretion des interferonabhängig produzierten Proteins IP-10 kritisch zurückging. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss auf den induzierten Zelltod. Dies deutet neben einer untergeordneten Rolle des Interferonsystems hinsichtlich des durch zytosolische DNA ausgelösten Zelltods auch darauf hin, dass in Zellen eingeschleuste DNA tatsächlich auch direkt als PAMP erkannt wird und nicht ausschließlich indirekt über seine RNA-Transkripte.

**Abbildung 4.2** soll einen letzten Überblick über den in dieser Arbeit erreichten Kenntnisstand des identifizierten Signalweges bei DNA-Transfektion sowie MVA Virusinfektion geben.



**Abbildung 4.2** Kenntnisstand des durch transifizierte DNA oder MVA-Virus Infektion induzierten Zelltods in nicht-myeloiden Zellen

Alle farblich markierten Proteine der Abbildung wurden in dieser Arbeit hinsichtlich des durch DNA (dsDNA) oder MVA Virus (MVA) ausgelösten Zelltods als dafür notwendig ausgemacht oder ausgeschlossen (dann gekennzeichnet mit **X**). Mit gestrichelten Kreisen (○) wurden Proteine gekennzeichnet, deren Rolle in dieser Arbeit nur teilweise (p53) bzw. gänzlich (ATM/ATR) in weiterführender Arbeit eruiert wurde. Transifizierte DNA bzw. MVA Virus führen zur Phosphorylierung (●) und Aktivierung (→) von ATM/ATR. Dies wiederum führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von p53. Es wird eine Bax abhängige, mitochondriale Apoptose ausgelöst, die von Caspase-9 und Apaf-1 abhängt und über die Aktivierung von Caspase-3 schließlich zum Zelltod führt. Dieser Zelltod wird durch die Hemmung von ATM/ATR mittels Koffein inhibiert (—|). Cytochrom C dargestellt als ○.

### 4.3 Offene Fragen

Insgesamt bekräftigen die Ergebnisse dieser und der auf dieser Arbeit aufbauenden Dissertationsarbeit die Hinweise, dass das System um ATM/ATR und p53 an der Erkennung mikrobieller DNA beteiligt ist, beschreibt seine Rolle allerdings zum ersten Mal als zytoplasmatisches Verteidigungsnetzwerk gegen mikrobielle Eindringlinge.

Es gilt, die verbliebenen Lücken im identifizierten Signalweg weiter zu füllen, so zum Beispiel die Frage, wie genau die mitochondriale Apoptose beim hier beobachteten Zelltod über p53 ausgelöst wird. Es ist beschrieben worden, dass zytoplasmatisches

p53 Bax direkt binden, aktivieren und mitochondriale Apoptose auslösen kann (Chipuk et al., 2004; Chipuk et al., 2003; Mihara et al., 2003). Ob dies auch hier der Fall ist oder eine indirekte Aktivierung über andere Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie erfolgt, bleibt vorerst im Unklaren.

Darüber hinaus bedarf es weiterführender Untersuchungen zur genauen Identifizierung der an der Erkennung von zytoplasmatischer DNA beteiligten Rezeptoren. Stellt der klassischerweise oberhalb der ATM/ATR Kinasen in der DNA-Schadenserkennung angesiedelte MRN-Proteinkomplex (MRE11-RAD50-NBS1-Komplex) den tatsächlichen Erkennungskomplex zytosolisch erscheinender Fremd-DNA dar? Welche Proteine sind die direkten Interaktionspartner dieser Fremd-DNA? MRE11 und RAD50 beispielsweise verfügen beide über DNA-Interaktionsdomänen (Assenmacher and Hopfner, 2004; Riches et al., 2008). Geschieht die direkte Erkennung über unbekannte Rezeptorproteine? Tiefgreifendere Studien sind nötig, um zu entschlüsseln, an welcher spezifischen Lokalisation und mit welchen molekularen Mechanismen Fremd-DNA in Zellen durch das DNA-Schadenerkennungssystem detektiert wird. Während Inflammasome nur in wenigen Zelltypen funktionsfähig sind, gehört das DNA-Schadenerkennungssystem zur Ausstattung einer jeden Zelle unseres Körpers. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem hier beschriebenen Signalweg um einen Teil eines im humanen Organismus ubiquitär eingesetzten Abwehrmechanismus von Krankheitserregern handelt.

## 5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem stellt bei einer Infektion für Pathogene eine frühe Barriere des Wirts dar. Hochkonservierte molekulare Strukturen dieser Pathogene, so genannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) werden dabei durch das angeborene Immunsystem erkannt und lösen eine Immunreaktion aus.

Die zytoplasmatische Erkennung von Fremd-DNA als insbesondere mit DNA-Viren assoziiertes PAMP führt in Zielzellen über das Aim2-Inflammasom zur Produktion von Interleukin-1 $\beta$ . Über einen weiteren, separaten Signalweg, der über RNA-Polymerase III oder DAI/ZBP1 initiiert werden kann und IRFs (*interferon regulatory factors*) sowie das kürzlich identifizierte Protein STING (*stimulator of interferon genes*) benötigt, wird die Produktion von Interferonen induziert. Neben der Induktion von Zytokinen löst die Erkennung zytoplasmatischer DNA in betroffenen Zellen Zelltod aus. Zu Beginn dieser Arbeit lagen allerdings widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Zelltod-Mechanismus vor. So war gezeigt worden, dass zytoplasmatische DNA in myeloiden Zellen Aim2-abhängig Pyroptose auslösen kann, wie eine Caspase-1-abhängige, Caspase-3-unabhängige Form des Zelltodes bezeichnet wird. Zusätzliche Befunde belegten allerdings, dass zytoplasmatische DNA auch Caspase-3 als Endstrecke der klassischen Apoptose aktiviert und ebenfalls in nicht-myeloiden Zellen Zelltod auslösen kann, in denen vermutlich kein aktives Aim2-Inflammasom existiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Zelltod-Reaktion nicht-myeloider Zellen, welche den Großteil der Zellen unseres Körpers ausmachen, auf internalisierte Fremd-DNA bzw. DNA-Virusinfektion zu untersuchen und zu charakterisieren.

Mittels rt-PCR-Analysen der Expression von Aim2, ASC (*apoptosis-related speck-like protein containing a CARD*) sowie Caspase-1 in einer Reihe myeloider und nicht-myeloider Zellen und Zelllinien wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass in der Tat ein vollständiges Aim2-Inflammasom nur in wenigen, myeloiden Zelltypen vorhanden ist. Jedoch auch Zelltypen ohne funktionelles Aim2-Inflammasom starben nach Transfektion von Fremd-DNA in das Zytoplasma oder nach Infektion mit dem als DNA-Modellvirus verwendeten mutierten MVA (*vaccinia virus Ankara*). Dieser durch zytosolische DNA bzw. MVA-Infektion ausgelöste Aim2-unabhängige Zelltod trug die Charakteristika intrinsischer, mitochondrialer Apoptose: Er war von Bax (*Bcl-2-associated X protein*), Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und Caspase-9

abhängig sowie unabhängig von Caspase-8. Dies konnte durch Experimente, in denen die jeweiligen Proteine mittels siRNA in der untersuchten Zelllinie depletiert wurden, gezeigt werden. Dabei zeigte sich dieser Zelltod unabhängig vom Signalweg, der bei DNA-Erkennung zur Produktion von Interferon führt. Die Depletion von IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*), IFNAR (*interferon- $\alpha$  receptor*) sowie STING und DAI/ZBP1 mittels siRNA konnte zwar die Produktion von Interferon nach Detektion von zytosolischer DNA kritisch reduzieren, eine Reduktion des Zelltods zeigte sich dabei jedoch nicht.

In der weiteren Charakterisierung des Signalweges konnten wir zeigen, dass zytosolische DNA und Infektion mit MVA zur Phosphorylierung von p53 (Serine 15 und 46) führt. Die Depletion von p53 mittels siRNA sowie die Inhibition der Phosphorylierung von p53 durch koffeinvermittelte Hemmung der ATM/ATR-Kinasen führte zu einer starken Reduktion des DNA-induzierten Zelltodes. Während die Aktivierung von p53 durch ATM/ATR bisher klassischerweise im Rahmen des DNA-Schadenerkennungs- und Reperatursystems der Zelle beschrieben ist, implizieren diese Ergebnisse, dass Komponenten des wirtseigenen DNA-Schadenerkennungssystems eine wichtige Rolle in der Erkennung mikrobieller DNA als PAMP und damit in der Abwehr von invasiven Mikroben wie DNA-Viren durch das angeborene Immunsystem spielen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K.A., and Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* *10*, 1065-1072.
- Alnemri, E.S. (2010). Sensing cytoplasmic danger signals by the inflammasome. *J Clin Immunol* *30*, 512-519.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* *2*, 420-430.
- Aslan, J.E., and Thomas, G. (2009). Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis. *Traffic* *10*, 1390-1404.
- Assenmacher, N., and Hopfner, K.P. (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* *113*, 157-166.
- Atkins, E. (1984). Fever: the old and the new. *J Infect Dis* *149*, 339-348.
- Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., and Dinarello, C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 7907-7911.
- Barber, G.N. (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* *8*, 113-126.
- Bergsbaken, T., and Cookson, B.T. (2007). Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog* *3*, e161.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* *7*, 99-109.
- Besch, R., Poeck, H., Hohenauer, T., Senft, D., Hacker, G., Berking, C., Hornung, V., Endres, S., Ruzicka, T., Rothenfusser, S., *et al.* (2009). Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* *119*, 2399-2411.
- Beutler, B. (2005). The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics* *57*, 385-392.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* *81*, 1-5.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett* *247*, 26-39.
- Boya, P., Pauleau, A.L., Poncet, D., Gonzalez-Polo, R.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2004). Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta* *1659*, 178-189.
- Bratton, S.B., and Salvesen, G.S. (2010). Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* *123*, 3209-3214.
- Brierley, M.M., and Fish, E.N. (2002). Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *J Interferon Cytokine Res* *22*, 835-845.
- Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., *et al.* (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* *10*, 266-272.
- Chattopadhyay, S., Yamashita, M., Zhang, Y., and Sen, G.C. (2011). The IRF-3/Bax-mediated apoptotic pathway, activated by viral cytoplasmic RNA and DNA, inhibits virus replication. *J Virol* *85*, 3708-3716.

- Cheng, G., Zhong, J., Chung, J., and Chisari, F.V. (2007). Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 9035-9040.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010-1014.
- Chipuk, J.E., Maurer, U., Green, D.R., and Schuler, M. (2003). Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* *4*, 371-381.
- Chiu, Y.H., Macmillan, J.B., and Chen, Z.J. (2009). RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* *138*, 576-591.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15623-15628.
- DeYoung, K.L., Ray, M.E., Su, Y.A., Anzick, S.L., Johnstone, R.W., Trapani, J.A., Meltzer, P.S., and Trent, J.M. (1997). Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene* *15*, 453-457.
- Dinarello, C.A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* *8*, 253-265.
- Dinarello, C.A. (2010). IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol* *40*, 599-606.
- Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* *117*, 3720-3732.
- Dragovich, T., Rudin, C.M., and Thompson, C.B. (1998). Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* *17*, 3207-3213.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., *et al.* (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* *464*, 1357-1361.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect* *11*, 1050-1062.
- Eitz Ferrer, P., Potthoff, S., Kirschnek, S., Gasteiger, G., Kastenmuller, W., Ludwig, H., Paschen, S.A., Villunger, A., Sutter, G., Drexler, I., *et al.* (2011). Induction of Noxa-mediated apoptosis by modified vaccinia virus Ankara depends on viral recognition by cytosolic helicases, leading to IRF-3/IFN-beta-dependent induction of pro-apoptotic Noxa. *PLoS Pathog* *7*, e1002083.
- Eriksson, D., and Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* *31*, 363-372.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* *458*, 509-513.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Juliana, C., Solorzano, L., Kang, S., Wu, J., Datta, P., McCormick, M., Huang, L., McDermott, E., *et al.* (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* *11*, 385-393.
- Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* *8*, 1812-1825.
- Franchi, L., Munoz-Planillo, R., Reimer, T., Eigenbrod, T., and Nunez, G. (2010). Inflammasomes as microbial sensors. *Eur J Immunol* *40*, 611-615.

- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227, 106-128.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7, 1250-1257.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127-1130.
- Hansen, J.D., Vojtech, L.N., and Laing, K.J. (2011). Sensing disease and danger: A survey of vertebrate PRRs and their origins. *Dev Comp Immunol* 35, 886-897.
- He, Z., Ma, W.Y., Hashimoto, T., Bode, A.M., Yang, C.S., and Dong, Z. (2003). Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res* 63, 4396-4401.
- Hilbi, H., Moss, J.E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., Flavell, R.A., Yuan, J., Sansonetti, P.J., and Zychlinsky, A. (1998). Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 273, 32895-32900.
- Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S.C., Khanna, K.K., Dittmar, G., and Scheidereit, C. (2010). A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell* 40, 63-74.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., and Fitzgerald, K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514-518.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9, 847-856.
- Ichinohe, T., Lee, H.K., Ogura, Y., Flavell, R., and Iwasaki, A. (2009). Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* 206, 79-87.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258-267.
- Ishii, K.J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., *et al.* (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7, 40-48.
- Ishii, K.J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., *et al.* (2008). TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451, 725-729.
- Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674-678.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Klein, G., Klein, E., and Kashuba, E. (2010). Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 67-73.
- Kruse, J.P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.
- Kumagai, Y., and Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 125, 985-992.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30, 16-34.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14, 32-43.
- Labbe, K., and Saleh, M. (2008). Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ* 15, 1339-1349.

- Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* *12*, 887-896.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2009). Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* *227*, 95-105.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2010). Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe* *8*, 44-54.
- Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D., Van Damme, P., Vanden Berghe, T., Vanoverberghe, I., Vandekerckhove, J., Vandenabeele, P., Gevaert, K., and Nunez, G. (2008). Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol Cell Proteomics* *7*, 2350-2363.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (1998). The I $\beta$  200 genes: an emerging family of IFN-inducible genes. *Biochimie* *80*, 721-728.
- Lara-Tejero, M., Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Grant, E.P., Bertin, J., Coyle, A.J., Flavell, R.A., and Galan, J.E. (2006). Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J Exp Med* *203*, 1407-1412.
- Latz, E. (2009). The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* *22*, 28-33.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* *14*, 461-470.
- Leibowitz, B., and Yu, J. (2010). Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* *9*, 417-422.
- Levine, A.J. (2009). The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. *Virology* *384*, 285-293.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491-501.
- Li, J., Han, Y.R., Plummer, M.R., and Herrup, K. (2009). Cytoplasmic ATM in neurons modulates synaptic function. *Curr Biol* *19*, 2091-2096.
- Litman, G.W., Rast, J.P., and Fugmann, S.D. (2010). The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* *10*, 543-553.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- Mace, P.D., and Riedl, S.J. (2010). Molecular cell death platforms and assemblies. *Curr Opin Cell Biol* *22*, 828-836.
- Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* *27*, 229-265.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* *117*, 561-574.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* *442*, 39-44.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* *11*, 577-590.
- Miller, C.H., Maher, S.G., and Young, H.A. (2009). Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci* *1182*, 69-79.

- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8, 413-450.
- Montero, J.A., and Hurlle, J.M. (2010). Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis* 15, 365-375.
- Muruve, D.A., Petrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S.A., Ross, P.J., Parks, R.J., and Tschopp, J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452, 103-107.
- Nakajima, A., Nishimura, K., Nakaima, Y., Oh, T., Noguchi, S., Taniguchi, T., and Tamura, T. (2009). Cell type-dependent proapoptotic role of Bcl2L12 revealed by a mutation concomitant with the disruption of the juxtaposed Irf3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12448-12452.
- Netea, M.G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B.J., Van der Meer, J.W., and Joosten, L.A. (2010). IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog* 6, e1000661.
- Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y.A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K.I., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2004). ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* 6, 121-128.
- Ortaldo, J.R., Lang, N.P., Timonen, T., and Herberman, R.B. (1981). Augmentation of human natural killer cell activity by interferon: conditions required for boosting and characteristics of the effector cells. *J Interferon Res* 1, 253-262.
- Pasquali, S., and Mocellin, S. (2010). The anticancer face of interferon alpha (IFN-alpha): from biology to clinical results, with a focus on melanoma. *Curr Med Chem* 17, 3327-3336.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10, 26-35.
- Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A., and Tschopp, J. (2007). The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 19, 615-622.
- Poock, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., Hanneschlager, N., Schlee, M., Rothenfusser, S., Barchet, W., *et al.* (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol* 11, 63-69.
- Qu, J., Lin, J., Zhang, S., Zhu, Z., Ni, C., Gao, H., and Zhu, M. (2009). HBV DNA can bind to P53 protein and influence p53 transactivation in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 504-509.
- Ramachandra, L., Simmons, D., and Harding, C.V. (2009). MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Curr Opin Immunol* 21, 98-104.
- Ranjan, P., Bowzard, J.B., Schwerzmann, J.W., Jeisy-Scott, V., Fujita, T., and Sambhara, S. (2009). Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol Med* 15, 359-368.
- Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., *et al.* (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11, 395-402.
- Riches, L.C., Lynch, A.M., and Gooderham, N.J. (2008). Early events in the mammalian response to DNA double-strand breaks. *Mutagenesis* 23, 331-339.
- Roberts, T.L., Idris, A., Dunn, J.A., Kelly, G.M., Burnton, C.M., Hodgson, S., Hardy, L.L., Garceau, V., Sweet, M.J., Ross, I.L., *et al.* (2009). HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 323, 1057-1060.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.

- Rudel, T., Kepp, O., and Kozjak-Pavlovic, V. (2010). Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways. *Nat Rev Microbiol* 8, 693-705.
- Sabisz, M. (2008). Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 9, 325-336.
- Santos, C.R., Vega, F.M., Blanco, S., Barcia, R., and Lazo, P.A. (2004). The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology* 328, 254-265.
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., *et al.* (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13, 539-548.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17, 1675-1687.
- Schepis, A., Schramm, B., de Haan, C.A., and Locker, J.K. (2006). Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. *Traffic* 7, 308-323.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J.C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F.S., Michallet, M.C., Besch, R., Hopfner, K.P., *et al.* (2009). 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12067-12072.
- Schroder, K., Muruve, D.A., and Tschopp, J. (2009). Innate immunity: cytoplasmic DNA sensing by the AIM2 inflammasome. *Current Biology* 19, R262-265.
- Schwartz, R.A., Carson, C.T., Schuberth, C., and Weitzman, M.D. (2009). Adeno-associated virus replication induces a DNA damage response coordinated by DNA-dependent protein kinase. *J Virol* 83, 6269-6278.
- Sharma, S., and Fitzgerald, K.A. (2011). Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog* 7, e1001310.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470.
- Smith, P.L., Lombardi, G., and Foster, G.R. (2005). Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* 42, 869-877.
- Stacey, K.J., Ross, I.L., and Hume, D.A. (1993). Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages. *Immunol Cell Biol* 71 ( Pt 2), 75-85.
- Stegh, A.H., and DePinho, R.A. (2011). Beyond effector caspase inhibition: Bcl2L12 neutralizes p53 signaling in glioblastoma. *Cell Cycle* 10, 33-38.
- Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.
- Strasser, A., Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., and Bouillet, P. (2008). What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunol Cell Biol* 86, 57-66.
- Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 621-632.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., *et al.* (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.
- Takaoka, A., and Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8, 907-922.

- Takeda, K., and Akira, S. (2007). Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol Chapter 14*, Unit 14 12.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 20, 17-22.
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 16, 139-144.
- Vance, R.E., Isberg, R.R., and Portnoy, D.A. (2009). Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe* 6, 10-21.
- Wang, Z., Choi, M.K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K., and Taniguchi, T. (2008). Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5477-5482.
- Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (1999). The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 53, 155-187.
- Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A., Schmelz, K., Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Dorken, B., and Daniel, P.T. (2001). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 97, 1378-1387.
- Williams, G.T. (1994). Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. *Trends Microbiol* 2, 463-464.
- Yoneyama, M., and Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 227, 54-65.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591-599.
- Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., *et al.* (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29, 538-550.

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AA	Amino acid
Aim2	Absent in Melanoma 2
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APC	Antigen presenting cell
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bak	Bcl2-antagonist/killer
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BclXL	B-cell lymphoma 2 XL
Bcl2L12	B-cell lymphoma 2 like protein 12
Bid	Bcl-2 Interacting Domain
CARD	Caspase recruitment domain
cDNA	Complementary DNA
DAI/ZBP1	DNA-dependent activator of IRFs/ Z-DNA binding protein 1
DAMP	Danger associated molecular pattern
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas-associated protein with death domain
FCS	Fetal calf serum
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H1339	Small cell lung cancer
HBSS	Hank's balanced salt solution
HBV	Hepatitis-B-Virus
Hek293	Human embryonic kidney 293
HIN-200	Hematopoietic IFN-inducible nuclear protein with a 200-AA repeat

---

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horse raddish peroxidase
Huh7.0	Human hepatocellular carcinoma 7.0
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon receptor alpha
IP-10	Interferon-gamma induced protein
IRF	Interferon regulatory factor
LRR	Leucin-rich repeat
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MEM-NEAA	Minimal essential medium - non-essential amino acids
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
MVA	Modified vaccinia virus Ankara strain
Nalp (= NLRP)	NACHT, LRR and PYD domain-containing protein
NACHT	NAIP, CIITA, HET-E and TP1
NLR	Nod-like receptor
Nlrc	NLR family, CARD domain containing protein
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PRR	Pattern recognition receptor
PYD	Pyrin domain
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RISC	RNA-induced silencing complex
RLH	RIG-I-like helicase
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rt-PCR	reverse-transcribed polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA

---

STING	Stimulator of interferon genes
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TEMED	Tetramethyl ethylene diamine
THP1	Human acute monocytic leukemia cell line
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TLR	Toll-like receptor
TRADD	TNF-receptor-associated protein with death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VLE	Very low endotoxin
VRK1	Mammalian vaccinia-related kinase 1
WB	Western blot
w/v	Weight/volume

## 8. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres möchte ich mich für das gleichermaßen wissenschaftlich fruchtbare wie persönlich bereichernde Umfeld seiner *Abteilung für Klinische Pharmakologie* bedanken. Überaus zu schätzen weiß ich neben Anderem seine genuine Eigenschaft, engagierte Vorhaben motivierter Studenten in jedweder Weise zu fördern. Von dieser Unterstützung habe ich ausgesprochen profitiert und bin dafür sehr dankbar.

Für die eklatant kompetente Betreuung in wissenschaftlicher Hinsicht, den steten Wissensfluss sowie das freundschaftliche Miteinander bedanke ich mich bei meinen Anleitern, Antreibern und wichtigsten Ansprechpartnern bei meinen ersten wissenschaftlichen Gehversuchen, den für meine Promotionsarbeit essentiell wichtigen Betreuern und Supervisoren Prof. Dr. Simon Rothenfusser und Dr. Andreas Schmidt.

Ich danke Julia Vorac für die anfängliche labortechnische Starthilfe, später und bis zum Abschluss meiner Promotion dann ganz besonders Simone Willms für die kontinuierliche Hilfe und Unterstützung in jeglicher Laborlebenslage.

Mein aufrichtiger Dank gilt weiterhin allen Doktoranden, die mir während meiner Zeit in der *Abteilung für Klinische Pharmakologie*, wann immer es nötig war, mit Rat und Tat helfend zur Seite standen, namentlich Tobias Schwerd, Johannes Hellmuth, Peter Düwell, Franziska Hoffmann und Wolfgang Hamm. An dieser Stelle besonders erwähnt sei Michael Wunderlich, der geduldig während meiner Auslandsabwesenheit im PJ bedeutende Ergänzungen auf dem Weg zur Veröffentlichung des Projekts beitragen und aufbauend auf dieser Arbeit weitere wichtige Fortschritte auf dem Gebiet der intrazellulären Fremd-DNA-Erkennung in nicht-myeloiden Zellen erzielen konnte.

Schließlich bedanke ich mich von Herzen für die seit 28 Jahren ohne Unterlass fortdauernde konstruktive Begleitung und Förderung, Motivation und Inspiration durch meine Eltern Astrid Wenzel, Wolfgang Wenzel und Michael Stoll, ohne deren Anleitung ich in sämtlicher Hinsicht schwerlich gleichermaßen Erfreuliches erreicht hätte.

## 9. Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

2009

Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, **Wenzel M**, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S  
5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I  
Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(29): 12067–12072

2011

**Wenzel M**, Wunderlich M, Besch R, Poeck H, Willms S, Schwantes A, Kremer M, Sutter G, Endres S, Schmidt A, Rothenfusser S  
Cytosolic DNA triggers mitochondrial apoptosis via DNA damage signalling proteins independently of Aim2 and RNA polymerase III  
J Immunol 2011; in press

### Wissenschaftliche Poster

2008

**Wenzel M**, Schmidt A, Poeck H, Besch R, Schwerd T, Hellmuth J, Endres S, Rothenfusser S  
Molecular pathways in virus-induced apoptosis  
TOLL-Meeting, Lissabon, Portugal

2009

**Wenzel M**, Schmidt A, Besch R, Poeck H, Sutter G, Endres S, Rothenfusser S  
Microbial DNA in the cytosol of non-myeloid human cells triggers mitochondrial apoptosis independently of Aim2  
Graduiertenkolleg 1202, Teilprojekt A3, München

2011

**Wenzel M**, Schmidt A, Wunderlich M, Besch R, Poeck H, Schwantes A, Kremer M, Sutter G, Endres S, Rothenfusser S  
Foreign DNA triggers mitochondrial apoptosis via DNA damage signalling proteins independently of Aim2  
TOLL-Meeting, Riva del Garda, Italien

## 10. Lebenslauf

Name	Michael Wenzel
Geburtsdatum	2. Dez. 1982, in Magdeburg
Nationalität	Deutsch

### *Schulbildung*

1989 - 1990	Grundschule, Gera
1991 - 2002	Grundschule und Gymnasium der Regensburger Domspatzen, Regensburg
2002	Reifeprüfung am Gymnasium der Regensburger Domspatzen, Regensburg

### *Zivildienst*

2002 - 2003	Pater-Rupert-Mayer-Zentrum, eine Schule für körperlich beeinträchtigte Kinder und Jugendliche, Regensburg
-------------	---

### *Hochschulstudium*

2003 - 2010	Studium der Humanmedizin an der LMU, München
2005	Erstes medizinisches Staatsexamen (Physikum)
2009 - 2010	Praktisches Jahr
08 - 10 2009	Viszeralchirurgie, Hôpital Saint-Louis (Paris-Diderot, VII), Paris
10 2009 - 01 2010	Neurochirurgie / Neurologie, Klinikum Großhadern, LMU, München
01 - 03 2010	Neurologie, Queen Square (UCL), London
03 - 07 2010	Innere Medizin, Harvard Medical School, Boston
10 - 12 2010	Zweites medizinisches Staatsexamen

### *Stipendien*

2007 - 2010	Studienstiftung des deutschen Volkes
2007 - 2008	Promotionsstudiengang Molekulare Medizin, LMU (FöFoLe)
2008	Äthiopien-Austauschprogramm der LMU (Jimma-LMU-Link)
2009	Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG, GraKo 1202)
2010	Harvard Munich Alliance (HMI) for medical education

*Außeruniversitäres*

- 2001 - 2005 Mitglied des A-Cappella Ensembles *ConVoce*
- Seit 2001 Mitglied des A-Cappella Ensembles *StimmBand*
- 2002 *Dieter-Ullrich-Musik-Förderpreis*, München
- 2008 2. Preis, Bundes-A-Cappella-Wettbewerb
- 2010 3. Preis, Bayerischer Chorwettbewerb des *BR*  
Kategorie 4-12 Personen