

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeitsgruppe Klinische Biochemie
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Rolle von zytosolischer DNA in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1



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

vorgelegt von
Christian Schwening
aus München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität,
München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.....

.....

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Eberhard Standl.....

Prof. Dr. Jürgen Haas.....

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. J. Lichtnekert.....

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

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2012.....

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2009 bis Februar 2010 in den Forschungslabors der Medizinischen Klinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Rechtliche Grundlage der Tierversuche

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden.

Förderung des Projektes

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Oligonucleotide in Zellbiologie und Forschung“ durch das Förderprogramm „GraduiertenKolleg 1202“ (GraKo 1202) des DFG unterstützt.

Aus dieser Arbeit ging folgende Veröffentlichung hervor:

In Vorbereitung:

Käser S., Schweninger C., Rupanagudi K.V., Allam R., Seissler J., Anders H.-J., Lichtnekert J.: "Cytosolic double stranded DNA induces apoptosis and upregulation of inflammatory genes in pancreatic beta cells"

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1. Einleitung.....	1
1.1 Klinische Aspekte des Diabetes mellitus Typ 1	1
1.2 Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 1	3
1.3 Das Immunsystem.....	6
1.3.1 Das angeborene Immunsystem	7
1.3.2 Das erworbene Immunsystem	8
1.3.3 Das angeborene Immunsystem: Rezeptoren und Liganden	9
1.3.4 Zytosolische RNA-Erkennungsrezeptoren	11
1.3.5 Zytosolische DNA-Erkennungsrezeptoren	14
1.4 Die Rolle der angeborenen Immunität in der Insulitis	22
1.4.1 Induktion der Insulitis	23
1.4.2 Übergang zur erworbenen Immunantwort.....	26
1.4.3 Erhaltung oder Auflösung der Insulitis	30
1.5 Zelltod.....	31
1.5.1 Nekrose.....	31
1.5.2 Programmierter Zelltod	32
1.5.3 Apoptoserelevante Gene	32
1.6 Fragestellung.....	36
2 Material und Methoden.....	37
2.1 Zell-Kultur	37
2.1.1 Material	37
2.1.2 Kultur und Passage von Ins-1- und Min-6-Zellen.....	38
2.1.3 Gewinnen von primären Maus-Pankreasinseln.....	39
2.1.4 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	40
2.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen in und aus flüssigem Stickstoff.....	41
2.1.6 Stimulierungen	41
2.2 Viabilitätstest	42
2.3 <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	42
2.3.1 Material	43

2.3.2	CXCL10-ELISA	43
2.4	Western Blot.....	44
2.4.1	Material	45
2.4.2	Proteingewinnung	46
2.4.3	Messung der Proteinkonzentration	46
2.4.4	Vorbereitung der Proteine für die Elektrophorese	47
2.4.5	Elektrophorese.....	47
2.4.6	Blotten.....	49
2.4.7	Entwickeln.....	49
2.5	<i>Real Time</i> quantitative PCR (Light Cycler 480)	49
2.5.1	mRNA-Isolation und cDNA-Umschreibung	51
2.5.2	Durchführung	54
2.6	Tierexperimente.....	55
2.6.1	Versuchstiere und Material	55
2.6.2	Tierhaltung.....	56
2.6.3	Studiendesign	56
2.7	Statistische Analyse	57
3	Ergebnisse	58
3.1	Expressionsanalyse von Nukleinsäurerezeptoren des angeborenen Immunsystems in Langerhansschen Inseln, Pankreasgewebe und β -Zellen. 58	
3.1.1	mRNA-Expressionsanalyse per <i>Real Time</i> quantitative PCR	58
3.1.2	Protein-Expressionsanalyse mittels Western Blot.....	60
3.2	Einfluss von <i>poly(I:C)</i> und <i>poly(dA:dT)</i> auf Zytokin- und Chemokinproduktion von β -Zellen	61
3.2.1	ELISA-Proteinanalyse von Chemokinen und Zytokinen.....	61
3.2.2	mRNA-Expressionsanalyse von Chemokinen und Zytokinen per <i>Real Time</i> quantitative PCR	64
3.3	Einfluß von zytosolischem <i>poly(I:C)</i> und <i>poly(dA:dT)</i> auf die Apoptose von β - Zellen	65
3.3.1	Viabilität von Min-6-Insulinomazellen.....	65
3.3.2	Analyse apoptoserelevanter Proteine im Western Blot Verfahren	68
3.3.3	mRNA-Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene per <i>Real Time</i> quantitative PCR	68

3.4	Einfluss von STZ in Kombination mit <i>poly</i> (dA:dT) auf Blutzuckerspiegel und Gewicht von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen.....	75
4	Diskussion	78
4.1	Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse.....	78
4.2	Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur.....	79
4.2.1	Bedeutung der Expressionanalyse von Nukleinsäurerezeptoren in Langerhansschen Inseln, Pankreasgewebe und β -Zellen	79
4.2.2	Einfluss von <i>poly</i> (I:C) und <i>poly</i> (dA:dT) auf Zytokin- und Chemokin-Produktion von β -Zellen	81
4.2.3	Einfluss von zytosolischem <i>poly</i> (I:C) und <i>poly</i> (dA:dT) auf die Apoptose von β -Zellen	84
4.2.4	Tierversuche	85
4.3	Stand der klinischen Forschung und Ausblick	87
5	Zusammenfassung	89
	Literaturverzeichnis	91
	Abkürzungsverzeichnis.....	102
	Danksagung	107
	Lebenslauf.....	Error! Bookmark not defined.

1. Einleitung

1.1 Klinische Aspekte des Diabetes mellitus Typ 1

Diabetes mellitus Typ 1 ist das Ergebnis von Interaktionen zwischen genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren [1-4], die schlussendlich zu einer Zerstörung von pankreatischen β -Zellen und Insulindefizienz führen. Patienten mit genetischer Veranlagung für Diabetes mellitus Typ 1 haben bei Geburt eine normale β -Zellmasse, verlieren diese jedoch aufgrund von autoimmunen Prozessen im Laufe von Monaten oder Jahren [5]. In der Regel erscheinen immunologische Marker in der Zeitspanne zwischen auslösendem Stimulus und klinischer Manifestation [6] (siehe Abbildung 1.1.). Die β -Zellmasse beginnt zu schwinden und die Insulinproduktion nimmt zunehmend ab, obwohl eine normale Glukosetoleranz aufrechterhalten werden kann. Beginn und Geschwindigkeit der β -Zellzerstörung variiert von Fall zu Fall. Die klinische Symptomatik tritt deshalb früher oder später ein, wenn die noch verbliebenen β -Zellen keine Glukosetoleranz mehr aufrecht erhalten können [5]. Ereignisse, die einen Übergang von Glukoseintoleranz zu manifestem Diabetes mellitus auslösen, sind oft mit einem erhöhten Insulinbedarf in Zusammenhang zu bringen, so wie z.B. während eines Infekts [1].

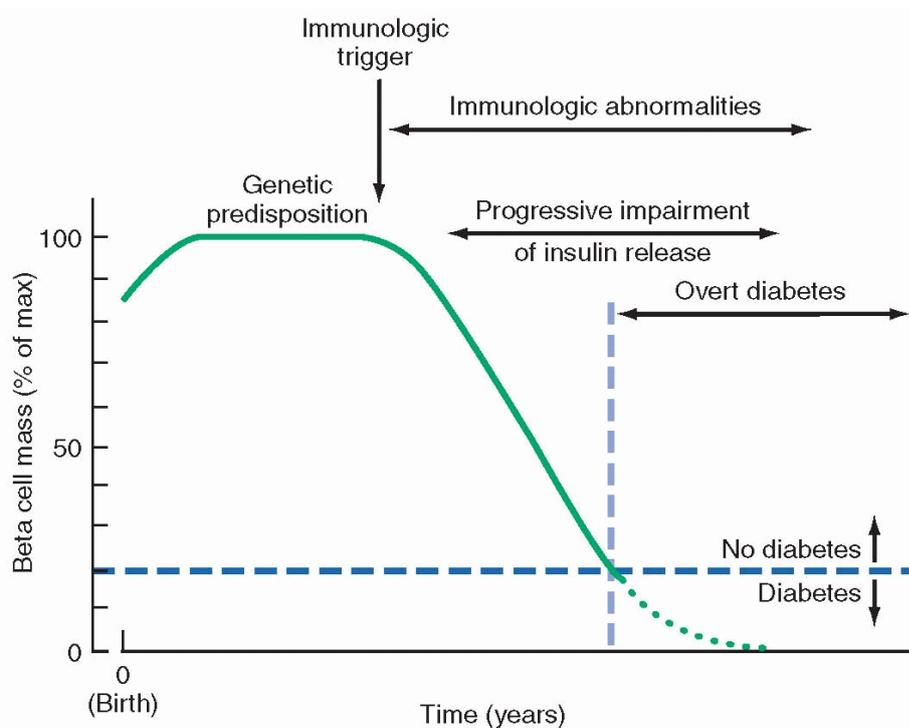


Abbildung 1.1: Korrelation von Betazellmasse und symptomatischem Diabetes mellitus Typ 1 [6].

Im Anschluß an die anfängliche milde Klinik des Diabetes mellitus Typ 1 beginnt eine intermediäre Phase. Die Kontrolle der Glykämie wird dann durch niedrige Dosierungen Insulin erreicht [5]. Nach Zerstörung der letzten β -Zellen durch den Autoimmunprozess treten aufgrund des absoluten Insulinmangels Polyurie, Polydipsie, rascher Gewichtsverlust, Hunger, Übelkeit, Erbrechen oder ein allgemeines Krankheitsgefühl auf [5]. Weil die Glukose nicht mehr metabolisiert werden kann, wird sie über den Urin ausgeschieden. Dieser gestörte Glukosestoffwechsel kann zur Bildung von Ketonkörpern führen [5] und möglicherweise in einem ketoazidotischen Koma resultieren.

Diabetes mellitus Typ 1 ist derzeit nicht heilbar und Komorbiditäten wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Retinopathien, Neuropathien und Nephropathien kommen insbesondere bei älteren Patienten trotz strenger Insulintherapie sehr häufig vor [7].

Nach Schätzungen der *International Diabetes Federation* aus dem Jahre 2006 erkrankten weltweit ca. 440000 Kinder bis zu einem Alter von 14 Jahren an Diabetes mellitus Typ 1. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen lag bei ca. 70000. In Deutschland beträgt die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 1 0,3%. Dabei liegt die Inzidenz bei den 0-14 Jährigen zwischen 13-16/100000 Kinder im Jahr. [8-10]

Überall in Europa ist die Inzidenz der Neuerkrankungen gestiegen. Vor allem in Finnland hat sich diese seit 1980 verdoppelt. Eine rein genetische Erklärung aufgrund der kurzen Zeitspanne von 25-30 Jahren ist für diesen dramatischen Anstieg jedoch unwahrscheinlich. In Asien und Südamerika liegt die Inzidenz bei 0,1/100000/Jahr, während sie in Sardinien, Finnland, Schweden, Großbritannien, Kanada und Neuseeland bei $\geq 20/100\ 000$ /Jahr liegt [11, 12]. Möglicherweise ist das Vorkommen von Diabetes mellitus Typ I-assozierten Genen gestiegen oder die Penetranz dieser Gene hat zugenommen. Auch eine Verschiebung der Ratio von Niedrigrisikogenen zu Hochrisikogenen könnte eine Erklärung darstellen.

Man könnte also schlussfolgern, dass sowohl der genetische Hintergrund dieser Populationen als auch Umwelteinflüsse, wie virale Infektionen, ein immer höheres Durchschnittsalter der Mütter bei Geburt sowie veränderte Essgewohnheiten und Schadstoffe die Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 1 beeinflussen [11-15]. Dennoch konnte bisher keinem Umweltfaktor die direkte Verbindung zur Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 1 nachgewiesen werden [16]. Ein solcher Nachweis ist schwer

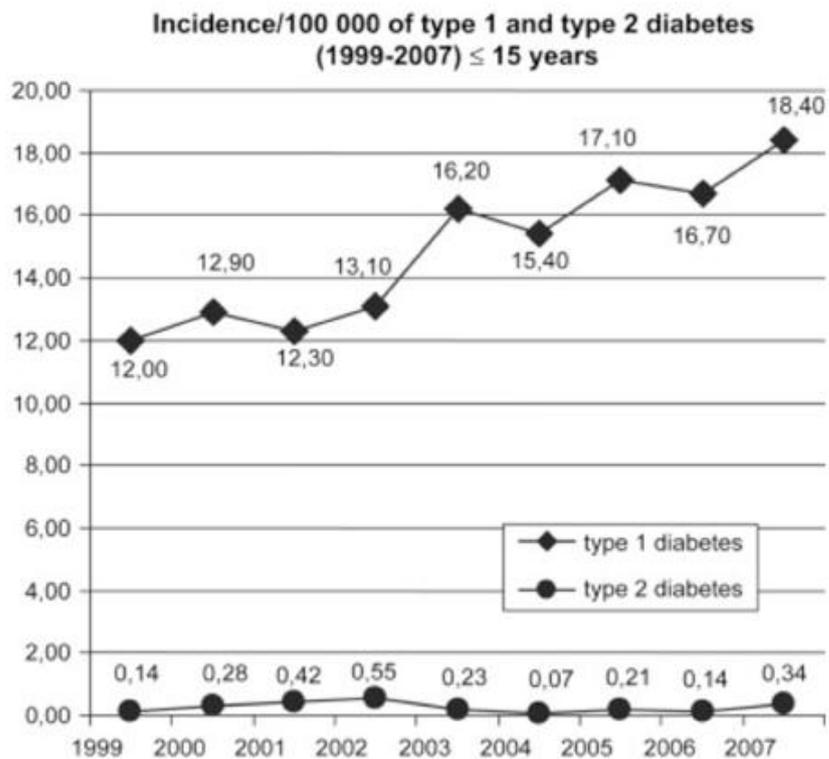


Abbildung 1.2: Steigende Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 1 bei österreichischen Kindern [17].

zu erbringen, da ein ursächliches Ereignis sich auch Jahre vor einer klinischen Manifestation ereignen kann [6]. Betrachtet man die steigende Anzahl von Diabetes mellitus Typ 1-Neuerkrankungen und seine hohe Komorbiditätsrate, stellt diese Krankheit eine immer größer werdende medizinische, wirtschaftliche aber auch menschliche Herausforderung dar.

Um die Entwicklung neuer, kurativer Therapieansätze gegen diese Krankheit zu unterstützen, ist die Notwendigkeit über die Anstellung weiterer Grundlagenforschung zu den Ursachen dieser Erkrankung außer Frage.

1.2 Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 1

Beim Diabetes mellitus Typ 1 kommt es zu einer entzündlichen Zerstörung der β -Zellen im Pankreas. Als Ursache für die Entzündung kommen Infektionen, Gewebeschädigungen oder Gewebestress in Frage [16, 18]. Für den Erhalt der Gewebeintegrität bedarf es jedoch einer adäquaten Kontrolle der Entzündung. Eine fehlerhafte Auflösung der Entzündung und falsches Lesen von Entzündungssignalen

kann das Risiko erhöhen, eine Autoimmunerkrankung wie Diabetes mellitus Typ 1 zu entwickeln [16].

Obwohl andere Inselzelltypen (α - und δ -Zellen), oder pankreatische Polypeptid-produzierende Zellen funktionell und embryologisch den β -Zellen ähnlich sind und die meisten Proteine von β -Zellen exprimieren, werden diese anderen Zelltypen unerklärlicherweise vom Autoimmunprozess verschont [19].

Während des Prozesses der Insulitis werden die pankreatischen Inseln von mononuklearen Zellen [20, 21], sowie CD4 positiven T-Zellen, CD8 positiven T-Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen infiltriert [1, 22]. Im Wesentlichen sind bei der initiellen Zerstörung CD4 positive T-Helfer1-Zellen beteiligt [23], während T-Helfer2-Zellen durch eine protektive Wirkung vor einer Diabetes mellitus Typ 1-Erkrankung charakterisiert sind [24-27].

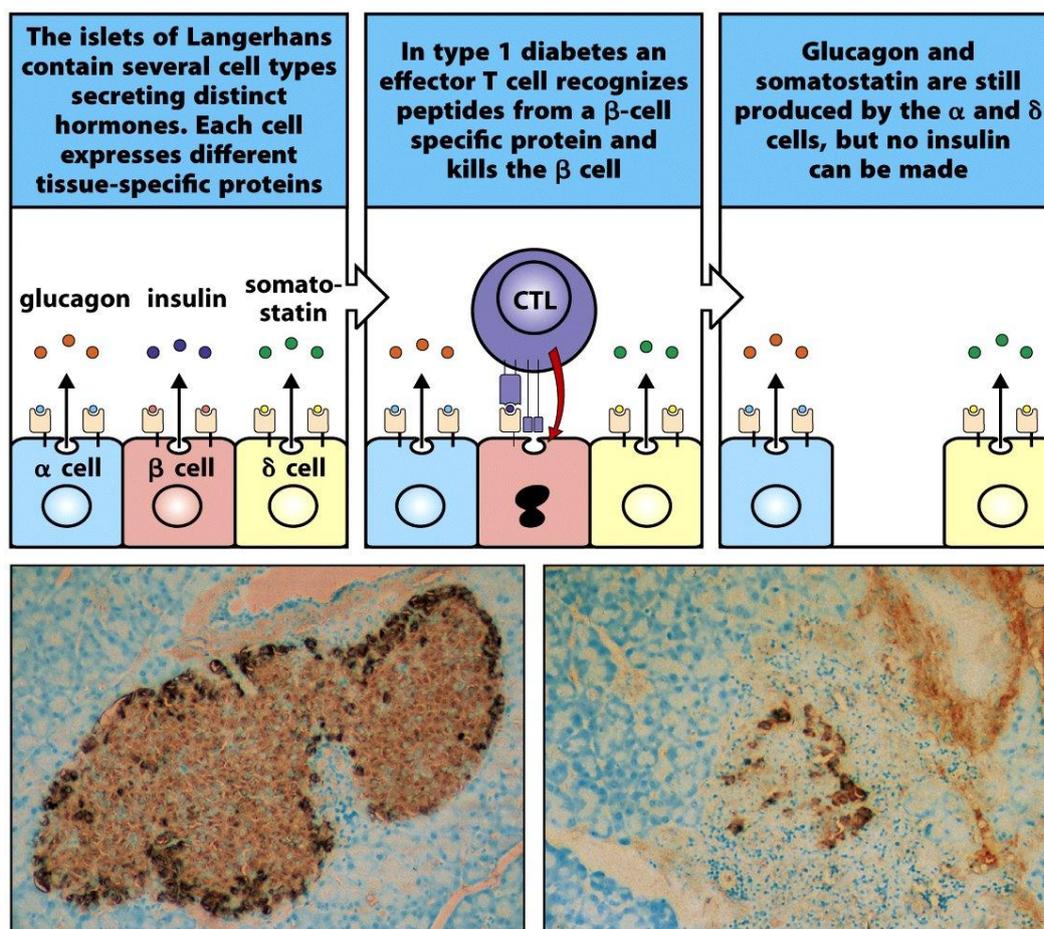


Figure 14-26 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 1.3: Antigene von Mikroorganismen mit T-Zell Oberflächenrezeptoren, die durch somatische Genrekombinationen geformt werden, werden von dem erworbenen Immunsystem erkannt und zerstört [19].

Nach Zerstörung aller β -Zellen klingt der inflammatorische Prozess ab, die Inseln werden atrophisch und die meisten immunologischen Marker verschwinden [5]. Studien von Autoimmunprozessen an Mensch- und Tiermodellen mit Diabetes mellitus Typ 1 (NOD-Maus und BB-Ratte), haben Anomalien in humoralen und zellulären Teilen des Immunsystems aufgedeckt [23]. Dies gilt für Inselzell-Autoantikörper, aktivierte Lymphozyten in den Inseln, peripankreatischen Lymphknoten und dem systemischen Kreislauf, T-Lymphozyten, die nach Stimulation mit Inselproteinen proliferieren sowie für die Ausschüttung von Zytokinen während der Insulitis [5]. Die genauen Mechanismen des β -Zelltods sind noch unbekannt, stehen aber wahrscheinlich in Verbindung mit Apoptose und CD8 positiver T-Zell-Zytotoxizität [19]. Die Inselzerstörung wird hauptsächlich durch T-Lymphozyten verursacht, nicht durch Autoantikörper, weil diese nicht generell auf die Zelloberfläche von Inseln reagieren und nicht in der Lage sind, DM auf Tiere zu übertragen [5].

Pankreatische Autoantigene sind Insulin, Glutamatdecarboxylaseautoantikörper (GADA), Phogrin, Tyrosinphosphataseautoantikörper (IA2A) und zytoplasmatische Inselzellautoantikörper (ICA) [5]. Bis auf das Insulin ist keines der Autoantigene β -Zellspezifisch. Das lässt die Frage aufkommen, wie β -Zellen selektiv zerstört werden. Es wurden Theorien postuliert, dass eine Initiierung des autoimmunen Prozesses gegen ein β -Zellmolekül stattfindet, gefolgt von einem *antigen spreading* zu anderen Inselmolekülen und einer so entstehenden Serie weiterer Autoantigene [28]. Die β -Zellen von Patienten, die Diabetes mellitus Typ 1 entwickeln, unterscheiden sich nicht von denen Gesunder. Und selbst eine Transplantation gesunder Inselzellen auf einen genetisch identischen Zwilling, verhinderte nicht eine erneute Zerstörung dieser [5].

Die Veranlagung für Diabetes mellitus Typ 1 involviert mehrere Gene. Das Hauptveranlagungsgen für diese Erkrankung liegt in der HLA Region des Chromosoms 6p21 [29]. Polymorphismen in dem HLA-Komplex sind für 40-50 % des genetischen Risikos Diabetes mellitus Typ 1 zu entwickeln, verantwortlich. Diese Region enthält auch Gene, die die Klasse II MHC-Moleküle [30] kodieren, die für T-Helfer Zellen Antigene präsentieren und so dabei beteiligt sind, den Immunprozess zu initiieren. Die Fähigkeit von MHC-II-Molekülen, Antigene zu präsentieren, hängt

von der Aminosäurezusammensetzung ihrer Antigen-Bindestellen ab [30]. Substitution von Aminosäuren kann die Spezifität der Immunantwort verändern, indem sie die Affinität verschiedener Antigene für MHC-II-Moleküle moduliert.

Die meisten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 haben einen HLA DR3 und/oder DR4 Haplotyp. Genauere Untersuchungen der HLA *loci* haben gezeigt, dass die Haplotypen DQA1*0301, DQB1*0302, und DQB1*0201 am häufigsten mit Diabetes mellitus Typ 1 verbunden sind [1]. Diese Haplotypen kommen bei 40% der Kinder mit Diabetes mellitus Typ 1 vor, im Gegensatz zu 2 % der gesunden Bevölkerung der Vereinigten Staaten von Amerika. Dennoch entwickeln die meisten Personen mit einem solchen Haplotypen keinen Diabetes mellitus Typ 1. Außer den MHC-II-Molekül-Assoziationen, sind mindestens noch 15 genetische *loci* bekannt, die zu dieser Krankheit prädisponieren [3]. Obwohl das Risiko dieses Leiden zu entwickeln 10-fach erhöht ist, wenn Verwandte ersten Grades erkrankt sind, ist das Risiko dennoch relativ gering: 3-4 % bei erkranktem Elternteil und 5-15 % bei erkrankten Geschwistern. Der größte Anteil von Diabetes mellitus Typ 1-Patienten haben keinen Verwandten ersten Grades mit dieser Krankheit. Umwelteinflüssen ist vermutlich gegenüber genetischen Faktoren eine immer größer werdende Rolle zuzuschreiben [3, 14, 31]. Denn bei gleichzeitig weltweit steigender Inzidenz [32-35], sind nur in 23 - 55 % von eineiigen Zwillingen beide Geschwister betroffen.

1.3 Das Immunsystem

Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten sind überall. Auch im alltäglichen, vermeintlich sauberen und hygienischen Leben der westlichen Welt begegnet der menschliche Körper einer großen Vielfalt und Menge von Pathogenen. Es ist die Aufgabe des Immunsystems ihn davor zu schützen. Dabei stellt die Fähigkeit, zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden, eine der wichtigsten Eigenschaften des Immunsystems dar [19].

Das Immunsystem von Säugetieren besteht aus einem Zusammenspiel zwischen seinen beiden Komponenten: dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem, welches im Laufe der ersten Lebensjahre ausgebildet werden muss [19].

Die Wurzeln des angeborenen Immunsystems liegen früh in der Evolution verankert, es reagiert innerhalb von Minuten auf Pathogene und aktiviert das erworbene Immunsystem. Dieses stellt die hochspezifische zweite Barriere dar, die verspätet

antwortet und durch ihr immunologisches Gedächtnis auch einen Langzeitschutz bietet [36-40].

1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Der Unterschied zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem liegt insbesondere in den unterschiedlichen Rezeptoren, die auf verschiedene Antigene reagieren.

Das angeborene Immunsystem kann auf alle Pathogene reagieren, solange diese die sogenannten *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP) in oder auf sich tragen. Diese sind Strukturen, die in vielen Pathogenen vorkommen; die entsprechenden Rezeptoren nennen sich *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) [41], sind in der genomischen DNA verankert und können vererbt werden. So wurden sie im Laufe der Evolution vom Pflanzen- und Insektenreich an die Wirbeltiere übertragen. Mögliche PAMPs sind z.B. Lipopolisaccharide (LPS), Peptidoglycane, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA [42]. Alle haben trotz chemischer Vielfalt molekulare Gemeinsamkeiten und werden vor allem nicht vom Menschen produziert. Das ist von hoher Bedeutung für die Fähigkeit zur Unterscheidung von körpereigen und körperfremd [38]. LPS bilden zum Beispiel die äußere Zellwand gramnegativer Bakterien. TLR(Toll-*like*-Rezeptor)4 zusammen mit MD2 und CD14 formen einen Rezeptorkomplex für LPS. Eine Vielzahl dieser Bakterien kann so effizient erkannt werden [19]. Das angeborene Immunsystem ist unspezifisch und kann beim Individuum kein Immungedächtnis ausbilden. Die Epithelien, welche unseren Körper umgeben, sowie unsere Körperhöhlen auskleiden, sind Bestandteil der angeborenen Immunität und stellen die erste Barriere gegen Pathogene dar. Chemische, mechanische sowie biologische Faktoren hindern hier Pathogene, in unseren Körper zu gelangen oder sich ungehindert zu vermehren [19]. Zum Beispiel umschließt der im Rachen gebildete Mukus Erreger und hindert diese so an das Epithel zu adherieren. Zusätzlich wird er über den Mukoziliäraparat nach außen transportiert. Dieser ist zum Beispiel in der zystischen Fibrose defekt, die sich durch eine erhöhte Infektanfälligkeit der Lunge auszeichnet. In Speichel und Tränenflüssigkeit töten antimikrobielle Substanzen, wie z.B. Lysozyme und Phospholipase A, chemisch Bakterien ab [19].

Natural Killer (NK) Zellen töten intrazelluläre Viren ab. Phagozyten (Makrophagen und Neutrophile) liegen im Körpergewebe verteilt, um dort Pathogene zu bekämpfen. Aktivierte Makrophagen schütten Chemokine und Zytokine aus. So rekrutieren sie durch eine Entzündungsreaktion neue Phagozyten sowie Effektoren des Humoralen Immunsystems, um zum Phagozytieren der Erreger zu kooperieren. Auf den Phagozyten finden sich verschiedene *PRRs*, wie z.B. der Mannose Rezeptor, CD14 und TLRs. Nach Erkennen des PAMPs durch den Rezeptor, wird das Pathogen in einer endozytischen Vakuole eingeschlossen (Phagosom) und dort stark angesäuert. So kann bereits ein Großteil der Pathogene unschädlich gemacht werden. Außerdem werden eine Reihe von Toxinen, die auch bei der Tötung der eingeschlossenen Erreger helfen, im Inneren der Phagozyten produziert. Das aktivierte Komplementsystem kann durch Komplementfaktoren Mikroorganismen phagozytieren und lysieren sowie nach Aktivierung des erworbenen Immunsystems Antikörper produzieren [19].

Die Entzündungsreaktion zieht plasmatische Proteine an und dendritische Zellen beginnen Antigene zu exprimieren. Dadurch wird die Immunantwort der erworbenen Immunität angeregt. Diese führt die Bekämpfung der Erreger fort, falls diese nach den ersten Stunden einer Infektion noch nicht beseitigt werden konnten [19].

1.3.2 Das erworbene Immunsystem

Ist die Immunantwort der erworbenen Immunität nach der ersten Phase der Immunantwort nicht mit der Beseitigung der Erreger erfolgreich gewesen, kann das erworbene Immunsystem mit einer spezifischen Immunantwort weiter gegen diese angehen [19].

Durch klonale Selektion und Antigenkontakte bilden Lymphozyten eine große Vielzahl an erregerspezifischen Rezeptoren. Dafür besitzt jeder einzelne Lymphozyt eine einzigartige Genkodierung. Diese Immunität kann nicht vererbt werden, sondern muss von jedem Individuum durch wiederholte Antigenkontakte aufgebaut werden.

Nach einem Antigenkontakt unter anderem durch antigenpräsentierende Zellen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen proliferieren die Lymphozyten und aktivieren die Ausschüttung von Antikörpern. Einige dieser Lymphozyten differenzieren zu Gedächtnislymphozyten [19].

Diese Immunantwort ist hochspezifisch und benötigt deshalb Zeit, die speziellen Antikörper herzustellen. Aus diesem Grund ist die unmittelbare unspezifische Immunantwort in den ersten Stunden einer Infektion unverzichtbar.

Sind bereits Gedächtnislymphozyten vorhanden, kann bei einer zweiten Infektion durch den selben Erreger schneller als beim ersten Antigenkontakt eingegriffen werden [19].

1.3.3 Das angeborene Immunsystem: Rezeptoren und Liganden

Die *pathogen recognition receptors* (PRRs) des angeborenen Immunsystems umfassen mehrere Familien: Hauptvertreter sind Toll-like Rezeptoren, NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren (NLRs) und RIG(*retinoic inducible gene 1*)-I-like Rezeptoren. Diese kommen extrazellulär gelöst, membrangebunden, vesikulär oder zytoplasmatisch vor.

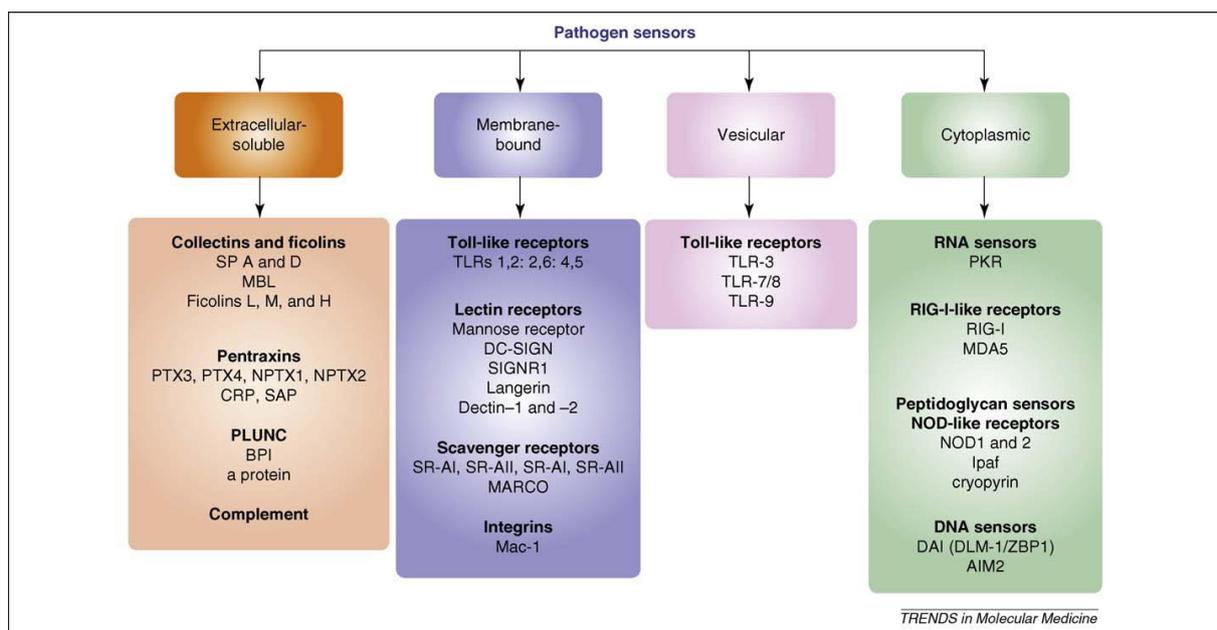


Abbildung 1.4.: Pathogenerkennungszusammenfassungen des angeborenen Immunsystems können Pathogene im extrazellulären Raum, in intrazellulären Vesikeln oder im Zytoplasma aufspüren [37]

Die TLRs sind die am besten untersuchten und am längsten bekannten Rezeptoren. Sie haben Ähnlichkeiten mit dem *Drosophila melanogaster* Toll-Molekül, welches ein wichtiger Teil der Abwehr gegen Pilzinfektionen bei der Fruchtfliege darstellt [39, 43]. Das Pendant zum Tollmolekül der Fliege ist der menschliche TLR4 [44]. Diese Entdeckung war ein großer Durchbruch im Verständnis, wie das Immunsystem auf Pathogene reagiert. Das Tollgen kodiert ein transmembranäres Protein, das

leucinreiche Wiederholungen enthält [45]. Dieses Gen und der humane Interleukin1-Rezeptor haben – auch wenn sie eine unterschiedliche extrazelluläre Domäne besitzen - einen gleich bzw. sehr ähnlich strukturierten intrazytoplasmatischen Toll-Interleukin1- Rezeptor (TIR) [46]. Diese TIR-Domäne ist bei fast allen Vertretern der TLR/Interleukin1 Familie vorhanden. Inzwischen sind beim Menschen 10 Toll-*like* Rezeptoren (TLR 1-10) und bei der Maus 12 (TLR1-9 und 11-13) bekannt [47]. Deswegen können, nachdem unterschiedliche Rezeptoren angesprochen wurden, ähnliche Rezeptor-Kaskaden durchlaufen werden. Daraus resultiert z.B. eine Aktivierung von NF- κ B (*nuklear factor*), IRF (*interleukin regulatory factor*) 3, IRF 5, IRF7 oder p38. Diese wiederum lösen die Expression immunostimulatorischer Moleküle, wie Typ-I-Interferone, Chemokine und Inflammatorische Zytokine aus [48]. Man kennt 5 Adapter-Proteine, die an die TIR-Domäne binden, nämlich das *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), den *TIR-domain-containing-adaptor* (TRIF), das *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) und das MyD88 adaptor-like protein (Mal). Sie sind allesamt für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verantwortlich, während das fünfte Protein, SARM genannt, spezifisch den TRIF-Signalweg inhibiert [49]. Spezifisch für den TLR/Interleukin1-Rezeptor-Signalweg sind die TNF(*tumor necrosis factor*) *receptor associated factors* (TRAFs) und die Familie der *interleukin-1 receptor associated kinases* (IRAK) [50, 51].

TLRs sind membrangebundene Rezeptoren, die entweder auf der Zellmembran im Plasma, oder in endozytosolischen Vakuolen zu finden sind. Die Vertreter der NOD-*like* Rezeptoren(NLR)-Familie liegen innerhalb des Zytosols. Auch wenn die Signalkaskade der TLRs essentiell ist, um mikrobielle Komponenten anhand der sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) zu erkennen, sind diese Antigene - auch wenn es der Name so suggeriert - nicht ausreichend, um zwischen pathogenen und non-pathogenen Mikroben zu unterscheiden. Diese PAMPs kommen nämlich in beiden Typen von Bakterien vor, so dass die NLRs zumindest teilweise diese Rolle zu übernehmen scheinen, indem sie mikrobielle Bestandteile innerhalb der Wirtszelle erkennen und durch Aktivierung der Caspase1 darauf antworten. Die Fähigkeit hierfür steht in Verbindung mit der Bildung von Poren in der Zellmembran durch pathogene Mikroben [42].

1.3.4 Zytosolische RNA-Erkennungsrezeptoren

In dieser Arbeit geht es um das zytosolische Erkennen von Nucleinsäuren, deswegen wird hier speziell auf die intrazellulären Rezeptoren näher eingegangen.

TLR3, TLR7 und TLR8 können als Antwort auf eine Virusinfektion Typ-1-Interferone induzieren.

NLRs sind zwar zytosolische PRRs für viele bakterielle PAMPs, jedoch können sie keine Nucleinsäuren erkennen [37].

Für die zytosolische Erkennung von RNA sind vor allem die Rezeptoren der RIG-I-like Familie verantwortlich.

retinoic inducible gene 1 (RIG-I) und melanoma differentiation associated gene 5 (MDA-5)

RIG-I (*retinoic inducible gene 1*) und MDA-5 (*melanoma differentiation associated gene 5*) sind ubiquitär im Zytoplasma verteilte RNA-Virus Rezeptoren. RIG-I wurde ursprünglich als ein Gen entdeckt, welches nach Behandlung mit Retinsäure in akuten promyeloischen Leukämie-Zellen induziert wurde [52].

Erst einige Jahre später wurde seine Rolle als antivirales Protein bekannt. Nachdem eine cDNA-Bibliothek durch Stimulation mit Interferon- β entstanden war, wurde diese zusammen mit einem IRF-Reporter-Gen in L929 Zellen gegeben. Es stellte sich heraus, dass eine Transfektion mit *poly(I:C)* den Promotor des IRF-Reporter-Gens induzierte [53]. Später wurde auch eine Variation des RIG-I Gens, mit einer Deletion innerhalb der ersten *caspase activation and recruitment domain* (CARD), entdeckt [54].

MDA-5 wurde in einem *differentiation induction subtraction hybridisation* (DISH) screen gefunden [55]. Diese Technik war entwickelt worden, um Gene zu bestimmen, die durch die Induktion der terminalen Differenzierung von humanen HO-1-Melanomazellen reguliert wurden [56]. Deshalb nannte man diese DISH-Gene *melanoma differentiation associated genes* (MDA). MDA-5 war ein in HO-1 humanen Melanomazellen befindliches Gen, welches durch Behandlung mit Interferon- β und Mezerein hochreguliert wurde und die Zelle irreversibel in Wachstum und terminaler Differenzierung hemmte [57].

Die Rolle von RIG-I als zytosolischer Rezeptor für virale RNA wurde bei der Suche nach Molekülen entdeckt, die, nach zytosolisch applizierter dsRNA,

Interferonproduktion induzierten [53]. Eine Überexpression von RIG-I in L929 Mauszellen führte nach zytoplasmatischer Stimulation mit dsRNA zu einer vermehrten Interferon- β -Promotor Aktivität. Es konnte aufgewiesen werden, dass diese Aktivierung von RIG-I-*like* Helikasen abhängig war und RIG-I *poly(I:C)* bindet.

RIG-I unterstützt auch die Interferon-Antwort von Zellen auf eine Infektion mit dem *Newcastle Disease Virus* und reduziert die Virulenz des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) und dem Enzephalomyocarditisvirus (EMCV). Die Wichtigkeit von RIG-I zur Erkennung von viraler RNA konnte auch durch Studien belegt werden, in denen cDCs von RIG-I *-/-* Mäusen mit Paramyxoviren infiziert wurden und daraufhin die Ausschüttung von Interferonen praktisch anihiliert wurde. Allerdings war die Interferon Produktion in pDCs abhängig von TLRs. Das wiederum ließ schlussfolgern, dass die Erkennung von viraler RNA durch RIG-I zellabhängig ist [58].

Für MDA-5 wurde ursprünglich nachgewiesen, dass es *poly(I:C)* erkennt und bindet, wenn auch schwächer als RIG-I [57, 59].

Überproduktion von MDA-5 inhibierte das Wachstum von EMCV und VSV, wie auch für RIG-I festgestellt worden worden war [59]. Später aber wurde entdeckt, dass RIG-I *poly(I:C)* nur *in vitro*, wohingegen MDA-5 diese dsRNA auch *in vivo* erkennen kann [60, 61].

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass RIG-I auch *single* Strang (ss)RNA-Moleküle mit einem 5'-ppp erkennt [62-64].

Die Entfernung der 5'-Triphosphate verhindert zwar nicht die Bindung an RIG-I, jedoch eine Interferon-Induktion. Zelluläre RNAs zeigen keine 5'-Triphosphate: entweder diese Struktur ist entfernt, oder sie hat eine Kappe welche sie verdeckt. Deshalb aktivieren körpereigene RNAs den RIG-I-Signalweg nicht.

Durch die Verwendung von *poly(I:C)*s verschiedener Längen hat man feststellen können, dass kurze Segmente dieses Polymers (bis zu 300 Basenpaaren) potente Aktivatoren für RIG-I und längere Segmente für MDA-5 darstellen [65].

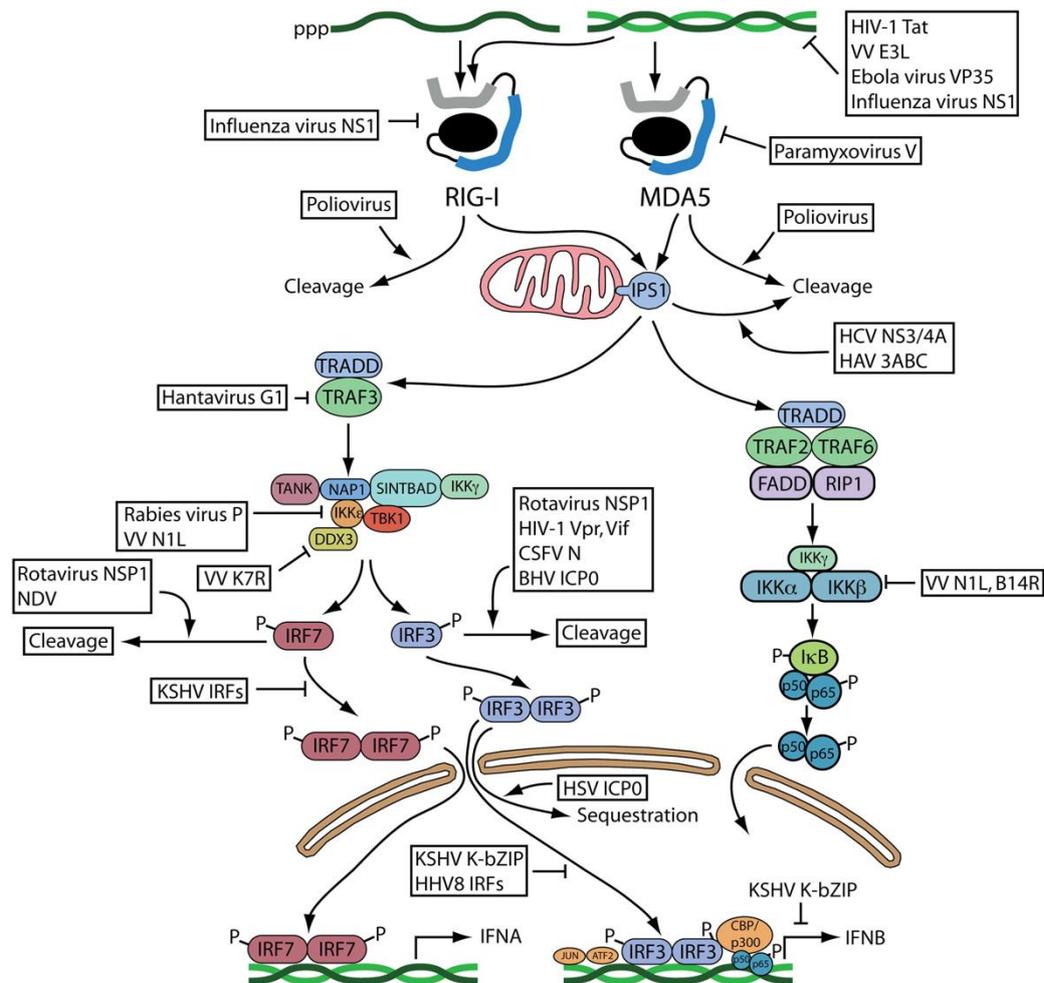


Abbildung 1.6.: Signalwege von RLRs und mögliche Angriffsstellen von Viren. Kurze dsRNA's oder 5'-ppp-ssRNA's aktivieren RIG-I; MDA-5 erkennt nur letztere. Über die verschiedenen Signalwege dieser Nukleinsäurerezeptoren wird die Ausschüttung von Typ-1-Interferonen induziert. Einige Viren haben die Möglichkeit diese Signalweiterleitung zu beeinflussen. Spitze Pfeile weisen auf eine Stimulierung, Pfeile mit flachem Kopf auf eine Inhibition hin [54].

In einer weitläufigen Untersuchung von Diabetes mellitus Typ 1-assoziierten *single-nucleotide-polymorphisms* (SNPs), wurden eine Reihe von Mutationen in dem *interferon induces with helicase C domain 1* (IFIH1 /MDA5) gefunden. Tatsächlich besteht eine starke Verbindung zwischen diesen SNPs im MDA-5 Gen, der 3'-intergenischen Region und der Anfälligkeit für Diabetes mellitus Typ 1 [66-68]. Außerdem wurde für SNPs, die eine Überexprimierung von MDA-5 bewirken, ein erhöhtes Risiko festgestellt, diese Krankheit zu entwickeln. Zuvor war für diese Studie die Expressierung von MDA5 bei einer grossen Zahl von Kontroll- und Diabetes-Patienten untersucht worden [66]. Folglich könnte ein Blockieren von MDA-5 einen Schutz vor autoimmunem Diabetes darstellen.

1.3.5 Zytosolische DNA-Erkennungsrezeptoren

Interaktionen von Proteinen mit DNA sind fundamentale Prozesse, die zur Entschlüsselung des genetischen Codes führen. Die meisten dieser Interaktionen finden im Zellkern statt, abgekoppelt von dem zumeist DNA-freien Zytoplasma.

Das Erscheinen von DNA im Zytosol, z.B. nach einer Gewebeverletzung, oder nach einer viralen Infektion, führt zu ihrem Erkantwerden durch spezifische Rezeptoren, mit anschließender Aktivierung der angekoppelten Signalwege.

Obwohl schon früh entdeckt wurde, dass virale dsRNA als eine molekulare Struktur fungiert, welche die Anwesenheit von körperfremder Substanz signalisiert [53], kam man bald zu dem Schluss, dass auch dsDNA aus nicht bakterieller Abstammung ähnliche Effekte hat [69-72].

Später wies man auf, dass DNA aus nukleinsäurereichen Abschnitten von mykobakteriellen Lysaten eine immunstimulierende Wirkung hat [73]. Es wurden Einzelstrang-Oligodeoxynukleotide verwendet, die zufällig aus Sequenzen ausgesucht wurden, welche mykobakterielle Proteine kodieren. So konnte schrittweise die sequenzspezifische Immunerkennung von mikrobieller DNA erarbeitet werden [74, 75].

Diese immunstimulatorische Eigenschaft von mikrobieller DNA wurde später der Anwesenheit von unmethylierten CpG Dinukleotiden zugeschrieben. CpG-Motive sind selten im menschlichen Genom, dafür aber umso reichlicher in mikrobieller DNA vertreten. Das führte zu der Hypothese eines Immunsystems von Säugetieren mit Signalrezeptoren, welches eigene von fremder DNA unterscheiden kann [76]. TLR9 defiziente Mäuse können nicht auf CpG-reiche DNA antworten. Dieses Wissen wurde für das ursprüngliche Modell verwendet, wie extrazelluläre DNA auf das Immunsystem wirkt [77]. Auch wenn es inzwischen ergänzt worden ist, hat dieses Modell noch immer Gültigkeit.

Spätere Studien belegten, dass auch intrazellulär applizierte dsDNA die angeborenen Immunität stimulieren kann [78, 79]. Die Tatsache, dass dsDNA während einer Infektion auch im Zytoplasma erscheinen kann, macht es zu einem wahrscheinlichen Ziel für DNA-Erkennungs-Signalwege, die einen natürlichen Abwehrmechanismus gegen Pathogene darstellen. Unter gewissen Umständen kann jedoch auch körpereigene DNA ins Zytoplasma gelangen und eine Entzündung durch dieselben Signalwege hervorrufen.

Es wurden auch TLR9- und MYD88- unabhängige Signalwege entdeckt, die auf mikrobielle DNA reagieren. Folglich mussten auch noch andere zytosolische DNA-Erkennungsmechanismen existieren [80]. Bisher wurden tatsächlich mehrere zytoplasmatische DNA-Rezeptoren und Signalwege mit unterschiedlichen Funktionen entdeckt. Doch ursprünglich entdeckten zwei Gruppen einen TLR-unabhängigen Erkennungssignalweg für intrazelluläre dsDNA [81, 82]. Natürliche DNA Doppelstränge kommen in unterschiedlichen Konformationen vor, abhängig vom Hydrierungsgrad und anderen Faktoren. In der Studie von Akira löste rechtsherum gewundene dsDNA (B-DNA), welche in Zellen vorherrscht, Typ-1-Interferonantworten, während linksherum gewundene dsDNA (Z-DNA) kaum eine immunostimulatorische Wirkung hatte. B-DNA konnte sowohl IRF3 als auch den Interferon- β -Promotor durch einen Signalweg, der auch TBK1 beinhaltet, aktivieren. Von den verschiedenen B-DNA-Typen war *poly(dA:dT)* der stärkste Transkriptionsstimulator [81].

Eine andere Studie verwendete eine synthetische 45mer dsDNA, von zufälliger Sequenz ohne CpG-Motive – bekannt auch als ISD (*Interferon-stimulatory DNA*). Diese konnte auch eine TLR-unabhängige, IRF3-abhängige Typ-1-Interferon Produktion in primären Makrophagen und dendritischen Zellen auslösen [82]. In Hek 293 Zellen konnte diese Beobachtung jedoch nicht gemacht werden.

Trotz dieser Widersprüche wurden die Ergebnisse dieser beiden Studien als Basis für das ursprüngliche Modell möglicher zytoplasmatischer dsDNA-Rezeptoren verwendet, welche die Transkriptionsaktivierung von proinflammatorischen Zytokinen veranlassen. Die unterschiedlichen Liganden dieser Studien schienen zwar verschiedene Rezeptoren, aber einen teilweise gemeinsamen Signalweg zu haben.

Auch wurde ein fünf Membran durchquerendes Protein entdeckt, *stimulator of IFN genes* (STING), welches sich flussabwärts in der Kaskade von sowohl RNA- als auch DNA-Signalwegen befindet [83-87]. STING hält eine wichtige Rolle in der Erkennung von zytoplasmatischer DNA inne und sein Verlust führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegen sowohl RNA- als auch DNA- Viren. Dieses Protein interagiert auch mit Komponenten des RNA-Erkennungssignalwegs, so wie RIG-I, IPS1 und IRF3. Seine Rolle besteht jedoch nur in der eines Adaptermoleküls.

Auch wenn die Identität vieler Rezeptoren noch verborgen ist, hat man inzwischen große Fortschritte in dem Verständnis für die komplexen Signalwege der

zytosolischen DNA-Erkennungsrezeptoren erzielt. Nachfolgend sind die bereits bekannten erläutert (siehe zur Übersicht auch Abbildung 4.1.).

DNA-abhängiger Aktivator von *interferon regulatory factors*

Der DNA-abhängige Aktivator von IRFs (DAI) (auch ZBP1 genannt), war das erste Molekül, von dem als möglicher zytosomatischer DNA-Rezeptor berichtet wurde [88]. *Knockdown*-Studien mit *small-interfering*(si)RNAs ließen vermuten, dass DAI essentiell für die Interferoninduktion als Antwort auf Stimulationen mit verschiedenen dsDNAs oder Viren sei. DAI konnte sowohl an B- als auch an Z-DNA binden, wobei die Verbindung mit B-DNA seine Interaktion mit IRF3 und TBK1 verstärkte (siehe auch Abbildungen 1.7. und 1.9.)

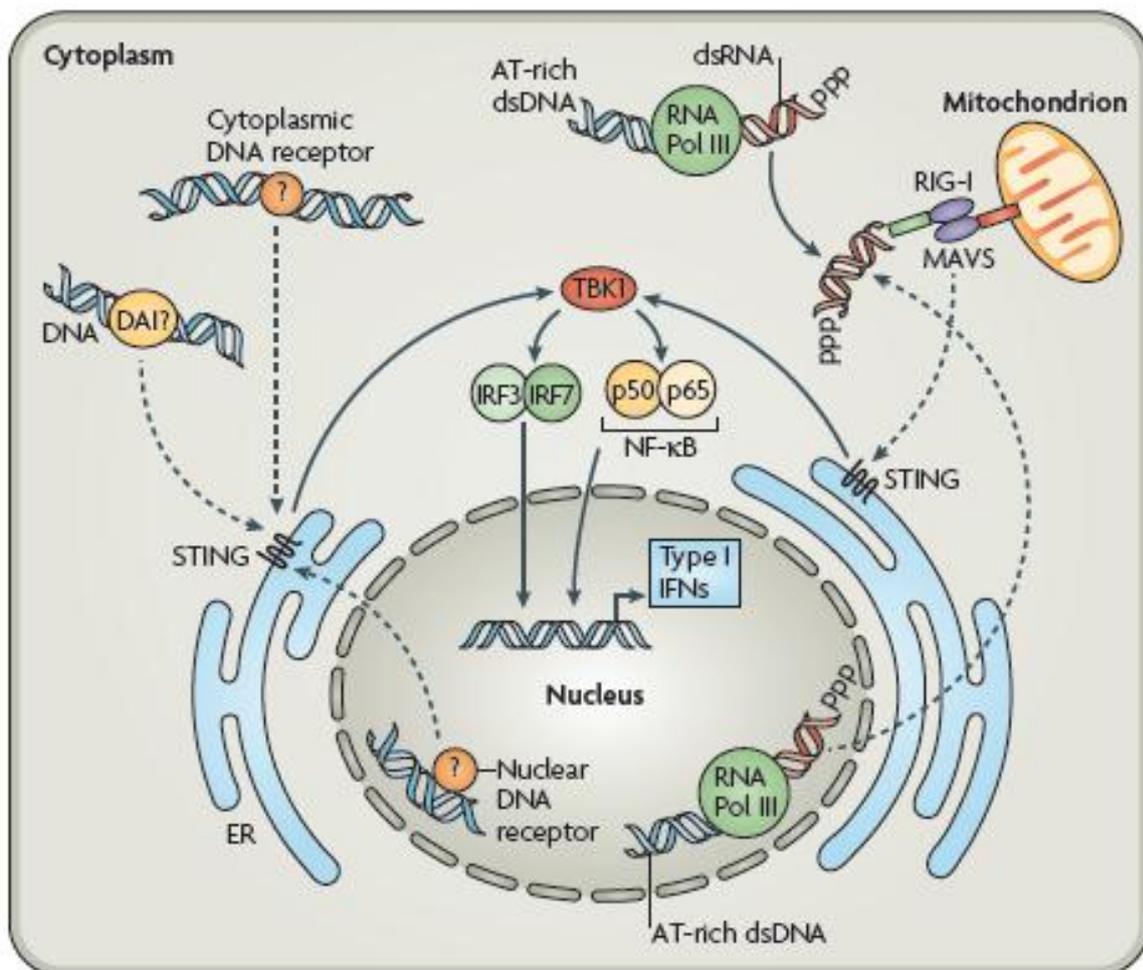


Abbildung 1.7.: Die Signalkaskaden der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren DAI und RNA Polymerase III [72].

Studien mit DAI-defizienten Mäusen jedoch zeigten, dass aus diesen Tieren isolierte Zellen auf die Stimulationen mit *poly*(dA:dT) oder plasmatischer DNA reagieren konnten. Auch die Tiere selbst konnten auf Infektionen durch einen DNA-Virus mit einer normalen Immunantwort reagieren [89, 90]. Daraus konnte geschlossen werden, dass DAI nur eine nebensächliche oder ersetzbare Rolle in der DNA-Erkennung spielt und kein essentieller zytosolischer DNA-Rezeptor ist.

Im Einklang mit diesen Entdeckungen stand auch, dass ein *Knockdown* von DAI in L929 Fibroblasten-Zellen die Typ-1-Interferonproduktion als Antwort auf dsDNA stark herunterregulierte. Derselbe Knockdown in embryonalen Mausfibroblasten beeinflusste die Immunantwort kaum [90].

Folglich kann die Immunantwort auf intrazelluläre DNA in verschiedenen Zelltypen variieren und es hat sich im Laufe der Evolution mehr als nur ein Rezeptor entwickelt, um intrazytoplasmatische dsDNA zu erkennen.

RNA-Polymerase III

In einer Studie zeigten HEK293 Zellen nach Stimulierung mit *poly*(dA:dT) eine starke Typ-1-Interferon und NF- κ B-Antwort. In der Fortführung dieser Studie wurden IPS1-/- HEK293 Zellen erneut mit *poly*(dA:dT) stimuliert. Diese wiesen daraufhin kaum noch eine Immunantwort auf. Deshalb ging man fälschlicherweise davon aus, dass IPS1 neben RIG-I und MDA-5 auch noch das Adapterprotein für einen weiteren zytoplasmatischen, eventuell essentiellen dsDNA-Rezeptor sei [81]. Schon die nächsten zwei Studien jedoch veranschaulichten, dass IPS1 -/- Mäuse eine normale Zytokinproduktion als Antwort auf *poly*(dA:dT) und andere Formen von dsDNA hatten [91, 92]. Eine dritte Studie belegte, dass *poly*(dA:dT) nicht von einer humanen RIG-I -/- Zelllinie erkannt werden konnte. Außerdem wurde in derselben humanen Zelllinie durch ein *knockdown* von IPS1 die von *poly*(dA:dT) ausgelöste Typ-1-Interferonantwort herunterreguliert [93].

Diese Ergebnisse waren höchst überraschend, da RIG-I ein RNA- und nicht DNA-bindendes Protein ist. Erst zwei weitere unabhängige Studien konnten, nachdem sie ähnliche Ergebnisse erzielt hatten, Licht ins Dunkel bringen [94, 95]. Beide Studien belegten, dass nicht die DNA im Zytoplasma für die Aktivierung von RIG-I verantwortlich ist, sondern die *poly*(dA:dT)-dsDNA im Zytoplasma von der RNA Polymerase III in eine *poly*(rA:rU)-dsRNA (eine 5'-ppp-dsRNA) umgeschrieben wird

(siehe auch Abbildung 1.7.). Diese war nun ein optimaler Ligand für RIG-I und konnte so den RIG-I-Signalweg aktivieren. Neben A:T-reicher DNA können auch synthetische RNA-Polymerase-III Gentranskripte [94, 95] (so wie kurze Haarnadel RNAs) oder pathogen-kodierte RNA-Polymerase-III-Transkripte (so wie die Eppstein-Barr-Virus kodierte RNAs 1 und 2) [94, 96] potente RIG-I-Liganden sein.

Die Transkription von *poly(dA:dT)* durch RNA-Polymerase-III in eine immunostimulatorische dsRNA findet zwar in gewissen Maus- und Menschenzellen statt [94], in mDCs von Mäusen aber ist die Induktion von Typ-1-Interferonen weder durch *poly(dA:dT)* noch durch ISD vom RIG-I Signalweg abhängig.

Aus diesen Studien kann man schlussfolgern, dass auch der RIG-I-gebundene Signalweg für die Erkennung von dsDNA nur für gewisse Zelltypen von Bedeutung und in anderen ersetzbar ist.

Absent in melanoma 2

In humanen Zellen erkennt ein weiterer Rezeptor dsDNA, unabhängig von RNA-Umschreibung und RIG-I-Stimulation. Nicht AT-reiche dsDNA von unterschiedlichen Längen, die durch PCR generiert wurden, konnten Interferonantworten induzieren, ohne immunstimulatorische RNA zu generieren [94].

Die meisten Studien, die bis dahin nach zytoplasmatischen DNA-Erkennungs-Rezeptoren gesucht hatten, hatten ihre Aufmerksamkeit auf Immunantworten wie die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-1-Interferonen fokussiert. Es wurde jedoch festgestellt, dass intrazelluläre dsDNA die Sekretion von Interleukin-1 β auslösen kann. Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-18 benötigen zu ihrer Aktivierung jedoch eine Proteolyse durch Caspase1 [97]. Diese ist normalerweise in einem inaktiven Vorstadium und wird durch einen multimolekularen Signalkomplex, der auch als Inflammasom bekannt ist, aktiviert [98]. Das Adaptermolekül ASC (*apoptosis-related speck-like protein*) verbindet sich nach Transfektion von dsDNA in Makrophagen mit Caspase1, aktiviert diese und lässt so Interleukin-1 β ausschütten. NLRPs (*nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeat and pyrin domain containing protein*), die normalerweise mit ASC interagieren, konnten als DNA-Rezeptoren ausgeschlossen werden [99, 100].

Vier unabhängige Gruppen schafften es, die fehlende Verbindung zwischen dsDNA und der Inflammasomaktivierung, durch die Identifizierung des aus der PYHIN-

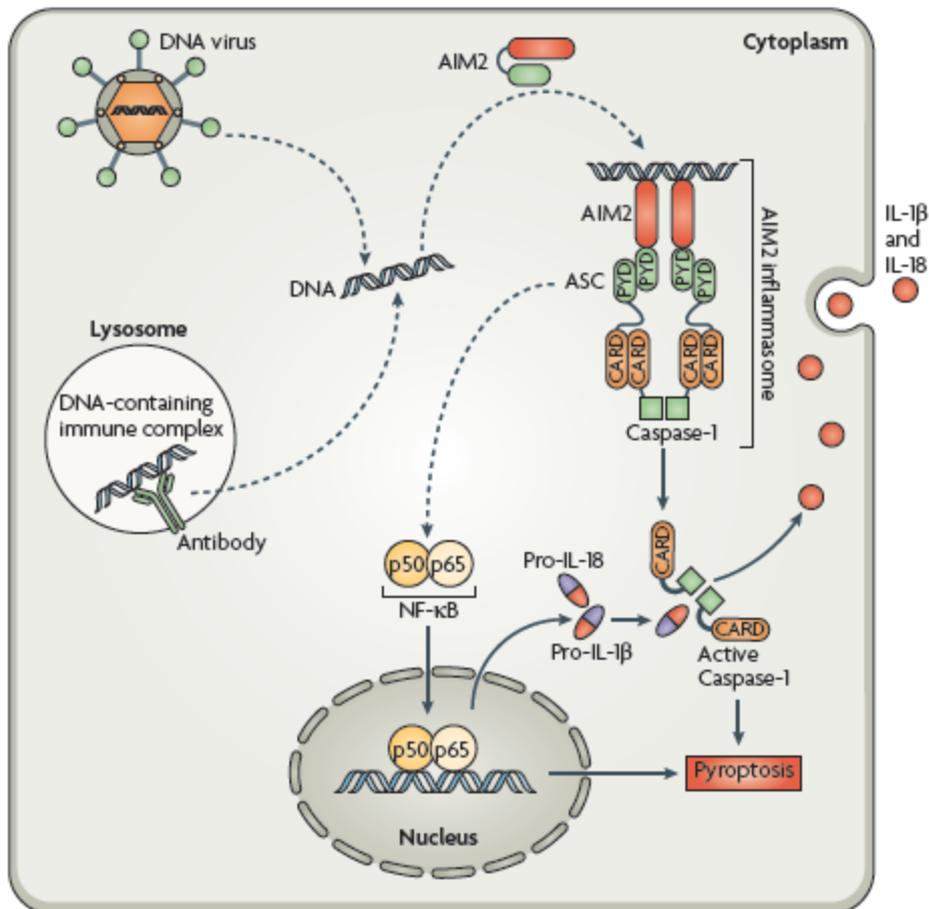


Abbildung 1.8.: Die Signalwege des zytosmatischen DNA-Rezeptors AIM2 mit Formung eines aktiven Inflammasoms [72].

Familie stammenden interferoninduzierbaren Proteins AIM2 (*absent in melanoma 2*) als Bindeglied, zu finden [100-103]. In Studien mit HEK293 Zellen wurde nach Stimulation mit dsDNA ASC rekrutiert und Caspase1 zu ihrer aktiven Form gespalten. So konnte ein funktionelles AIM2-Inflammasom geformt werden. Außerdem brauchten Vaccinia Viren AIM2 zur Formung eines aktiven Inflammasoms auf einem NLRP3-unabhängigen, aber ASC-abhängigen Weg (siehe auch Abbildungen 1.8. und 1.9.). AIM2 scheint nicht nur körperfremde DNA zu erkennen. DNAs unterschiedlicher Längen aus pro- und eukariotischen Quellen konnten auch AIM2 aktivieren. Zytoplasmatische dsDNA kann also bei Vorhandensein von AIM2 ein funktionelles Inflammasom schaffen und die damit verbundenen Ausschüttung von Interleukin-1 β und Interleukin-18 auslösen. Doch es gibt einen weiteren Effekt des aktivierten Inflammasoms. Eine spezifische Art von Zelltod, die Pyroptose, kann so induziert werden. Es wird spekuliert, dass dies eine wichtige Barriere für die Vermehrung und Ausbreitung von Pathogenen im Körper ist.

Interferon-inducible protein 16 (IFI16) und p204

Eine Interferon- β induzierende 70 Basenpaar lange dsDNA vom *vaccinia* Virus wurde verwendet, um aus zytosolischen Extrakten von humanen Monozyten DNA-bindende Proteine zu gewinnen. Dies führte zur Identifizierung des Interferon-inducible protein 16 (IFI16). Es rekrutiert STING und aktiviert TBK1-IRF3-abhängig Interferon- β Ausschüttung [104, 105]. Dieses Protein ist ein Vertreter der humanen PYHIN-Familie von Proteinen. Das strukturell ähnlichste Protein aus der murinen PYHIN-Familie ist p204. Dieses stellt einen essentiellen Faktor für die Aktivierung von IRF3 und NF- κ B sowie für die Ausschüttung von Typ-1-Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen nach Transfektion mit HSV-1 oder dsDNA-Oligonukleotiden in Mäusen dar [105].

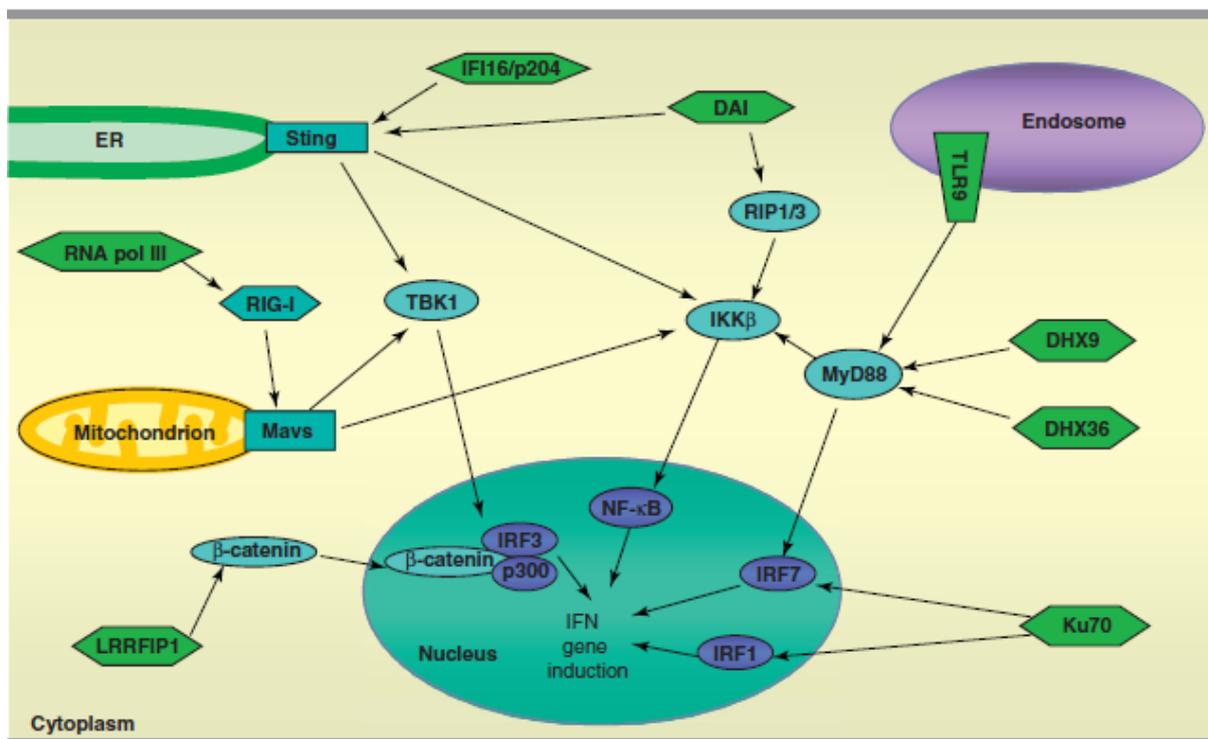


Abbildung 1.9.: Zytosolische DNA-Erkennungsrezeptoren und deren Signalwege [105].

p202

Bei Mäusen konnte das - wie auch AIM2, IFI16 und p204 - aus der PYHIN-Familie stammende, interferoninduzierbare Protein p202 dsDNA im Zytoplasma binden [103]. Da p202 aber eine Pyrin-Domäne fehlt, kann es kein aktives Inflammasom bilden (siehe auch Abbildung 1.10.). Ganz im Gegenteil, die Inhibierung von p202 führte dazu, dass eine vermehrte Caspase-Aktivierung und Interleukin-1 β -Ausschüttung stattfand. Folglich hat p202 eine hemmende Funktion. Interessant war auch, dass p202 als ein wichtiges Gen für die Veranlagung zu Systemischem Lupus Erythematosus in Mäusen identifiziert wurde [106].

Obwohl p202 nicht beim Menschen vorkommt, lassen diese Entdeckungen die Möglichkeit vermuten, dass der AIM2-vermittelte Signalweg eine Rolle in der Erkennung von körpereigener DNA bei Menschen und somit auch in der Entwicklung eventueller autoimmuner Erkrankungen spielen kann.

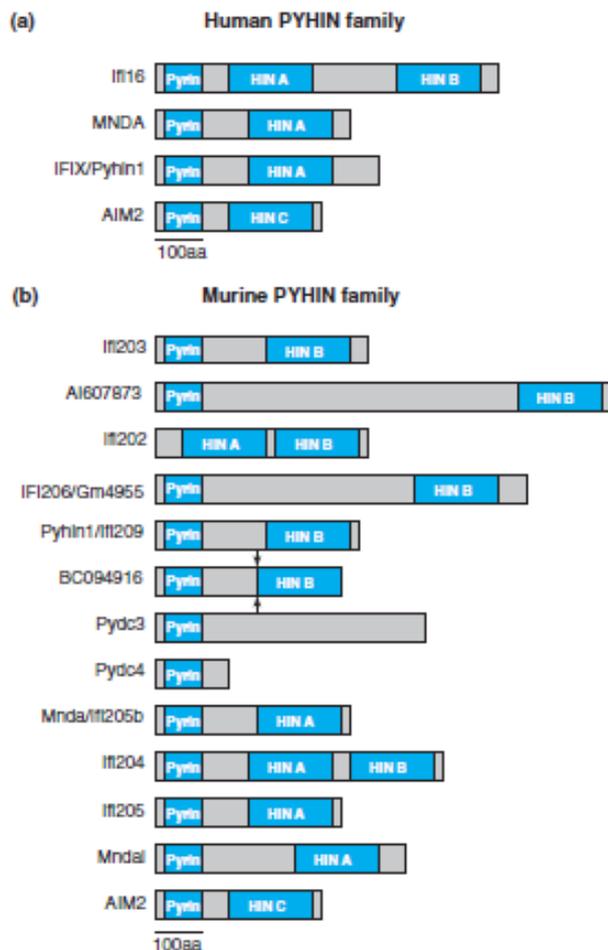


Abbildung 1.10.: Die humanen und murinen Vertreter der PYHIN-Familie [105].

DHX9 und DHX36

Im Jahre 2010 wurde in humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) die TLR9-unabhängigen und MyD88-abhängigen CpG DNA-Erkennungsrezeptoren DHX9 und DHX36 entdeckt. DHX36 induziert hauptsächlich Interferon- α durch IRF7 und DHX9 hauptsächlich NF- κ B abhängige Gene wie TNF α und IL6 nach HSV-1 Infektion von pDCs [105, 107] (siehe auch Abbildung 1.9.).

Ku70

Ku70, ein Protein, welches an DNA-Reparatur beteiligt ist, wurde durch Massenspektrometrie, siRNAs und Zellen von Ku70 *knockout*- Mäusen als ein dsDNA-bindendes Protein identifiziert. Dieses kann nach Aktivierung durch > 500 Basenpaare lange dsDNA über IRF1 und IRF7, aber nicht durch IRF3 oder NF- κ B, Typ III Interferone wie Inteferon- λ 1 induzieren [105, 108] (siehe auch Abbildung 1.9.).

Leucine-rich-repeat containing Protein (LRRFIP1)

Im Jahr 2010 wurde durch Verwendung eines synthetischen siRNA *library screens* an primären peritonealen Mausmakrophagen das *leucine-rich-repeat* (LRR) *containing* Protein (LRRFIP1) entdeckt. Dieses induzierte nach Infektion mit *L. Monocytogenes* und nach Transfektion mit dsDNA Interferon- β . Es wurde gezeigt, dass LRRFIP1 durch einen β -Katenin abhängigen Signalweg IRF3 aktiviert und Interferon- β induziert. Dass LRRFIP1 direkt dsDNA erkennt, ist wahrscheinlich aber noch nicht bewiesen [105, 109] (siehe auch Abbildung 1.9.).

1.4 Die Rolle der angeborenen Immunität in der Insulinitis

Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems besteht im Erkennen von Pathogenen, in deren Unschädlichmachung und im Schutz des Körpers vor Infektionen.

Allerdings kann eine inadäquate Immunantwort auch Ursache für das Entstehen von Krankheiten sein. Die Aktivierung der Rezeptorkaskaden des angeborenen Immunsystems trägt zu einer Reihe von Autoimmunkrankheiten, so wie dem Systemischen Lupus Erythematosus, der rheumatoiden Arthritis und der autoimmunen Hepatitis bei [110]. Einige Komponenten der angeborenen Immunität begünstigen auch die Entwicklung der Insulinitis und des Diabetes mellitus Typ 1 im Mausmodell [111].

1.4.1 Induktion der Insulinitis

Liganden für PRRs in der Insulinitis

Sowohl Maus- als auch humane Pankreasinseln exprimieren TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9, wobei TLR3 und 4 sehr hoch exprimiert werden [112-114]. Die Expression von TLR3 wird in β -Zellen durch Doppelstrang-RNA hochreguliert [113, 115], einer intermediären Nukleinsäure, welche während der Lebenszyklen der meisten Viren produziert wird.

Humane Inseln hingegen, die mit dem Coxsackievirus B5 infiziert, oder Interferon- α oder Interferon- γ und Interleukin-1 β ausgesetzt wurden, hatten eine höhere Expression von TLR3, RIG-I und MDA-5 [116, 117]. Intrazelluläre sowie extrazelluläre dsRNA, mit Provenienz aus beschädigten oder sterbenden Zellen, kann sowohl an TLR3 binden, als auch β -Zell Apoptose induzieren und Zytokin-, sowie Chemokinproduktion aktivieren; zumindest teilweise durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF-3 [115, 118-120].

Während die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren durch extrazelluläre dsRNA komplett TLR3 abhängig ist [121], verwendet intrazelluläre dsRNA alternative Signalwege, wie z.B. eine RIG-I und MDA-5 Aktivierung [61, 65, 122]. Interne dsRNA kann eine massive Produktion von Typ-1-Interferonen auslösen. Wenn diese zu lange anhält oder zu exzessiv ist, kann das zu dsRNA-induzierter β -Zell-Apoptose führen, die teilweise auch durch endoplasmatischen Retikulumstress (ER Stress) verursacht wird [120]. Es sind auch große Mengen von Interferonen in Pankreasgewebeproben von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 zu finden [123]. Interferon- α kann andererseits zu einem experimentellen, viral induzierten Diabetes beitragen [124, 125]. Aus diesen Beobachtungen könnte man schließen, dass die Aktivierung von TLR3 und/oder RIG-I und MDA-5 und vielleicht auch anderen Nukleinsäurerezeptoren in β -Zellen zu einer komplexen molekularen Antwort führen, die unter anderem mit der Aktivierung der Schlüssel-Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3 beginnt. Dieser Aktivierung folgt die Produktion von Interferon- α und - β , was wiederum zur parakrinen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat-1, zur Überexprimierung von MHC I Antigenen, weiterer Produktion von Interferon α und β und zum Ausschütten einiger Chemokine führt [115, 116, 118, 120, 126]. Das Resultat dieser Faktoren ist die Anziehung von Immunzellen, die proinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-1 β , TNF oder Interferon- γ ausschütten.

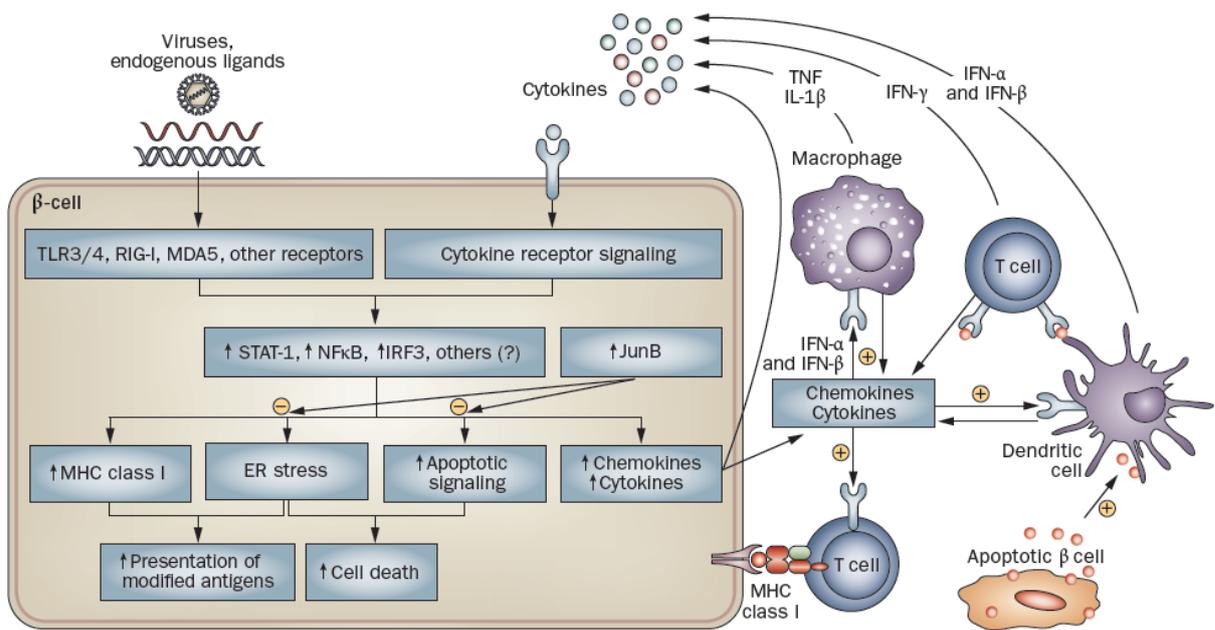


Abbildung 1.11.: Die Interaktion zwischen β -Zellen und Zellen des Immunsystems führen zu einer Induktion und Amplifikation der Insulinitis [16].

Lokale Entzündung, verbunden mit dem Auslösen von antiviralen, intra- sowie extrazellulären Abwehrmechanismen, sollte in den meisten Fällen eine virale Infektion beseitigen [16].

In einigen genetisch anfälligen Individuen resultieren diese zellulären Versuche, den invadierenden Virus zu zerstören oder zu neutralisieren, in einer unverhältnismäßigen Entzündungsreaktion. So z.B. kann der Transkriptionsfaktor JunB progressive Entzündung und verlängerten β -Zell-Verlust verursachen [16].

Wie und warum diese pathologischen Entzündungsprozesse genau auftreten sind Fragen, die noch beantwortet werden müssen. Es wird angenommen, dass ein exogener Ligand (in diesem Fall ein Virus) an *pathogen recognition receptors* (PRRs) bindet und so das angeborene Immunsystem aktiviert [16]. Diese Theorie wird durch den Nachweis unterstützt, dass virale Infektionen, v.a. durch Enteroviren, eine Rolle in der Etiologie des Diabetes mellitus Typ I haben. [127] Einige Enteroviren haben spezifische β -Zell-Tropismen und wurden in drei von sechs neu mit Diabetes mellitus Typ 1 erkrankten Patienten gefunden, deren Pankreata daraufhin untersucht worden waren [128]. Viren können auch durch molekularen Mimikri mit Diabetes mellitus Typ 1 verbunden sein. Wenn virale Antigene Epitope zeigen, welche denen der Selbstantigene sehr ähnlich sind, sind T-Zellen zuweilen nicht in der Lage zwischen

körpereigen und körperfremd unterscheiden [16]. In solchen Fällen werden T-Zellen anfangs sowohl durch virale Antigene, als auch durch Selbstantigene initiiert und lösen eine akute Entzündung aus. Wurde aber die virale Infektion bereits beseitigt, kann das weitere Vorhandensein von Selbstantigenen zu einer chronischen Autoimmunantwort führen [16]. Dies konnte am Modell des Ratten-Insulin-Promotor-Lymphozytischen Choriomeningitis Virus für Diabetes mellitus nachgewiesen werden [129]. Damit jedoch ein solcher Effekt zustande kommt, muss die Übereinstimmung zwischen eigenem Epitop und dem des Virus identisch sein. Das ist in der menschlichen Pathologie unwahrscheinlich. Molekularer Mimikri scheint eher zur Verstärkung eines schon begonnenen Autoimmunprozesses, als für seine Initiierung von Bedeutung zu sein [130].

Eine andere Möglichkeit wäre, dass endogene Liganden einen Entzündungsprozess starten, indem sie an PRRs binden - ohne dabei eine pathogene Rolle von viralen Infektionen auszuschließen [110].

Bestätigend hierfür ist auch, dass apoptotische β -Zellen von Mäusen, die eine sekundäre Nekrose durchlaufen, durch einen TLR2 initiierten Signalweg T-Zell Immunität auslösen. Autoimmuner Diabetes konnte, nach einer Verletzung von β -Zellen, durch eine verminderte Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen nach TLR2-Deletionen in zwei Mausmodellen signifikant reduziert werden [131]. Diese Entdeckung zeigt, dass β -Zelltod und seine Entdeckung durch TLR2 ein starker Auslöser für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1 ist. Außerdem sind Pankreasinseln, die von TLR4 $-/-$ Mäusen isoliert und in eine andere Nierenkapsel transplantiert wurden, gegen Organabstoßung geschützt [132].

Auch wenn diese Studien suggerieren, dass TLR2 und 4 im experimentellen Diabetes mellitus Typ 1 eine zentrale Rolle spielen, wurde diese Hypothese durch eine Studie in Frage gestellt, die zeigte, dass kein Unterschied im Vorkommen von Diabetes in nichtobesen, diabetischen (NOD)-Mäusen, mit einer genetischen Deletion von TLR2 und 4 festzustellen war [133]. In diesem Modell hängt das Beisteuern von MyD88 – einem Schlüssel Signalmolekül im TLR2 und 4-Signalweg – zur Entwicklung von autoimmunem Diabetes von der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora ab [16].

Das lässt auf eine komplexe Interaktion zwischen intestinaler Mikroflora, genetischem Hintergrund und dem angeborenen Immunsystem schließen.

1.4.2 Übergang zur erworbenen Immunantwort

Der Übergang von angeborener zu erworbener Immunität, der wahrscheinlich sehr früh in der Insulitis stattfindet, entscheidet, ob entweder der anfängliche Entzündungsprozess zu einer vollen Antwort des erworbenen Immunsystems führt, die das Potential hat, eine lange autoimmune Reaktion zu verursachen, oder sich auflöst und die Gewebeintegrität der Inseln erhält [16].

Die Rolle der erworbenen Immunität und der T-Zellen ist im Diabetes mellitus Typ 1 gut erforscht. Bedeutend ist auch der Dialog zwischen β -Zellen und dem Immunsystem durch lokale Produktion von Chemokinen und Zytokinen sowie ER Stress und Mediatoren von β -Zelltod zur Induzierung von Antigenexpression.

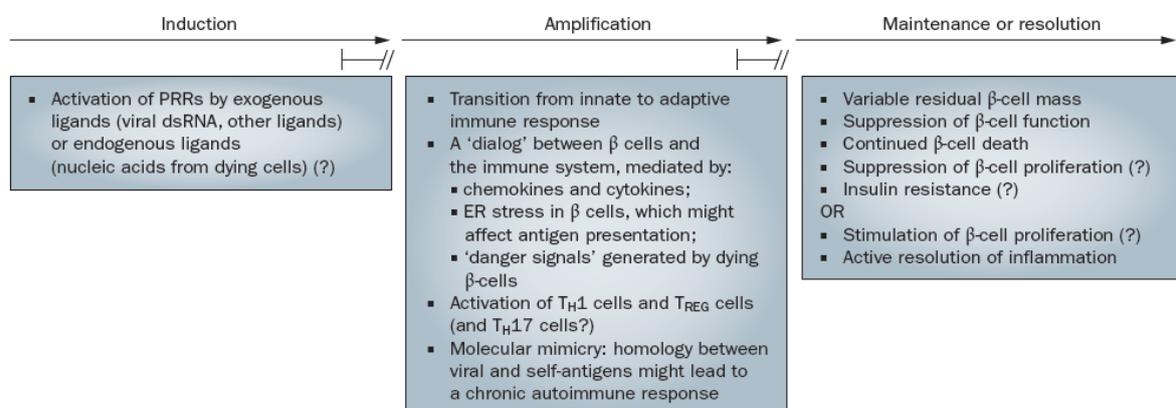


Abbildung 1.12.: Entzündungsprozesse, die in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I eine Rolle spielen könnten [16].

Chemokine sind Signalmoleküle, die die Leukozyten-Migration und -Aktivierung während der frühen Stadien der angeborenen Immunantwort steuern und zu dem Übergang von angeborener zu erworbener Immunität beisteuern [134]. Die Spezifität und Komplexität des Chemokinsystems entsteht sowohl durch das Ausschütten von spezifischen Chemokinen in verschiedenen inflammatorischen Reaktionen, als auch durch die kontrollierte Expression von Rezeptoren in Leukozyten, die - je nach Immunantwort - unterschiedlich ausfällt [135, 136].

Gerade diese Expression von Chemokinen ist in einigen Autoimmunkrankheiten verändert. Das scheint auch im Diabetes mellitus Typ 1 der Fall zu sein. Es wurden erhöhte Werte der von T1-Helfer abstammenden Chemokine CCL3 (Chemokin Ligand) , CCL4 und CXCL10 im Serum von Patienten gefunden, die kürzlich erst mit Diabetes mellitus Typ 1 diagnostiziert worden waren [137-139]. Eine

Longitudinalstudie dazu, die 256 solcher Patienten untersucht hat, entdeckte, dass eine negative Korrelation zwischen den Leveln von CCL3 und dem C-Peptid besteht [140]. In dieser Studie wurde eine große Übereinstimmung zwischen den Chemokin-Expressionsprofilen der Patienten und den Kontrollen gefunden. Das spiegelt die Schwierigkeiten wider, proinflammatorische Mechanismen im frühen Diabetes mellitus Typ 1 zu verstehen, wenn man Studien mit traditionellen Techniken angeht, um Serumproben oder periphere Zellen zu untersuchen [16]. Die meisten pathologischen Prozesse der frühen Phasen des Diabetes mellitus Typ 1 finden in der Mikroumgebung der Inseln und den pankreatischen Lymphknoten statt. Diese Gewebe sind im menschlichen Körper nur schwer zugänglich. Und weil die Inseln nur etwa zwei Prozent der Pankreaszellen ausmachen, werden die lokalen Entzündungssignale durch die Umgebung verdünnt [16].

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wandte eine spätere Studie *micro array* Analysen von gesunden, peripheren, mononuklearen weißen Blutzellen an. Diese wurden dem Serum von kürzlich oder bereits länger an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankten Patienten, sowie dem Serum von gesunden Kontrollen oder von Geschwistern erkrankter Patienten ausgesetzt. So sollte die Anwesenheit von proinflammatorischen Faktoren im Serum bestimmt werden [141]. Die hier erworbenen Erkenntnisse müssen nun noch in einer großen, prospektiven Studie bestätigt werden.

Studien an NOD- Mäusen zeigten hohe Level von CXCL10, CCL2, CCL20 und Interleukin-15 mRNAs und/oder Proteinen in Pankreasinseln während der prä-diabetischen Phase [142-145].

Im Verlauf dieser Erkrankung sind Makrophagen die ersten Zellen, welche die Inseln von *non-obese diabetic* (NOD)-Mäusen und *biobreeding*(BB)-Ratten infiltrieren. Eine Depletion oder Inaktivierung von Makrophagen verhindert eine Entwicklung der Krankheit [146]. CXCL10 und CCL2 ziehen Makrophagen an, und deren frühe Expression in den Inselzellen von NOD- Mäusen trägt zu der Rekrutierung von Makrophagen in den frühen Phasen der Insulitis bei.

Transgenische Expression, die zu einer starken Produktion von CCL2 durch β -Zellen führt, verursacht Insulitis und autoimmunen Diabetes [145].

In der erworbenen Immunantwort exprimieren diabetogene TH1 Zellen in NOD-Mäusen den Chemokin Rezeptor (CCR)5, seine Liganden CCL3 und CXCL10 sowie XC11, CCL1, CCL7 und CCL12 [147, 148].

Eine wichtige Quelle von Chemokinen während der Insulitis stellen auch die β -Zellen selbst dar. Isolierte β -Zellen von Ratten, die mit Interleukin-1 β und Interferon- γ oder mit dsRNA stimuliert wurden, zeigten eine erhöhte Expression von mRNAs, wie die der Zytokine und Chemokine CCL2, CXCL10, CCL20, CX3CL11 und Interleukin15 [119, 142, 143, 149, 150]. Humane Inseln, die mit Interleukin-1 β und Interferon- γ stimuliert werden, weisen einen erhöhten mRNA Gehalt von Interleukin15, CXCL10, CCL2, CCL20 und CX3CL1 auf und sekretieren Interleukin15, CCL2, CXCL10, CXCL19 und CCL20 in das Kulturmedium [142, 143].

β -Zellexpression von Chemokinen wird hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B [151, 152] und *signal transducers and activators of transcription* (Stat-)1 [153, 154] gesteuert. Diese zwei Transkriptionsfaktoren sind auch Mediatoren des zytokininduzierten Zelltods [155]. Also könnte man aus den oben erwähnten Entdeckungen schließen, dass im Laufe der Insulitis ein Dialog zwischen Immunzellen und den anvisierten β -Zellen stattfindet [136, 155]. In diesem produzieren aktivierte Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen Zytokine (z.B. Interferon- γ , Interleukin-1 β und TNF), welche die β -Zell-Sekretion von Chemokinen und Zytokinen induzieren. Diese Moleküle ziehen weitere mononukleare Zellen an, die multiple Chemokine ausschütten [136, 144].

So sammeln sich immer mehr aktivierte Makrophagen und T-Zellen in und um die Inseln. Das führt letztendlich zu einer außer Kontrolle geratenden Entzündungsreaktion [16].

Chemokinproduktion und β -Zellapoptose scheinen durch die selben intrazellulären Signalwege gesteuert zu werden, wie z.B. durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Stat-1 [155]. Also steht β -Zelltod in enger Korrelation mit einer starken Entzündung seiner Mikroumgebung. Produkte von sterbenden β -Zellen könnten vom Immunsystem als Gefahrensignal erkannt werden. Antigene, die von diesen Zellen entlassen werden – v.a. bei gleichzeitiger Anwesenheit von Entzündungsfaktoren, wie TNF, Interferonen und Chemokinen – könnten von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen werden und die Autoimmunantwort verstärken [156].

Caspase3 ist das größte Effektorenzym im apoptotischen Signalweg. *Knockout* Mäuse mit einer solchen Defizienz, sind gegen Streptozotozin-induzierten Diabetes geschützt. Das zeigt, dass β -Zellapoptose ein essentieller Schritt ist, um T-Zellen zu aktivieren [157]. Außerdem lösen apoptotische β -Zellen, die eine sekundäre Nekrose durchmachen, TNF-Produktion durch Makrophagen aus und aktivieren autoreaktive T-Zellen [131]. Diese Immunantwort-stimulierende Rolle von sterbenden β -Zellen ist wahrscheinlich abhängig vom Kontext.

Niedrige Dosierungen von Streptozotozin, die in junge NOD-Mäuse im Stadium der Präinsulinitis injiziert wurden, konnten die Prävalenz von Diabetes senken. Daraus könnte man schließen, dass eine geringe Zahl von apoptotischen Zellen in einer nicht entzündeten Umgebung zu einer Toleranz gegen β -Zellantigene führen kann [156].

Wenn man β -Zellen mit inflammatorischen Zytokinen oder dsRNA stimuliert, wird Endoplasmatisches Retikulum(ER)-Stress induziert. Das führt zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER und löst so eine Antwort gegen ungefaltete Proteine aus [120, 158, 159].

Diese Antwort versucht den Stress einzudämmen, der auf dem ER lastet. Es wird eine Wiederherstellung der Homöostase angestrebt, indem die Zufuhr von Proteinen eingedämmt, die Menge an ER Wächtern und die Zahl der Extrusion mit sofortiger Degradierung der unwiderruflich fehlgefalteten Proteine angehoben wird. Wenn diese Maßnahmen nicht helfen, wird Apoptose induziert [159]. Sterbende Zellen können immunologisch relevante Informationen an dendritische Zellen weitergeben. Das signalisiert die Art des Zelltodes und bestimmt das immunologische *outcome* der Phagozytose [160]. Peptide aus dem ER von sterbenden Zellen können in dendritischen Zellen auf MHC-I Moleküle geladen werden, ohne weiter zytosolisch prozessiert zu werden [161]. So präsentieren sterbende Zellen Antigene, mit einer genauen Aufzeichnung, was kurz vor ihrem Tod geschah [160]. Auch wenn dieses Signalisieren bei einer viral-infektiös induzierten Apoptose von Vorteil sein kann, kann es auch unerwünschte Konsequenzen für Insulin-produzierende β -Zellen haben. Insulinproduktion bedeutet nämlich ca. 50% der gesamten Proteinproduktion in β -Zellen und es akkumuliert im ER während der Stress-Perioden. In diesem Fall akkumuliert sich das Insulin zu einem gewissen Teil in einer fehlgefalteten Form [162], was seine Antigenität erhöht [159]. Hohe Antigenität resultiert in einer erhöhten

Wahrnehmung von Proinsulin und Insulin von antigenpräsentierenden Zellen, vor allem während einer Entzündung [16].

Studien wiesen auf, dass Insulin ein Schlüsselanigen für den autoimmunen Diabetes darstellt, sowohl bei Menschen als auch bei NOD-Mäusen [163-166].

1.4.3 Erhaltung oder Auflösung der Insulitits

Die späteren Entwicklungsstadien des Diabetes mellitus Typ 1, die entweder eine Chronifizierung oder eine Auflösung der Insulitits aufweisen, werden durch die Antwort des erworbenen Immunsystems bestimmt.

Laut gängiger Hypothese zeigt Diabetes mellitus Typ 1 klinische Symptome ab einer Zerstörung von mehr als 80% der β -Zellen. Dennoch könnte diese Prozentzahl bei Betrachtung einer Studie mit neuerkrankten Kindern, die älter als 10 Jahre sind, niedriger sein [167]. Die Insulinausschüttung bei diesen Patienten kann noch höher als erwartet sein: nach einer vollwertigen Mahlzeit hatten kürzlich diagnostizierte Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 einen Insulinspiegel von 50% gegenüber dem der nichtdiabetischen Kontrollen [168]. Das lässt eine Erklärungsnot für die oft starken Hyperglykämien dieser Patienten aufkommen. Daten aus Studien mit NOD-Mäusen lassen schließen, dass Entzündungsmediatoren, wie Zytokine, sowohl die Funktion der β -Zellen beeinträchtigen, als auch die periphere Insulinresistenz anheben. Außerdem bilden weibliche NOD-Mäuse eine fortschreitende Glukoseintoleranz aus, welche die Verschlechterung der Insulitits begleitet [169]. Inseln, die von diesen Tieren in der prädiabetischen Phase isoliert wurden, haben einen verschlechterten Glukosestoffwechsel und eine verminderte Insulinausschüttung. Diese Funktionen werden jedoch nach einer Woche *in vitro* Zellkultivierung zurückgewonnen [169]. Auch *in vivo* konnten diese Erkenntnisse bestätigt werden. Eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Zellen vor der Isolierung der Inseln zeigte den selben Effekt [170]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Inseln angestellt werden, die 8 Monate vor dem Tod einer 14-jährigen Patientin isoliert worden waren [171].

Diese Entdeckungen lassen schließen, dass Entzündungsmoleküle, die von infiltrierenden mononuklearen Zellen ausgeschüttet werden, eine reversible Inhibierung der β -Zellfunktion haben, welche der eigentlichen β -Zellzerstörung vorausgeht. Diese funktionale Verschlechterung wird – zumindest bei NOD-Mäusen

– durch eine schwere, entzündlich induzierte Insulinresistenz verschärft [172]. Man kann aus Beobachtungen der β -Zellproliferation von RIP-Interferon- γ transgenischen Mäusen [173] und NOD-Mäusen [174, 175] schlussfolgern, dass auch die β -Zellproliferation durch diese inflammatorische Antwort beeinflusst werden kann. Diese Proliferation wird durch immunsuppressive Agenten wie anti-CD3 Antikörper inhibiert. Folglich kann eine direkte Induktion von β -Zellproliferation durch Entzündungsmediatoren vermutet werden [176]. Andererseits zeigen *in vitro* Studien, dass Zytokine, wie eine Kombination von Interleukin-1 β und Interferon- γ , eine Entdifferenzierung der neu generierten β -Zellen induzieren können [177, 178]. Es bedarf noch weiterer Forschung zur Feststellung, welche Komponenten der Insulinitis die β -Zellregeneration stimulieren oder verhindern.

Viele Patienten, die eine milde Insulinitis entwickeln, können wahrscheinlich die Entzündung wieder auflösen und eine normale β -Zellfunktion zurückgewinnen.

Diese Theorie wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass einige Patienten positiv für Insel-Autoantikörper sind und auch schon eine beschränkte β -Zellfunktion haben, diese sich jedoch im Verlauf wieder erholt [179]. Außerdem zeigen die meisten positiv für Insel-Autoantikörper getesteten Menschen postmortem keine histologischen Zeichen für eine Insulinitis [180].

Zytokine und Chemokine werden sowohl von sterbenden β -Zellen, als auch von Immunzellen ausgeschüttet, sodass eine lokale Entzündung der Langerhansschen Inseln (Insulinitis) entsteht oder verstärkt wird. Ob diese Entzündung bei den einzelnen Patienten wieder abklingt oder sich chronifiziert, ist multifaktoriell bedingt und hängt von einem Zusammenspiel zwischen dem genetischen Hintergrund des Patienten, Umwelteinflüssen, viralen Infektionen und diätetischen Faktoren ab [3, 16, 130, 181].

1.5 Zelltod

1.5.1 Nekrose

Zelltod kann unkontrolliert oder programmiert stattfinden. Während der Nekrose, welche den unkontrollierten Zelltod darstellt, platzen die Zellen und ihr Inhalt ergießt sich in das umliegende Gewebe. Dies geschieht aufgrund eines durch einen Ionenpumpen-Ausfall bedingten Einstroms von Calcium und Natriumionen und damit folgenden osmotisch bedingten Aufquellen Zellen. Gründe hierfür können physikalische oder chemische Verletzungen sein, wie z.B. im Falle eines

Sauerstoffmangels beim Herzinfarkt. Der Nachteil der Nekrose besteht u.a. darin, dass nach dem Zelltod das Zellinnere ausläuft und so z.B. dort befindliche noch funktionierende Pathogene wieder frei werden. Ein weiterer unerwünschter Effekt wäre die Freisetzung von körpereigenen Proteinen wie Insulin im Falle einer Nekrose von insulinproduzierender β -Zellen. Diese Proteine besitzen bei gleichzeitig bestehender lokaler Entzündung eine hohe Antigenität. Zur Folge hätte dies eine Begünstigung einer autoimmunen Erkrankung wie Diabetes mellitus Typ 1 [19, 182].

1.5.2 Programmierter Zelltod

Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod. Im diesem Fall kommt es nicht zu einem Zerplatzen der Zelle, wie es bei der Nekrose der Fall ist, sondern das Zytoplasma schrumpft, der Zellkern löst sich auf und es findet eine DNA-Zerkleinerung von maximal 200 Basenpaaren statt. Die Zelle baut sich von Innen durch Abstoßung kleiner Vesikel so weit selbst ab, bis sie eine Größe erreicht hat, in der sie phagozytiert werden kann. Durch Apoptose wird verhindert, dass Pathogene und Antigene aus dem Zellinneren in die Umgebung gelangen [19].

Die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor löst über Signalwege den programmierten Zelltod aus. Diese Signalwege führen alle zu gewissen Cysteinproteasen, die Caspasen genannt werden [19].

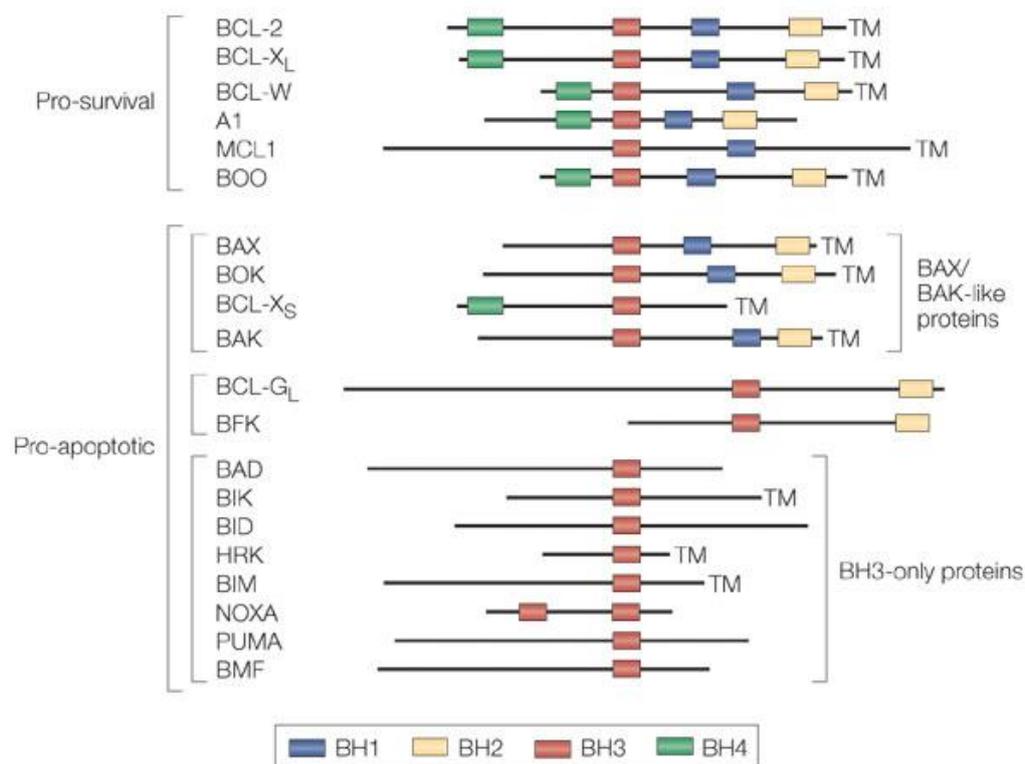
Für die Aktivierung von Caspase3 und 8 ist vor allem der Todesrezeptor-vermittelte Signalweg verantwortlich, während der BCL2-vermittelte Signalweg vor allem Caspase9 aktiviert (siehe auch Abbildung 1.11). Diese Signalwege sind untereinander durch weitere apoptoserelevante Proteine gekoppelt, die teilweise pro- und teilweise antiapoptotische Wirkungen erzielen.

1.5.3 Apoptoserelevante Gene

Neben den unter Punkt 1.5.2 erwähnten Caspasen gibt es viele weitere apoptoserelevante Proteine. Nachfolgend sind einige von diesen erläutert.

BCL-2

B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2) ist das Gen, welches das nach ihm benannte Protein kodiert. Gleichzeitig ist dieses Protein der Prototyp einer nach ihm benannten Protein-Familie. Diese kann Hetero- oder Dimere bilden und die Mitglieder haben



Nature Reviews | Immunology

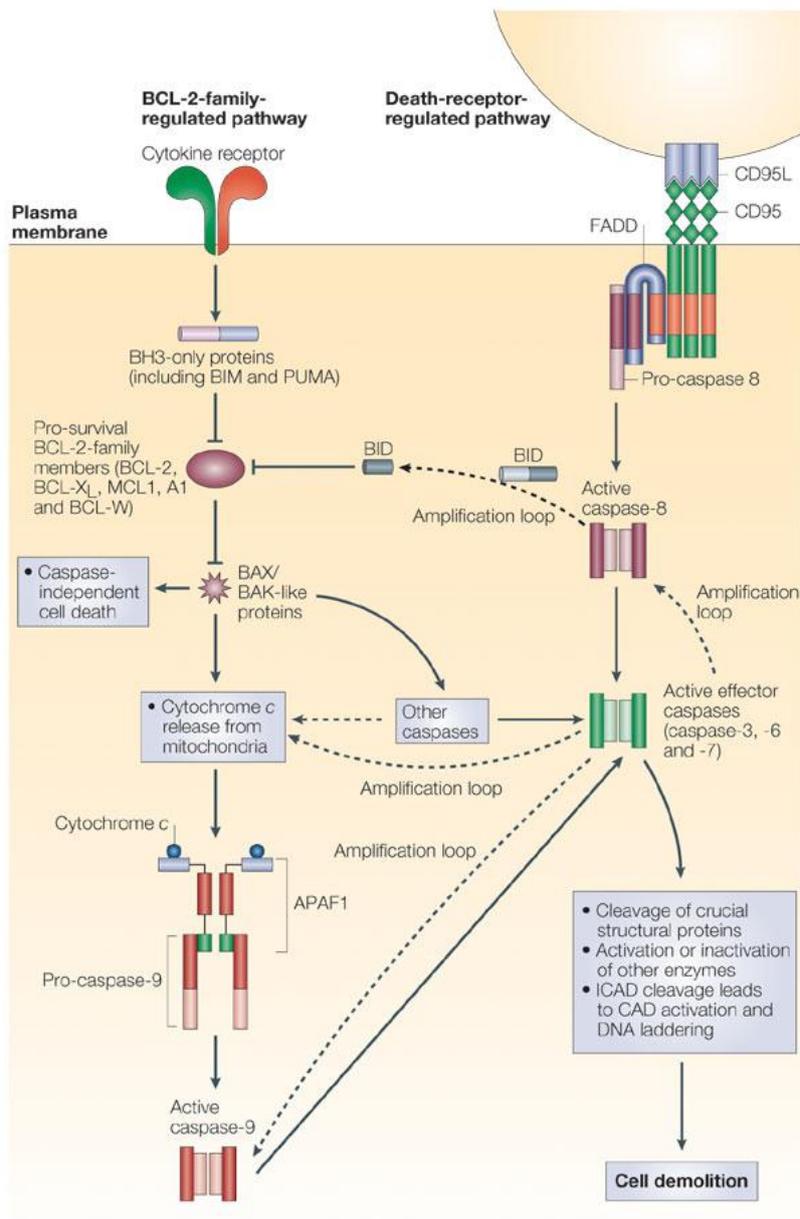
Abbildung 1.13.: Die Mitglieder der BCL-2 Familie [183].

eine oder mehrere BCL-2 *Homology Domains* (BH's) gemeinsam. Diese Proteine können die *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation* (MOMP) steuern und so anti- oder pro-apoptotisch wirken[184, 185].

PUMA

Der *p53 upregulated modulator of apoptosis*, kurz PUMA, ist ein proapoptotisches Mitglied der BCL-2-Protein Familie.

PUMA wird durch das tumor-supprimierende Protein p53 aktiviert. So kann es an BCL-2 binden, sich an Mitochondrien heften, dort Cytochrom C ausschütten lassen und die schnelle Einleitung des programmierten Zelltods einleiten. PUMA leitet das Signal von p53-induziertem Zelltod durch einen Cytochrom C und APAF1-[186, 187] oder einen Caspase8-[188] abhängigen Signalweg weiter.



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1.14.: Die Rolle verschiedener Apoptoserelevanter Gene [183].

Eine Inhibierung dieses Proteins reduziert die apoptotische Antwort auf p53 [189].

Es wurde gezeigt, dass Proteine dieser Familie, die, so wie auch PUMA, die BH3 (BCL-2 Homology 3 Domain) gemeinsam haben, potente Aktivatoren von programmiertem Zelltod sind [190]. Es scheint auch, dass nicht nur ein einzelnes Hauptgen den p53 Signalweg weiterleitet.

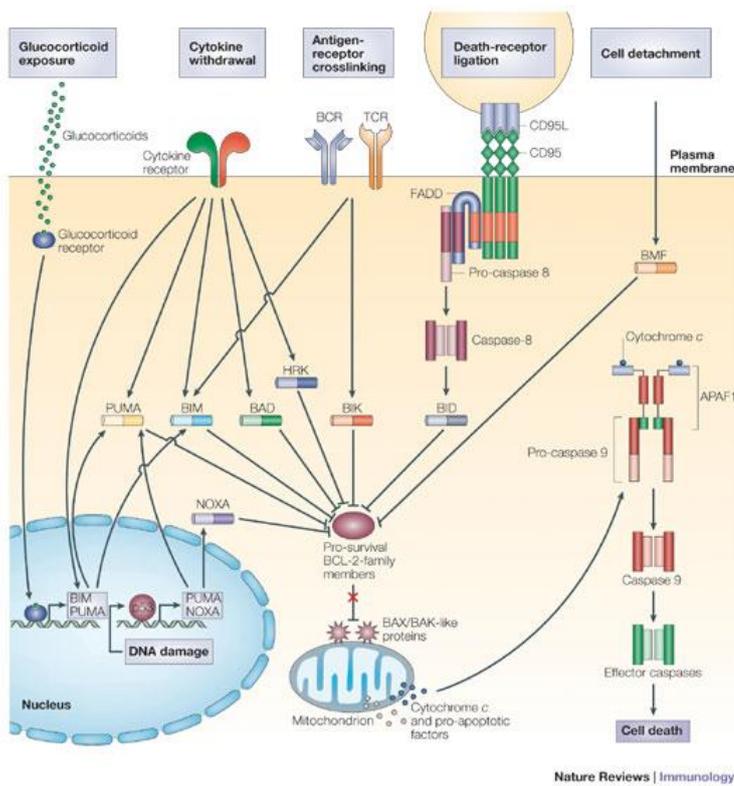
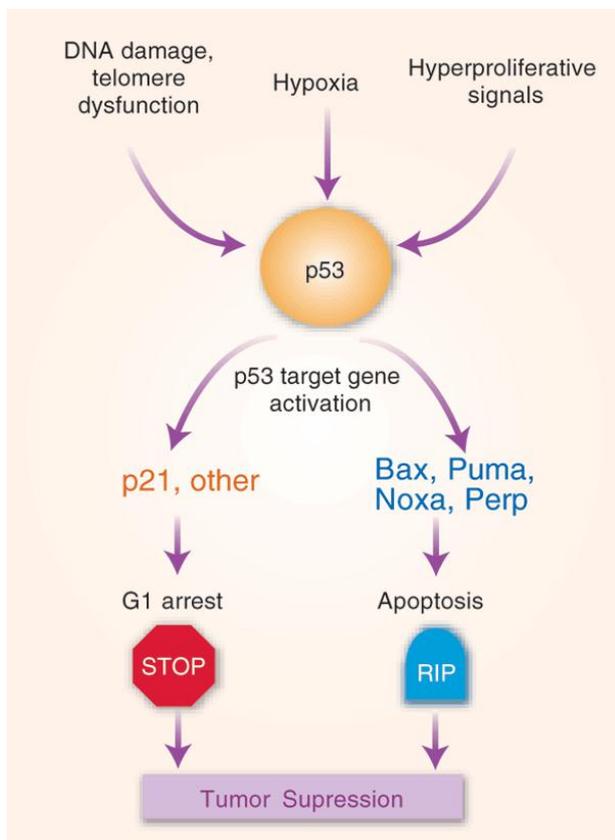


Abbildung 1.15.: Die Rolle verschiedener Apoptoserelevanter Gene [183].

NOXA



NOXA (Latein: "Schaden" (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*)) ist ein weiteres *BH-3-only*-Gen der BCL-2 Familie [191]. Wenn es aktiviert wird, kann es sich auch an Mitochondrien heften [185], andere, antiapoptotische BCL-2 Mitglieder inhibieren und über den Caspase9-Signalweg p53 abhängige Apoptose induzieren. Andersherum konnte man auch zeigen, dass durch Inhibierung von NOXA Apoptose verhindert werden konnte [191, 192].

Abbildung 1.16.: Die Rolle verschiedener apoptoserelevanter Gene [193].

1.6 Fragestellung

Um also die Rolle von dsDNA in der Insulinitis und Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I zu erforschen, wurden folgende Fragestellungen postuliert:

- Existieren zytosolische Nukleinsäurerezeptoren, welche dsDNA im Zytosol von Inselzellen erkennen? Wenn ja, kann man z.B. durch Entzündungsmediatoren eine vermehrte Expression dieser induzieren?
- Können durch dsDNA stimulierte zytosolische Nukleinsäurerezeptoren Entzündungsmediatoren freisetzen?
- Findet nach dsDNA-Stimulierung der Nukleinsäurerezeptoren Zelltod statt? Wie hoch ist danach die Proliferations- und Lebensfähigkeit? Sind bei verminderter Lebensfähigkeit apoptoserelevante Gene involviert?
- Kann man *in vitro* gewonnene Erkenntnisse auch im Mausmodell bestätigen? Weist eine Stimulation mit zytosolischer dsDNA in β -Zellen von Mäusen eine diabetogene Wirkung auf?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde für die *in vitro*-Versuche am β -Insulinoma-Zellmodell mit Min-6 und Ins-1 Zellen gearbeitet. Als dsDNA-Ligand für die RIG-I-like Rezeptoren wurde *poly(dA:dT)* verwendet und in allen Versuchen mit einem kationischen Lipid als Vektor ins Zytoplasma transfektiert.

Im Tierversuch wurde C57BL/6 Wildtyp-Mäuse *poly(dA:dT)* samt Vektor i.p. injiziert und der Verlauf eines Diabetes mellitus untersucht, sowie mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Zell-Kultur

2.1.1 Material

24-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden, D
6-Well-Platten	Costar Corning, Schiphol-Rijk, NL
75-cm ² -Flask	TPP, Trasadingen, CH
96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (D-MEM)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA (Versen)	Biochrom KG, Berlin, D
Einmal-Küvetten 1,5 ml Plastibrand®	Brand, Gießen, D
Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml	TPP, Trasadingen, CH
Falkons 15 ml	BD, Heidelberg, D
Falkons 50 ml	BD, Heidelberg, D
Fötale Bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, D
Glukose 20%	Braun, Melsungen, D
Kryobox Cryo 1 °C <i>freezing cont</i>	Nalgene™, Rochester, NY, USA
<i>Kryovials</i>	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Immobilon PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach/Ts., D
Lichtmikroskop Leitz DMRBE	Leica Microsysteme, Solms, D
Lichtmikroskop Leitz Diavert	Leica Microsysteme, Solms, D
<i>Lipofectamine</i> ™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, D
Maus Interferon-β	PBL Biomedical, Piscataway, NJ, USA
Multikanalpipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, D
Nadeln BD Microlance 26 G x ½	BD, Heidelberg, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Nunc-Immuno™ 96 <i>Microwell</i> ™ Plates	Nunc, Wiesbaden, D
Opti-MEM®	Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin-Streptomycin (PS) (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Perfusorspritze	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Pipettenspitzen 1-1000 µl Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen, D.

Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipetten Pipetman®P	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe Pipetus®-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikfilter 70 µm	BD, Heidelberg, D
<i>poly(I:C)</i>	Invivogen, Toulouse, F
<i>poly(dA:dT)</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Preseparationsfilter	Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, D
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Falcon®/BD, Heidelberg, D
Skalpelle No. 20	Feather Safety Razor Co., JP
Spritzen BD Plastipak 1000 µl, 5 ml	BD, Heidelberg, D
<i>Steril card hood class II, Typ A/B3</i>	The Baker Company, Sanford, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Tween-20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
UV-Licht	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Vortex Genie 2™	Bender&Hobein AG, Bruchsal, D
Wasserbad HI 1210	Leica Microsysteme, Solms, D
Zellinkubator Typ B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Zellkulturschalen 10 cm	TPP, Trasadingen, CH
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	VWR International, Darmstadt, D
Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode, D

2.1.2 Kultur und Passage von Ins-1- und Min-6-Zellen

Die Ins-1 Zelllinie wurde in RPMI 1640 Medium, mit 10%FCS, 1%PS sowie 50µM β-Mercapto-Ethanol angereichert, zumeist in 75 cm²-Flaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die Min-6 Zelllinie wurde in DMEM + Glutamax Medium, mit 10 %FCS, 1 %PS, 50µM β-Mercapto-Ethanol, sowie 8,75ml 20%Glukose (pro 500 ml Mediumflsche) angereichert, zumeist in 75 cm²-Flaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Für die Zellpassage wurde generell unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturhaube gearbeitet.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit 6 ml PBS gespült und dieses dann wieder abgesaugt. Anschließend wurden 7,5ml 1,5 mMol EDTA, in PBS gelöst, auf die Zellen gegeben und die Flasche 5-10 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde unter dem Mikroskop geprüft, ob alle Zellen sich gelöst hatten und eventuell noch leicht mit der Handfläche auf die Seite der Flasche geklopft, um die letzten Zellen zu lösen.

Wieder unter der Zellkulturhaube wurden mit einem Pipettus weitere 7,5 ml Medium dazugegeben, vorsichtig resuspendiert und anschließend in ein 50 ml-Falkon übertagen. Dabei war darauf zu achten, dass nichts an den Wänden der Flasche hängen blieb. Jetzt wurden die Zellen Ins-1 Zellen 5 Minuten bei 1050 rpm und die Min-6 Zellen bei 900 rpm zentrifugiert.

Anschließend wurden das Medium mit EDTA - aber ohne Zellpellet - abgesaugt. Dieses Pellet wurde dann bei den Ins-1 Zellen ca. 15 mal mit einer 1 ml Pipette und 1ml Medium resuspendiert, um später Zellklumpen zu vermeiden (*single cell suspension*). Bei den Min-6 Zellen wurde das Pellet ca. acht mal mit einem 10 ml Pipettus und 10ml Medium resuspendiert.

Die Ins-1 Zellen wurden in der Regel im Verhältnis 1:3 und die Min-6-Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet.

Spätestens alle zwei Tage wurde Medium gewechselt, bis die Zellen wieder konfluent waren.

2.1.3 Gewinnen von primären Maus-Pankreasinseln

Material

2-ml-Spritze	Braun, Melsungen, D
30G Kanüle	Braun, Melsungen, D
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe, D
Liberase	Roche, Indianapolis, USA

Zunächst mussten folgende Materialien bereit gestellt werden: OP-Besteck, Q-Tipps, Kompressen, 2ml-Spritzen und 30G Kanülen, kleine und große Petrischalen, Falkons, silikonisierte Pasteurpipetten.

Im Anschluss hieran wurden folgende Vorbereitungen getroffen: Vorbereitung der Kollagenase (=Liberase: 1,5 mg/ml in HBSS; ca. 20 Minuten wurde es stehen gelassen, dann steril filtriert) und von HBSS mit 1%FCS und 0,5% P/S. Die Zentrifuge wurde auf 4°C gekühlt.

Nach den Vorbereitungen kam der eigentliche Teil der Isolation. Zunächst wurde die Maus getötet und das Abdomen großräumig eröffnet. Der Darm wurde nach rechts ausgelagert. Der Pankreasgang wurde bei seiner Einmündung in den Darm abgeklemmt. Unter dem Mikroskop wurde nun mit einer 30G Kanüle 2 ml Liberase in den Gallengang gespritzt, sodass sich der Pankreas aufblähte. Nun wurde der Pankreas entnommen, in eine Petrischale gelegt und 3 ml Kollagenase dazugegeben. Die Organe wurden so 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert, wobei diese immer wieder etwas geschüttelt wurden, um zu kontrollieren, wie weit der Verdau vorangeschritten war. Anschließend wurde der Verdau durch Zugabe von 10ml kalten HBSS + 1%FCS+ 0,5% PS gestoppt. Das restliche Gewebe wurde durch mehrfaches Resuspendieren zerkleinert und in ein Falcon pipettiert. Hier wurde es nun dreimal mit dem HBSS-Gemisch gewaschen (1000 rpm, 4 min, 4°C).

Nun wurde das Pellet in 10 ml des HBSS-Gemisches aufgenommen und in eine mittlere Petrischale überführt.

Unter dem Mikroskop konnten jetzt die Zellen manuell isoliert werden, wobei die isolierten Inseln gekühlt wurden. Diese Zellen konnten zur Durchführung von Versuchen auf eine 96-Well-Platte gegeben.

2.1.4 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Für manche Versuche war es notwendig die Anzahl der Zellen pro Volumen Medium zu kennen, wie z.B. beim Viabilitätstest, wo man verschiedene Zellzahlen in verschiedenen Wells brauchte.

Zunächst ging man wie oben beschrieben bei der normalen Zellpassage vor, bis zu dem Punkt, an dem man die Zellen zentrifugiert hatte und das Zellpellet nach dem Absaugen übriggeblieben war. Nun gab man eine geringe Menge Medium (ca. ein bis vier ml) hinzu. Nach vorsichtigem Resuspendieren entnahm man 10µl aus dieser Zellsuspension und verdünnte sie 1:10 mit PBS in einem Eppendorf Röhrchen.

Nun konnte man die Neubauer Zell Kammer vorbereiten: Putzen und anschließend das Glas andrücken und/oder reiben, bis man regenbogenfarbige Ringe an den

Seiten sah. Dann pipettierte man ca. 15-18 µl der Probe an das untere Ende der Scheibe, zählte die Zellen der 64 Kammern ab und rechnete nach folgender Formel die Zellkonzentration aus:

$$(n \times 10000) / 4 \times 10 (\text{Verdünnung}) = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

2.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen in und aus flüssigem Stickstoff

Zum Einfrieren wurde verfahren wie beim Zellenpassagieren, bis zu dem Punkt, an dem zentrifugiert, sowie Medium und EDTA abgesaugt worden war. Das Zell-Pellet wurde in FCS + 10 %DMSO bei Ins-1-Zellen und in FCS + 9 % DMSO bei Min-6-Zellen resuspendiert. Nach dem Zählen wurde die Suspension derart mit Medium verdünnt, dass die Konzentration 1.000.000 Zellen / ml Medium war. Diese wurden dann je 1 ml in spezielle kälteresistente Eppendorf Röhrchen pipettiert, und dann in eine kälteresistentes Behältnis für Eppendorf Röhrchen gelegt. Dieser gesamte Vorgang wurde möglichst bei niedriger Temperatur, auf Eis gekühlt und steril in der Zellkulturhaube vorgenommen.

Das Behältnis mit den Eppendorf Röhrchen wurde dann für 48 Std bei -80°C gelagert und danach in den Tank mit flüssigem Stickstoff verlagert (Lagerung erfolgt in der Gasform, über dem eigentlichen flüssigen Stickstoff).

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstofftank genommen, und im Wasserbad bei 37°C weniger als 5 Minuten aufgetaut. In der Zellkulturhaube wurden 10 ml des jeweiligen Mediums zusammen mit den aufgetauten Zellen in ein 15 ml Falcon gegeben und bei 200 rcf vier Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde nochmals mit 10 ml Medium resuspendiert und auch bei 200 rcf vier Minuten zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand abgesaugt, diesmal mit 6 ml Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-Flasche gegeben. Am Ende wurde die Flasche in den Brutschrank gelegt, und es wurde weiter nach dem Protokoll des Passagierens verfahren.

2.1.6 Stimulierungen

Da hauptsächlich zytosolische Rezeptoren untersucht wurden, wurde für die Zellstimulation ein Vektor benötigt, der die virale RNA (eigentlich die künstlichen Liganden) an den Rezeptor ins Zytoplasma transportieren konnte. Als Vektor wurde hierfür ein kationisches Lipid namens Lipofektamin verwendet. Nachdem bestimmt

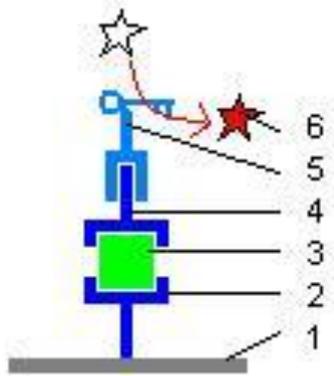
worden war, mit welcher Konzentration Zellen eines *Wells* von einer 96-Well-Costarplatte mit einem Liganden stimuliert werden sollten (z.B. *poly(dA:dT)*) wurde in der Zellkulturhaube unter sterilen Bedingungen zunächst in einem Eppendorf Röhrchen diese Menge mit 25 µl Optimem Medium verdünnt und anschließend dieselbe Menge an Lipofektamin mit weiteren 25 µl Optimem Medium in einem anderen Eppendorf Röhrchen verdünnt. Unmittelbar im Anschluss wurde der Inhalt des ersten Eppendorf Röhrchen in das Zweite pipettiert, durch Resuspendieren vermischt und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die 50 µl auf die abgezählten Zellen des *Wells* gegeben und für unterschiedliche Zeiten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert.

2.2 Viabilitätstest

Nach Stimulierungen, wie im letzten Punkt erläutert, wurden die Zellen inkubiert und dann u.a. auch auf Ihre Lebens- und Proliferationsfähigkeit hin untersucht. Dafür wurde das „*CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*“ Kit von ProMega (CA#G3580) verwendet. Es wurde genau nach Protokoll vorgegangen. Zunächst wurde in der Zellkulturhaube, das alte Medium mitsamt Stimulantien abgesaugt und durch frisches DMEM Medium +10 % FCS bei Min6 bzw RPMI Medium + 10%FCS bei Ins1 Medium ersetzt (100µl/*Well* einer 96-Well-Costarplatte). Anschließend wurden – möglichst bis unmittelbar zuvor gekühlt und unter möglichst wenig Licht – je 20 µl des kolorimetrischen Reagenz auf das/die *Wells* gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Stunden wurde die Lesung im ELISA-Leser unter 490nm Absorbanz gemacht (mehrere Lesungen sind möglich, z.B. nach 2, 3 und 4 Stunden). Je höher die Lebensfähigkeit war, desto dunkler die *Wells*, und desto höher die Werte in der Lesung.

2.3 *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches eine enzymatische Farbreaktion als Grundprinzip hat. Damit können Viren, Proteine, Hormone, Toxine oder Pestizide nachgewiesen werden. Wie der Name Sandwich-ELISA schon sagt, wird das zu untersuchende Antigen zwischen einem *capture*-Antikörper, der auf der Platte haftet und einem



markierten *detection*-Antikörper gefangen. Mit Zugabe von Substrat wird das Sandwich sichtbar und colorimetrisch messbar.

Alle Elisas wurden genau nach Protokoll der Hersteller durchgeführt.

Abbildung 2.1: Sandwich- ELISA: 1) Platte 2) *Capture*-Antikörper 3) Zu Untersuchendes Antigen 4) *Detection*-Antikörper 5) Enzym, welches das Reaktionsprodukt umsetzen kann (metaphorisch als Schlüssel dargestellt) 6) Reaktionsprodukt, welches hier umgesetzt wird und ein colorimetrisch messbares Signal ausstrahlt

2.3.1 Material

<i>Color reagent</i>	R&D Systems, Wiesbaden, D
ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
PH-meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Maus CCL5/Rantes Elisa	BD Biosciences, San Diego, USA
Maus Interferon-β Elisa	PBL Biomed. Lab., Piscataway, USA
Maus Interleukin-1 β Elisa	BD Biosciences, San Diego, USA
Maus Interleukin-6 Elisa	BD Biosciences, San Diego, USA
ELISA-Washer	ELx50, BioTek, Bad Friedrichshall, D
<i>Stopsolution</i>	R&D Systems, Wiesbaden, D

Reagent diluent: 1% BSA in PBS, pH 7,2 -7,2, R&D Systems Cat# DY995

Wash buffer: 0,05% Tween 20 in PBS, pH 7,2 -7,2, R&D Systems Cat# WA126

Substrate Solution: 1:1 Mischung aus *color reagent* A und B, R&D Systems Cat# DY999)

2.3.2 CXCL10-ELISA

Es wurde das DuoSet ELISA *development systems mouse CXCL10/IP10/ CRG-2 kit* von R&D Systems verwendet.(Cat#DY466), dieses Protokoll wird hier exemplarisch aufgeführt, die anderen Elisas wurden auch genau nach Protokoll der Hersteller durchgeführt.

Zunächst wurde der *capture* Antikörper auf 2µg/ml in PBS verdünnt, und dieser anschließend zu je 100 µl in die *Wells* einer 96-*Well*-NuncPlatte gegeben.

Die Platte wurde luftdicht verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte abgesaugt und mit *wash buffer* gewaschen. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Am Ende wurde sichergestellt, dass kein Wasser mehr in den *Wells* übrig war.

Anschließend wurde die Platte mit *reagent diluent* geblockt.

Die Platte wurde wie zuvor erklärt drei mal gewaschen, um danach den Standard - (4000pg/ml) in *reagent diluent* verdünnt - und die Proben zu je 100µl auf die *Wells* zu verteilen. Mit einem Klebestreifen wurde die Platte versiegelt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde, wie oben erklärt, drei mal gewaschen.

Dann wurde der *detection*-Antikörper –zu 600ng/ml in *reagent diluent* verdünnt- zu je 100µl in die *Wells* gegeben, mit einem Klebestreifen versiegelt und wieder 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde Streptavidin 100µl in die *Wells* gegeben, welches nach der auf der Flasche stehenden Spezifikation 1:250 mit *reagent diluent* verdünnt worden war. Nachdem die Platte so 20 Minuten inkubiert worden war, wurde die Platte wieder dreimal gewaschen und anschließend gab man 100 µl *substrate solution* hinzu.

Nach 20 Minuten in der Dunkelheit bei Raumtemperatur Inkubation wurde nun *stopsolution* hinzugegeben. Innerhalb kurzer Zeit (bis zu einer halben Stunde später) wurde im ELISA-reader von Tecan, bei 450 nm die Absorbanz abgelesen.

2.4 Western Blot

Der Begriff Western Blot bezeichnet den Prozess der Übertragung von Proteinen von einem Gel auf eine Trägermembran. Edwin Southern erfand 1975 die erste Blotting-Technik, nämlich den Southern Blot, mit der DNA geblottet werden konnte und was die Namensgebung des Westernblots für das Blotten von Proteinen prägte.

Beim Western Blot werden im ersten Schritt Proteine mittels Elektrophorese auf einem Gel in Banden getrennt. Anschließend werden diese Proteine vom SDS-Gel auf eine Transfermembran geblottet. Spezifische Antikörper können diese Proteine

markieren und anschließend durch Autoradiographie und Entwickeln von Röntgenfilmen nachgewiesen werden.

2.4.1 Material

10 % Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München, D
10 % SDS	BioRad, München, D
2-Butanol	Merck, Darmstadt, D
30 % Acrylamide (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe, D
β -Mercapto-Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Bio-Rad Protein assay	BioRad, München, D
Blockierlösung Western <i>blocking reagent</i>	Roche, Mannheim, D
Bovines Serum Album (BSA)	Roche, Mannheim, D
ECL (Chemilumineszenz)	Life Science Prod., Boston, USA
ECL Rabbit-IgG HRP-linked	GE Healthcare, München, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, Darmstadt, D
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Darmstadt, D
Kodak BioMax XAR Film	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
HCL	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MiniVE Vertical Electrophoresis Chamber	Amersham, Piscataway, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, D
Proteasen-Inhibitor-Cocktail Complete	Roche, Mannheim, D
RIG-I Antikörper	ProSci Inc., Poway, CA, USA
Roller Mixer SRT 6	Stuart, Asbach, D
<i>Sonicator</i>	Branson, Danbury, CT, USA
Standard peqGOLD Protein-Marker II	Peqlab, Erlangen, D
Taumler Rocky	Multimed Wicker, Kirchheim/Teck, D
TEMED	BioRad, München, D
<i>Transblot semidry transfer cell</i>	BioRad, München, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

Tween-20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, D
Whatman-Papier	Millipore, Schwalbach/Ts., D

2 x *loading*-Puffer: 2,5 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 5,8 ml Glycerol (87 %); 1 g SDS; 2,5 ml β -Mercaptoethanol; 5 mg Bromphenolblau; 40 ml Millipore-Wasser

10 x PBS: 80,0 g NaCl; 11,6 g Na₂HPO₄; 2,0 g KH₂PO₄; 2,0 g KCl gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 7

10 x *running*-Puffer: 144 g Glycin; 30 g Tris; 30 g SDS in 1 l Wasser

Transferpuffer: 17,46 g; 8,79 g Glycin; 11,25 ml SDS 10 %; 600 ml Methanol; mit Millipore-Wasser auf 3 Liter auffüllen

TBS: 24,22 g 200 mM Tris; 80 g 1,37 M NaCl; 1 l Millipore-Wasser; pH 7,6

TBS-T: TBS + 0,05 % Tween-20

Ponceau S-Färbelösung: 5 g Ponceau S, 10 ml Eisessig, 990 ml Millipore-Wasser

2.4.2 Proteingewinnung

Das Medium wurde aus der konfluent bewachsenen 75 cm²-Flasche abgesaugt und mit PBS gewaschen. Es wurden 200 μ l Zellysepuffer (für 10 ml: 200 μ l 1 M HEPES; 2 ml 100% Glycerol, 1 M DTT 10 μ l, 10 % Triton 100 μ l, Sodium Vanadat 1 M 20 μ l, Sodium Fluorid 1 ml, PMSF als letztes, bis 10 ml gefüllt mit *low salt buffer* (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA)) dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen vom Flaschenboden mit dem Zellschaber abgeschabt. Dann wurden die Zellsuspension in ein Eppendorf Röhrchen pipettiert und auf Eis vier mal 10 Sekunden, mit je einer Minute Pause dazwischen im *Sonicator* durchgeschlagen (um die Struktur der Zellen zu zerstören und an alle Proteine zu gelangen). Im Anschluss wurden die Zellen 10 Minuten bei 4 °C, bei 11.000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein Separates Eppendorf Röhrchen pipettiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde auch bei -20°C aufbewahrt, für eine eventuelle Protein-Nachisolierung.

2.4.3 Messung der Proteinkonzentration

5 μ l Wasser wurden in 2 *Wells* einer 96-*Well*-Nunc Platte und je 5 μ l der selben Probe dazu gegeben (Duplikate). Dieser Vorgang wurde wiederholt, je nach dem wie

viele Proben es gab. Anschließend wurden je 200 µl *protein assay* (Bio Rad, Cat. No. 500-0006) in einer 1:4 Verdünnung mit Wasser dazugegeben.

Ähnlich wurde mit dem Proteinstandard in unterschiedlichen Verdünnungen, und dem *blank* (enthält 10 µl Wasser, anstelle von 5 µl Wasser und 5 µl Probe) verfahren. Im ELISA-reader waren schon zuvor die Einstellungen von 590 nm Absorbanz vorgenommen worden, da das *protein assay* lichtempfindlich ist und schnell ausgelesen werden muss.

2.4.4 Vorbereitung der Proteine für die Elektrophorese

Nach der Lesung wurden die Daten ausgewertet, die Konzentrationen ausgerechnet, und später die verschiedenen Proteinproben durch Verdünnung mit Lysepuffer (derselbe der zur Isolierung verwendet worden ist) auf dieselbe Konzentration gebracht. Im Anschluss wurden je 100 µl der Proben mit je 17 µl *loading*-Puffer (8x) 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proteinsuspension war nun bereit in das Gel pipettiert zu werden.

2.4.5 Elektrophorese

Zuerst wurde der Elektrophoresekasten zusammengebaut und auf seine Dichtigkeit überprüft. Dazu wurde die schmale Kammer, in die das Gel später gegossen werden sollte, mit Wasser gefüllt und der gesamte Kasten auf ein Stück Papier gestellt. Wäre die Kammer undicht gewesen, wäre entweder der Wasserstand gefallen oder auch das Papier unter dem Kasten wäre nass geworden. War dies nicht der Fall, wurde Gel gegossen, zuerst wurde das Separating Gel hergestellt und dann mit einer 1 ml Pipette hinüberpipettiert, bis ca 80% der Höhe der Kammer erreicht waren.

Es war darauf zu achten, dass keine Luftblasen im Gel eingeschlossen blieben. Gleich darauf wurde etwas Wasser über das noch nicht polymerisierte Gel gegeben, damit dieses mit einer geraden oberen Kante polymerisieren konnte. Man konnte nachprüfen ob das Gel schon erhärtet war, indem man das nicht verwendete, welches in dem Falcon, in dem es vorbereitet worden war, hin und wieder (mindestens aber 20 Minuten Wartezeit) auf den Kopf stellte. War dieses fest geworden, konnte man davon ausgehen, dass auch jenes in der Kammer fest war. Nun konnte man beginnen das *stacking* Gel herzustellen. War dieses bereit, musste man zügig das Wasser abschütten, mit ein bisschen Löschpapier die obere

separating-Gel-Kante trocknen und das neue Gel auf das getrocknete gießen. Nun wurde von oben der Kamm eingesetzt, um nach seiner Entfernung, wenn das zweite Gel auch getrocknet war, die Kammern zu schaffen, in die die Proteinproben hineinpipettiert werden konnten.

Als nächster Schritt wurde *running*-Puffer bis zu der Markierung in die Wanne geschüttet und auch in den hinteren Teil des Kastens, bis die Kammern, die der Kamm geschaffen hat, auch unter Puffer standen. Nun konnte man mit einer langen Pipettenspitze in diese Kammern ca. 10- 20 µl der Proben hineinpipettieren (je nach Konzentration: Hoch, dann eher wenig, niedrig, dann möglichst viel) und den Kasten an den Transformator anschließen. Dieser lief mit Gleichstrom bei ca. konstanten 10 mA, bis das *separating*-Gel erreicht wurde, von dort an konnte die Stromstärke auf ca 20-25 mA erhöht werden, bis zum Erreichen des Endes vom Gel. Dann kann der Strom abgestellt werden.

Separating-Gel Zusammensetzung für 10 ml*								
		10%	11%	12%	13%	14%	15%	16%
1	30%Acrylamid	3,4	3,67	4	4,33	4,67	5	5,33
2	Destilliertes Wasser	4,1	3,83	3,5	3,17	2,83	2,5	2,17
3	Separating-Buffer** (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
4	Amonium Persulphat (10%)	33 µl						
5	TEMED	6,7µl						

*Alle Angaben, soweit nicht anders bezeichnet, in ml

***Separating*-Puffer: Zuerst wurden Tris 1,5 mM hergestellt, davon 18,2 g in 50 ml destilliertem Wasser aufgelöst, und mit HCl der pH auf 8,8 eingestellt. Dann wurde mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt und es wurden 400mg SDS während man umrührte dazugegeben.

Stacking-Gel Zusammensetzung für 5 ml		
1	30%Acrylamid	0,65 ml
2	Destilliertes Wasser	3,05 ml
3	Stacking-Puffer* (pH 6,8)	1,25 ml
4	Amonium Persulphat (10%)	25 µl
5	TEMED	5 µl

**Stacking*-Puffer: Zuerst wurden Tris 1,5 mM hergestellt, davon 6,05 g in 50 ml destilliertem Wasser aufgelöst, und mit HCl der pH auf 6,8 eingestellt. Dann wurde mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt und es wurden 400mg SDS während man umrührte dazugegeben.

2.4.6 Blotten

Zur Aktivierung wurde die Transfermembran zunächst für ca. 30 Sekunden in Methanol gelegt und anschließend in Transfer Puffer. Die Stapel von je fünf Whatman-Papieren wurden in Transfer Puffer gelegt, bis sie sich komplett vollgesogen hatten. Der Sandwich-Aufbau: Auf dem Blotting-Gerät wurde unten zunächst der erste Stapel Whatman Papier aufgelegt, darauf die Transfermembran, darauf wiederum das Gel und oben der zweite getränkte Stapel Whatman-Papiere. Nun wurde das Gerät verschlossen und lief eine Stunde bei 25 V. Im Anschluss wurde die Membran aus dem Gerät genommen und 2 x 10 Minuten in TBS gewaschen (alle Waschschriffe wurden im Taumler gemacht). Im Anschluss wurde in TBST mit 5% Milch für 1-2 Stunden geblockt. Danach wurde 3 x 5 Minuten in TBST gewaschen. Nun wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in einem 50 ml Falcon im *Roller Mixer* geschwenkt, entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht im Kühlraum. Im Anschluss daran wurde sehr gründlich gewaschen, mindestens 3 x 30 Minuten mit TBST und danach mit dem 2. Antikörper – auf die gleiche Weise wie der erste – geschwenkt. Zum Schluss wurde wieder dreimal sehr gründlich für eine halbe Stunde mit TBST gewaschen. Die Membran war nun zum Entwickeln bereit.

2.4.7 Entwickeln

Für die Entwicklung wurden in der Dunkelkammer drei ml der Lösungen A und 75µl der Lösung B der Chemilumineszenz zusammen gegeben. Die Membran wurde eine Minute im Dunkeln in dieser Lösung inkubiert, auf Hygienepapier leicht abgetrocknet, ohne Luftblasen in Frischhaltefolie eingepackt und je nach Bedarf 1 Sekunde bis 15 Minuten auf dem Röntgenfilm gelassen. Nach der ersten Probeentwicklung konnte man die Expositions-Zeit dann nochmals nach Bedarf kürzen oder verlängern.

2.5 *Real Time* quantitative PCR (Light Cycler 480)

Beim der *Real Time* quantitativen PCR werden Nukleinsäuren vervielfältigt und er lässt gleichzeitig eine Quantifizierung während eines PCR-Zyklus zu.

Zunächst wird der cDNA-Doppelstrang durch Wärmezufuhr gespalten, sodass sich die *primer* an den komplementären Strängen anlagern können.

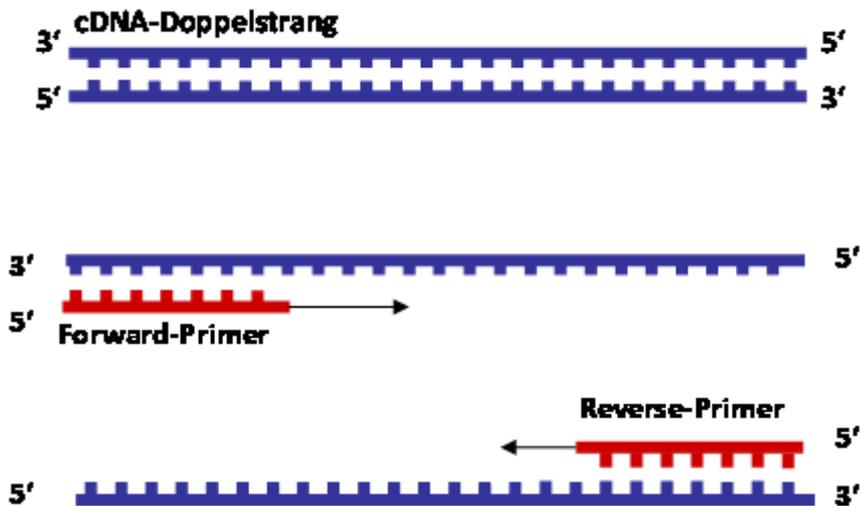


Abbildung 2.2: Denaturierung der dsDNA durch Hitze und Anlagerung der *primer*.

Die Taq-Polymerase, welche auch Exonuklease-Aktivität besitzt, wandert nun am Strang entlang. Sie lässt die einzelnen komplementären dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) an den Strang binden.

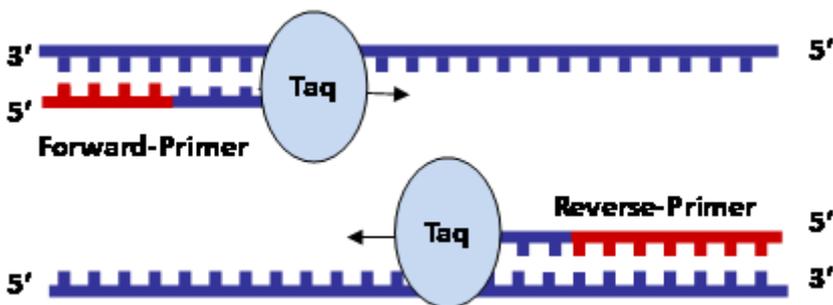


Abbildung 2.3: Die Taq-Polymerase verlängert die *primer* am 3'-Ende. Mit jedem Zyklus wird die DNA verdoppelt.

Mit jedem Zyklus wird die DNA-Menge verdoppelt. Üblicherweise werden 20 bis 40 Zyklen gemacht.

Im SYBR-Green-System wird ein fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben, der ungebunden nur schwach, aber an dsDNA gebunden, stark fluoresziert.

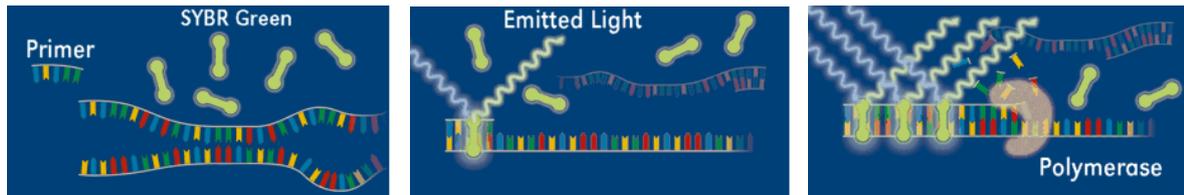


Abbildung 2.4: SYBR-Green Farbstoff fluoresziert stark, wenn er an dsDNA gebunden ist. Je mehr DNA vorhanden ist, desto stärker die Fluoreszenz [194].

Je mehr also vervielfältigt wird, desto höher ist die Fluoreszenz. Da das Ansteigen des Fluoreszenzwertes exponentiell ansteigt, ist es wichtig den *threshold*-Zyklus zu festzuhalten. Das ist der Zyklus, bei dem sich der Wert zum ersten Mal stark vom Hintergrund rauschen abhebt. Je mehr cDNA für eine bestimmte Sequenz anfänglich vorhanden ist, desto früher findet der *threshold*-Zyklus statt.

2.5.1 mRNA-Isolation und cDNA-Umschreibung

Material

0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
15 µg/ml lineares Acrylamid	Ambion, Darmstadt, D
40 IU/µl rNasin	Promega, Mannheim, D
5* <i>First strand</i> Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
DNase Verdau Set (enthält DNase, RDD-Puffer und RNase freies Wasser)	Qiagen GmbH, Hilden, D
Hexanukleotide	Roche, Mannheim, D
MOPS	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Merck, Darmstadt, D
RNA-sample-loading-Buffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
RNeasy <i>Mini Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden, D
Spektrophotometer Beckman DU [®] 530	Beckman Coulter, Krefeld, D
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D

10 x MOPS-Puffer: 20,93 g 200 mM MOPS, 3,4g 50 mM Na-Acetate, 10 ml 0,5 M EDTA, gelöst in 500 ml Wasser, pH 7

Agarose-Gel: 0,75 g Agarose-Pulver + 50 ml MOPS-Puffer

Es wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen zur Gewinnung von RNA verwendet. Es galt, darauf zu achten, dass Arbeitsplatz sowie Utensilien RNase-frei waren und möglichst immer auf Eis gekühlt gearbeitet wurde. Alle Eppendorf Röhren waren zuvor mit DEPC behandelt worden.

Zellyse

Nachdem das Medium aus den *Wells* abgesaugt worden war, gab man 350 µl RLT-Lyse-Puffer auf die Zellen, welches zuvor im Verhältnis 100: 1 mit β-Mercapto-Ethanol gemischt worden war. Nun wurden mit einem Zellschaber die Zellen gründlich abgeschabt und später durch Resuspendieren mit der Pipette gut lysiert, bevor sie in ein Eppendorf Röhren pipettiert wurden und bei -20°C eingefroren wurden.

RNA-Isolation

Es wurden 350 µl 70% Ethanol zum homogenisierten Lysat gegeben und gut durch auf- und abpipettieren vermischt, aber nicht zentrifugiert. Anschließend wurden die 700 µl der Probe auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden 350 µl des RW1 Puffers des optionalen Dnase Verdau-Kits in die RNeasy Mini Säule gegeben und 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im Anschluss wurden 10 µl Dnase-I-Stammlösung zu 70µl Puffer RDD gegeben. Durch Kippen und Schwenken des Röhrens wurde vorsichtig gemischt. Diese 80µl wurden dann direkt auf die RNeasy Silikamembran pipettiert und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden 350µl Puffer RW1 in die RNeasy Mini Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nun, wieder zum ursprünglichen Protokoll zurückgekommen, wurden 500 µl RPE Puffer in die RNeasy Säule pipettiert, nachdem sie in ein frisches *collection tube* platziert worden war und wurde nun bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Es wurden 500 µl RPE Puffer in die RNeasy Säule pipettiert und bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Nun wurde die Säule in ein neues *collection tube* gesetzt und bei maximaler Drehzahl für eine

Minute zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml- *collection tube* gesetzt, es wurden 30 µl RNase-freies Wasser daraufpipettiert und bei 10000 rpm eine Minute zentrifugiert.

Messen der optischen Dichte

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde zur Bestimmung der Konzentration die optische Dichte gemessen. Hierfür gab man 2 µl Probe zu 98 µl Wasser. Nach Reinigung der Küvette wurden 100 µl der Probe in diese gegeben und die Werte für 260 nm, 280 nm sowie das Verhältnis dieser beiden Werte abgelesen. Gut waren Werte mit einem Verhältnis von 1,7 bis 2,2, sonst wäre mit einer Kontamination zu rechnen gewesen.

Berechnung der RNA-Konzentration

2 µg RNA sind nötig, um RNA in cDNA umzuschreiben. Nach Ablesung der optischen Dichte lässt sich mit folgender Formel die Konzentration bestimmen: c (µg/ml) = Wert bei 260 nm x Verdünnungsfaktor x optische Dichte (für RNA 40 µg/ml) So kann bestimmt werden, welche Menge der RNA Lösung notwendig ist, um 2 µg RNA zu erhalten.

Umschreiben der mRNA in cDNA

Nachdem ausgerechnet worden war, welche Menge an RNA Lösung 2 µg RNA enthält, wurde diese in ein frisches Eppendorf Röhrchen pipettiert, auf 10 µl Wasser aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, sowie danach auf Eis wieder abgekühlt. Das Ganze wurde für jede Probe doppelt gemacht. (für die spätere Negativkontrolle)

Der *mastermix* enthielt je Probe 8 µl *first-strand*-Puffer, 0,8 µl 25mM dNTPS, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl 40 U/µl RNasin, 0,5 µl 15 µg/ml lineares Acrylamid und 0,43 µl Hexanukleotide, 1µl reverse Transkriptase (SuperscriptII) und 16,4 µl DEPC- H₂O verwendet. In der Negativkontrolle wurde derselbe Mix verwendet, nur dass das Superscript mit der selben Menge DEPC- H₂O ersetzt wurde. Anschließend wurden 30 µl des Mastermixes zu jeder Probe gegeben und die Proben bei 42 °C für 90 Minuten inkubiert. Danach konnte die cDNA bei -20° C gelagert werden.

2.5.2 Durchführung

Material

BSA PCR <i>grade</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
dNTPs	Invitrogen, Carlsbad, USA
LC480 Multiwellplatte 96	Roche, Mannheim, D
LightCycler LC480	Roche, Mannheim, D
MgCl ₂ 25mM	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PCR <i>optimizer</i>	Bitop, Witten, D
SYBRgreen I	Fluka, Sigma-Aldrich, München, D
Taq <i>buffer without detergent</i>	Fermentas, St. Leon-Rot, D

Zunächst wurden die cDNA-Proben im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt.

Anschließend wurden 5 ml (2x) SYBRgreen Buffer(Mastermix) nach folgender Zusammensetzung hergestellt:

10x <i>Taq Buffer</i> ohne Detergent	1000µl
dNTPs (25mM)	75 µl
PCR <i>Optimizer</i>	2000µl
BSA PCR <i>grade</i>	100µl
SYBRgreen I (Stock 1:100 20%DMSO)	20µl
MgCl ₂ 25mM	1200µl
H ₂ O	605µl

(Dieser *mix* konnte auch eingefroren und bei Bedarf wiederverwendet werden.)

Anschließend wurde für jedes *Well* eines zu untersuchenden Gens 20µl folgendes *mixes* hergestellt:

10µl	<i>Mastermix</i>
0,6 µl	<i>Foreward Primer</i> 10pmol
0,6 µl	<i>Reverse Primer</i> 10pmol
0,16 µl	Taq Polymerase
6,64 µl	H ₂ O

Gab es z.B. für das Gen 18S (sogenanntes *housekeeper* oder Referenzgen) sechs Proben, jeweils in Duplikaten, und rechnete man noch vier NTCs hinzu, sowie 6 RT-

Proben, musste man die obige Zusammenstellung in mindestens 22facher Ausführung in einem Eppendorf Röhrchen mischen.

Diese Mischung wurde dann auf eine RT-PCR 96-Well-Platte mit 18µl/Well pipettiert. War dies für alle zu untersuchenden Gene geschehen (RT- muss nur für 18S gemacht werden), konnte man nun die verdünnten cDNA Proben, mit je 2 µl dazugeben. Eine Ausnahme bildeten die NTC-Proben, denen 2µl Wasser hinzugegeben wurde. Generell musste auf ein sehr genaues Pipettieren geachtet werden.

Nun wurde die Platte abgeklebt und kurz zentrifugiert, sodass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden der Platte sammeln konnte.

Im Anschluß hieran konnte man die Platte entweder einige Stunden bei ca. 4°C gekühlt lagern, oder gleich in den LightCycler stellen. Dieser war so eingestellt, dass er zuerst 2 Minuten bei 50 °C inkubierte, gefolgt von 10 Minuten bei 95°C. Im Anschluss kamen 40 Zyklen von je 15 Sekunden bei 95 °C und je einer Minute bei 60°C. So wurden die Gene vervielfältigt. Je mehr cDNA am Anfang in der Probe war, in einem umso früheren Zyklus fing die Probe an zu fluoreszieren. (Wie oben beschrieben, ist v.a. der *threshold*-Zklus wichtig, in welchem die Fluoreszenz zum ersten Mal stark ansteigt.) Diese Fluoreszenz konnte von dem LightCycler gemessen werden, und wurde auch in Korrelation mit dem Zyklus gespeichert. Jede Probe hat einen *housekeeper*-Wert und dieser wurde von dem Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen. Das Ergebnis wurde mal zwei genommen, was den zu verwendenden Wert ergab.

2.6 Tierexperimente

2.6.1 Versuchstiere und Material

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D
DOTAP	Roche, Mannheim, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
<i>poly</i> (dA:dT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
STZ	Zanosar- Pfizer, CH

2.6.2 Tierhaltung

In dieser Studie wurden C57BL/6 Mäuse verwendet. Es wurden je fünf Mäuse in Macrolon Typ II L Käfigen mit Filterdeckel gehalten. Zugang zu Wasser und Futter war jederzeit gegeben. Die Tiere hatten einen 12-stündigen Tag-Nacht Rhythmus. Im Autoklaven wurden Käfige, Futter, Wasser, Stroh und Watte sterilisiert. Alle experimentellen Verfahren waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und wurden streng nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.6.3 Studiendesign

Zunächst wurden kleine Mengen von 3,3 mg -3,9 mg STZ-Pulver aliquottiert und in Aluminiumfolie umwickelt bei -20°C gelagert. Das aliquottierte STZ-Pulver wurde mit 1 ml Natrium Citrat Puffer 10mmol/L pH 4,5 für fünf Sekunden im Dunkeln aufgelöst und dann den 20 verwendeten Mäusen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 200 µl intraperitoneal gespritzt, nachdem sie davor 6 Stunden gefastet hatten .

Die Mäuse waren allesamt männlich, waren sechs bis sieben Wochen alt und wogen zwischen 21 und 26 Gramm.

Nach dieser Phase wurden die Mäuse für den Versuch in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Kontrollgruppe und eine Versuchsgruppe zu je 10 Mäusen.

Der Kontrollgruppe wurde an sieben aufeinanderfolgenden Tagen 200µl von einem Gemisch aus 300µl DOTAP und 1800µl PBS, welches unmittelbar zuvor 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert hatte, intraperitoneal gespritzt.

An denselben sieben Tagen, zu derselben Uhrzeit wurde auch den Mäusen der Versuchsgruppe jeweils 200µl eines Gemisches aus 550 µl poly(dA:dT), 550µl DOTAP und 1000µl PBS, welches auch unmittelbar zuvor 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert hatte, intraperitoneal gespritzt. Beide Gruppen hatten davor sechs Stunden gefastet (kein Futter, nur Wasser).

Später wurden dann in regelmäßigen Abständen Gewicht und Blutzuckerwerte der Mäuse bestimmt, nachdem sie vor der jeweiligen Messung wieder für sechs Stunden gefastet hatten (kein Futter, nur Wasser).

2.7 Statistische Analyse

Die dargestellten *in vitro* Zellversuche zeigen in der Regel das Mittel aus zwei und mehr unabhängigen Versuchen.

Die experimentellen Gruppen der Tierversuche bestanden aus 10 Mäusen.

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) dargestellt.

Die Gruppen wurden mittels *Student's t-test* verglichen. p-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von Nukleinsäurerezeptoren des angeborenen Immunsystems in Langerhansschen Inseln, Pankreasgewebe und β -Zellen

3.1.1 mRNA-Expressionsanalyse per *Real Time* quantitative PCR

Zunächst wurde ein Vorkommen von Nukleinsäurerezeptoren wie RIG-I, MDA-5, ZBP1, TLR3, TLR7 und TLR9 in Langerhansschen Inselzellen überprüft. Dazu wurden Inseln, wie in 2.7. ausführlich beschrieben, aus dem Pankreas von 6 Wochen alten C57/Bl6 Mäusen isoliert. Nachdem von diesen Inseln RNA isoliert und

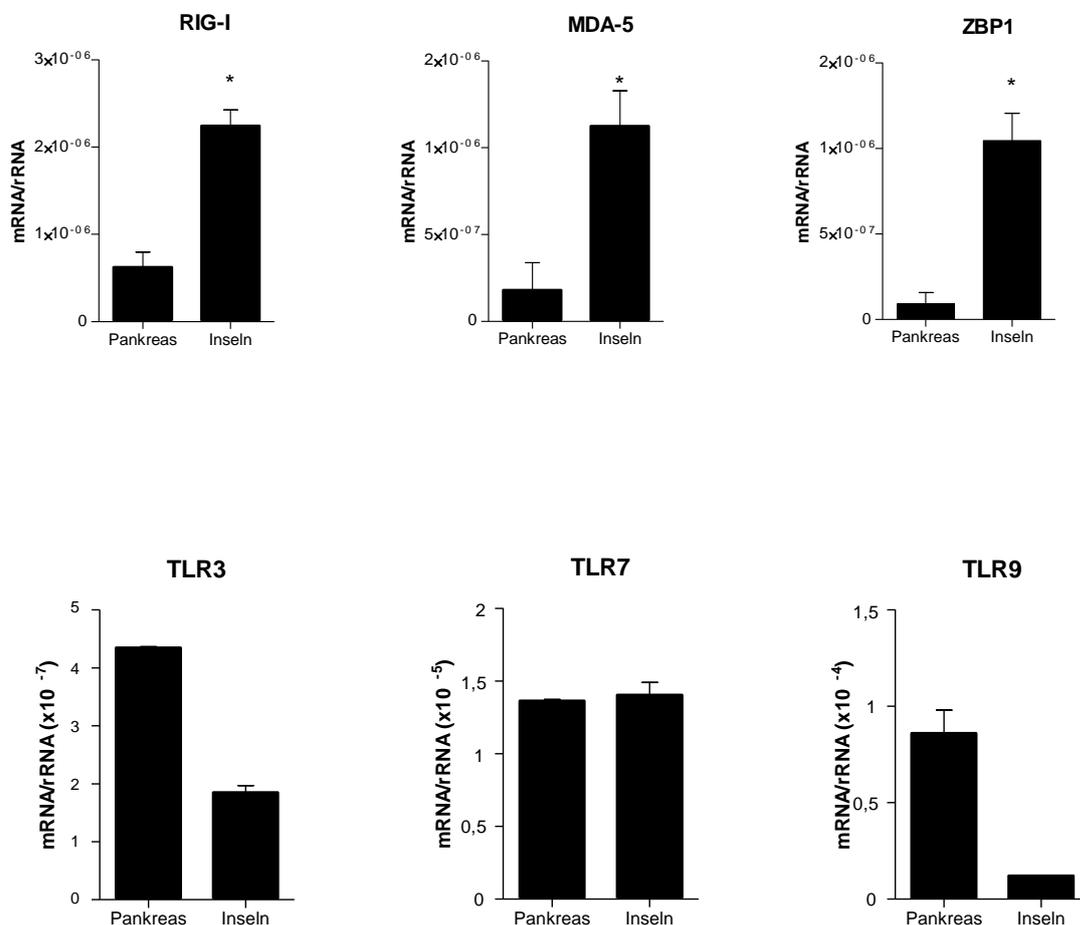


Abbildung 3.1.: Von Mäusen isolierte Langerhanssche Inselzellen weisen im Gegensatz zu anderen Pankreaszellen erhöhte mRNA-Expressionslevel für die Gene RIG-I, MDA5 und ZBP1 auf. Die mRNA-Expressionslevel der Gene TLR3 und TLR9 waren in Inseln verglichen mit dem restlichen Pankreasgewebe niedriger, die von TLR7 in etwa gleich.

in cDNA umgeschrieben worden war, wurde im *Real Time* quantitativen PCR die mRNA-Expression der oben aufgezählten Nukleinsäurerezeptoren im Vergleich zum übrigen Pankreasgewebe bestimmt. Dabei diente die 18s-rRNA als Referenzgen.

Die mRNA der Gene RIG-I, MDA-5 und ZBP1 zeigte in Inselzellen gegenüber dem Gesamtpankreas eine vermehrte Expression. Auch eine mRNA-Expression der untersuchten TLR-Gene konnte in Inselzellen nachgewiesen werden. Die Expression der Gene TLR3 und TLR9 war in Inseln niedriger als im restlichen Pankreasgewebe, die von TLR7 in etwa gleich hoch (siehe Abbildung 3.1.).

Um zu überprüfen, ob diese Gene durch Entzündungsmediatoren zu einer vermehrten mRNA-Expression induziert werden können, wurden β -Zellen der Min-6-Insulinomazelllinie in einem weiteren Versuch zum einen mit Interferon- β sowie zum anderen mit Interferon- γ und TNF- α stimuliert.

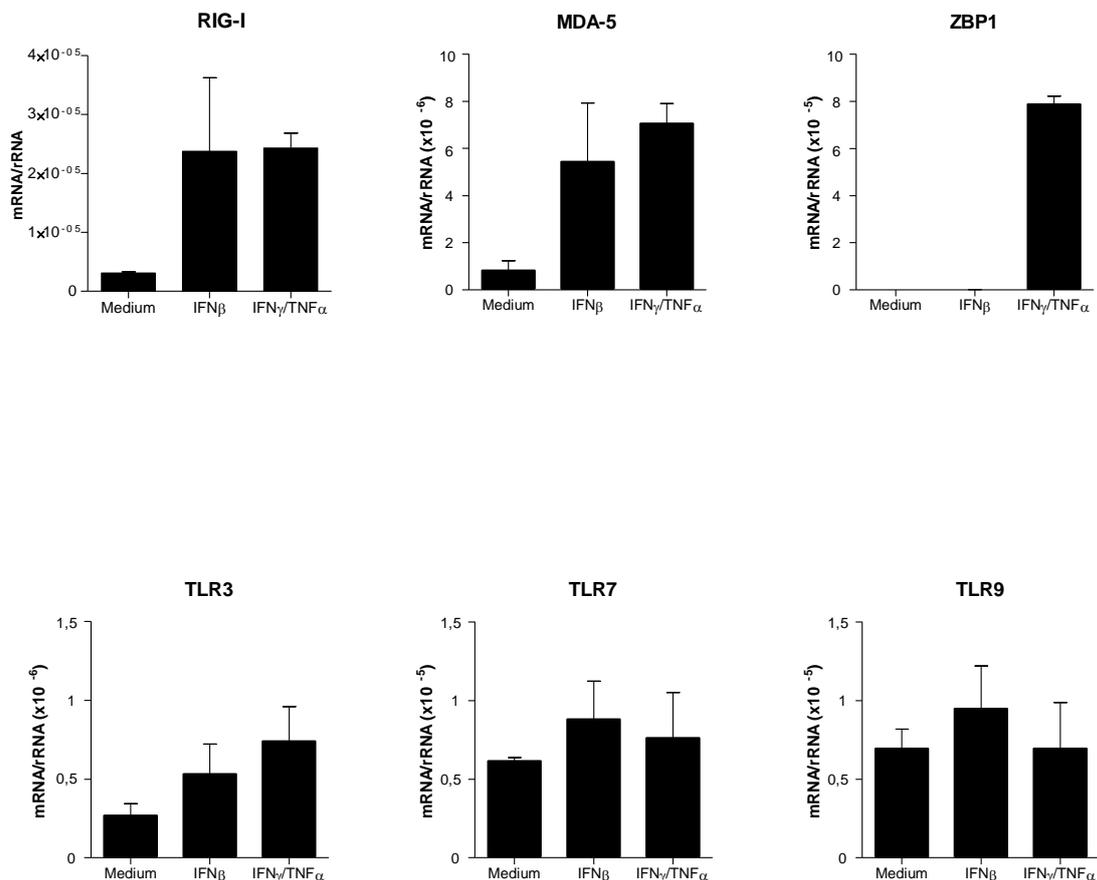


Abbildung 3.2.: RIG-I und MDA-5 mRNA-Expressions Level steigen nach Interferon- β und Interferon- γ /TNF- α -Stimulation, das von ZBP1 nur nach Interferon- γ /TNF- α -Stimulation. Auch die Level von TLR3, TLR7 und TLR9 steigen, allerdings weniger als die von RIG-I, MDA5 und ZBP1. Aus Mäusen isolierte Inselzellen wurden auf drei verschiedene Arten stimuliert: Mediumkontrolle, 24 h 1000 IU Interferon- β und 24 h 200 IU/ml Interferon- γ mit 500 IU/ml TNF- α .

Nach RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA zeigte sich im anschließend durchgeführten *Real Time* quantitativen PCR vor allem eine vermehrte Expression der Gene RIG-I und MDA-5. Die Expression des ZBP1-Gens konnte durch Interferon- γ /TNF α hochreguliert werden, jedoch nicht durch Interferon- β .

Auch die mRNA-Expression des TLR3-Gens ließ sich durch diese Stimulantien steigern, während sich die der TLR7- und TLR9-Gene kaum beeinflussen ließen. (siehe Abbildung 3.2.)

3.1.2 Protein-Expressionsanalyse mittels Western Blot

Die mRNA-Expressionsanalyse für die Gene RIG-I, MDA-5 und ZBP1 nach Stimulierung mit Interferon- β konnte auch im Western Blot, auf Protein-Ebene bestätigt werden. Hierfür wurden Min-6-Insulinomazellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Interferon- β stimuliert.

Anschließend gewann man Proteine aus diesen Zellen und untersuchte sie auf RIG-I, MDA-5 und ZBP1 im Western Blot-Verfahren, wie ausführlich unter Punkt 2.3. erklärt (siehe Abbildung 3.3.).

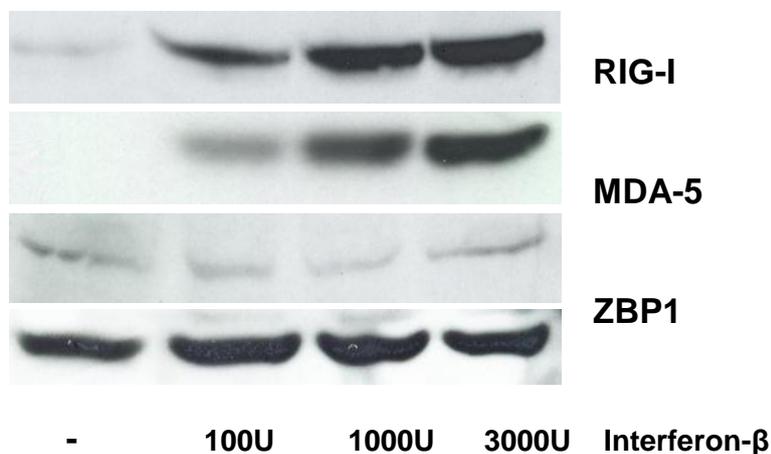


Abb. 3.3.: Min-6-Insulinomazellen weisen im Western Blot nach Interferon- β -Stimulation eine erhöhte RIG-I und MDA-5 Proteinexpression auf. Hierfür wurden Min-6-Insulinomazellen in 4 Gruppen aufgeteilt und mit unterschiedlichen Konzentrationen Interferon- β stimuliert: Mediumkontrolle, 24h 300 IU Interferon- β , 24h 1000 IU Interferon- β und 24h 3000 IU Interferon- β . Anschließend wurden Proteine aus diesen Zellen gewonnen und auf RIG-I, MDA5 und ZBP-1 im WesternBlot-Verfahren untersucht.

3.2 Einfluss von *poly(I:C)* und *poly(dA:dT)* auf Zytokin- und Chemokinproduktion von β -Zellen

Nachdem die Existenz der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren RIG-I und MDA-5 nachgewiesen worden war und gezeigt werden konnte, dass die Expression dieser durch Stimulation mit Interferon- β angehoben wird, untersuchte man als nächstes, ob eine Bindung von *poly(dA:dT)*, 3'-ppp-RNA oder *poly(I:C)* als Liganden für diese zytosolische Nukleinsäurerezeptoren auch zu einer Produktion von Zytokinen und Chemokinen führt. Diese stehen nach Aktivierung dieser Nukleinsäurerezeptoren am Ende ihrer Signalkaskaden.

3.2.1 ELISA-Proteinanalyse von Chemokinen und Zytokinen

Zunächst wurden Min-6-Insulinomazellen, wie in Punkt 2. genau erläutert mit unterschiedlichen Konzentrationen von zytosolischem *poly(dA:dT)*, 3'-ppp-RNA, sowie *poly(I:C)* stimuliert.

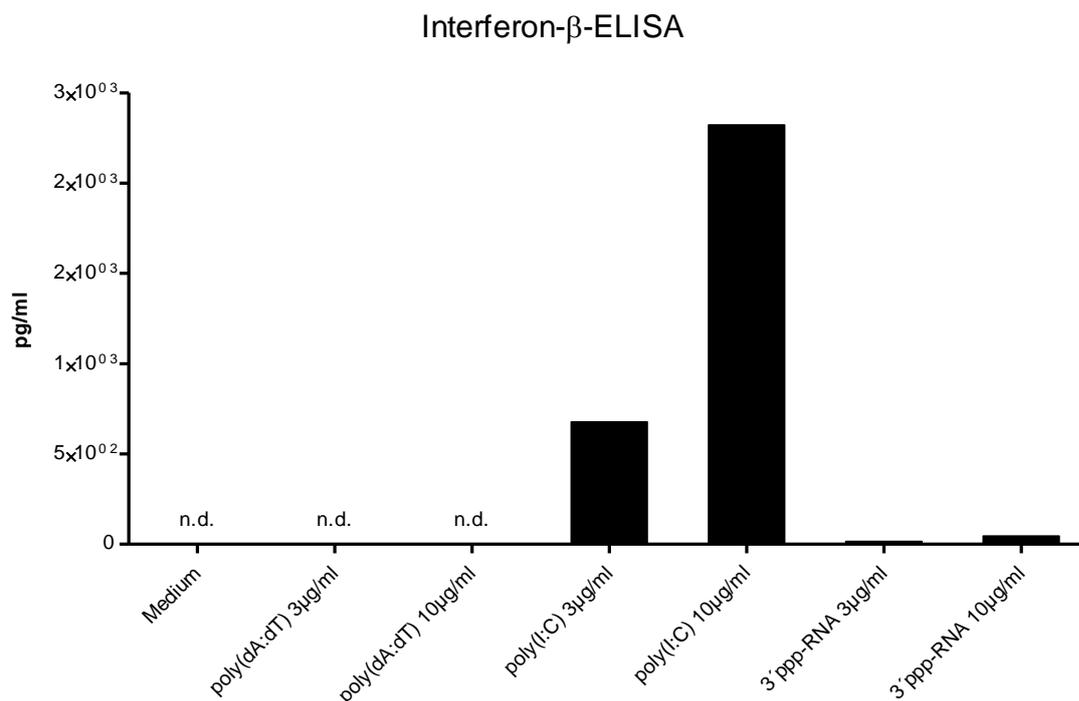


Abbildung 3.4.: Zytolisches *Poly(I:C)* induziert die Produktion von Interferon- β , zytolisches *poly(dA:dT)* zeigt keine detektierbare und zytosolische 3'-ppp-RNA nur eine ganz schwache Induktion. Hierfür wurden Min6-Insulinomazellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 3 μ l/ml Medium, *poly(dA:dT)* 10 μ l/ml Medium, 3'-ppp-RNA und 3 μ l/ml Medium, 3'-ppp-RNA und 10 μ l/ml Medium, *poly(I:C)* 3 μ l/ml Medium, *poly(I:C)* 10 μ l/ml Medium. Mit den nach 24 Stunden abgenommenen Medien wurde ein Interferon- β -ELISA durchgeführt.

Mit den nach 24 Stunden abgenommenen Medien führte man anschließend einen Interferon- β -ELISA durch.

Zytosolisches *poly(I:C)* konnte die Produktion von Interferon- β induzieren, zytosolisches *poly(dA:dT)* und 3'-ppp-RNA hingegen nicht.

Um auch Chemokine zu untersuchen, wurden Min-6-Zellen (jeweils in Duplikaten) mit unterschiedlichen Konzentrationen von zytosolischem *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* stimuliert (siehe Abbildung 3.4.).

Die nach 48 Stunden abgenommenen Medien wurden mittels ELISA auf CXCL10, Interleukin6, und CCL5 hin untersucht (siehe Abbildungen. 3.5 - 3.6).

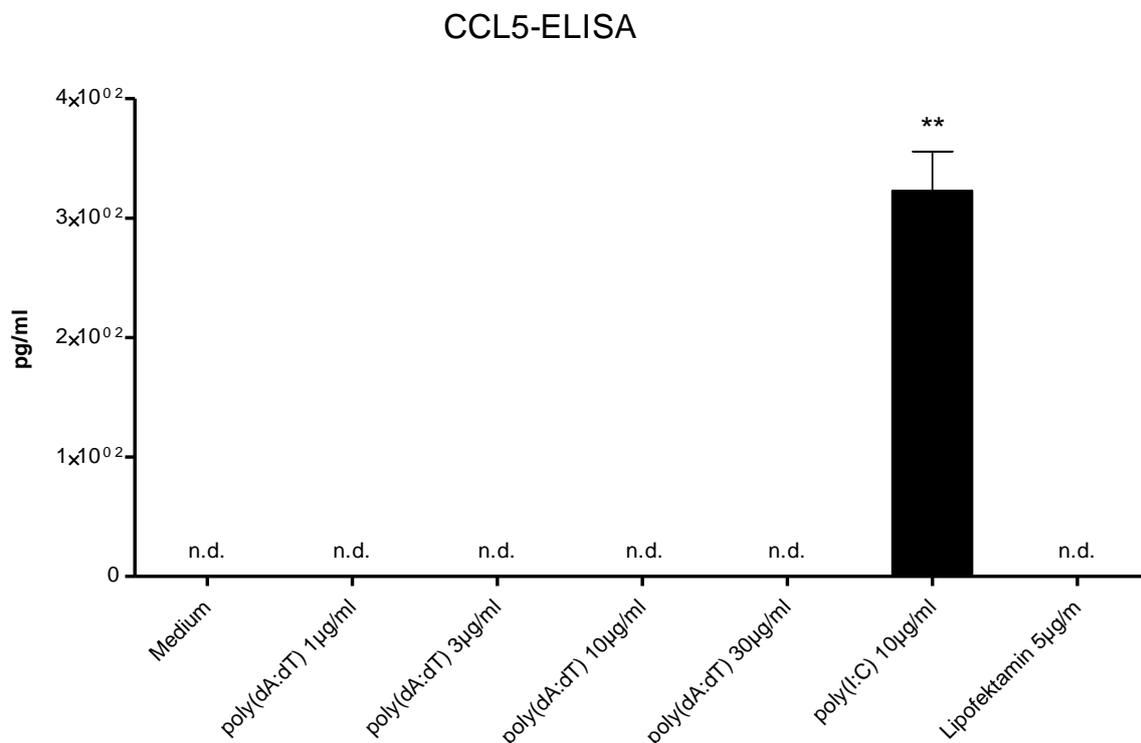


Abbildung 3.5.: Zytosolisches *poly(I:C)* induziert CCL5-Produktion, zytosolisches *poly(dA:dT)* hingegen nicht. Hierfür wurden Min-6 Zellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 1 µl/ml Medium, *poly(dA:dT)* 3 µl/ml Medium, *poly(dA:dT)* 10 µl/ml Medium, *poly(dA:dT)* 30 µl/ml Medium, *poly(I:C)* 10 µl/ml Medium, Lipofektaminkontrolle 5 µl/ml Medium.

Die nach 48 Stunden abgenommenen Medien wurden mittels ELISA auf CCL5 hin untersucht.

** $p < 0,01$ gegen Medium

CXCL10-ELISA

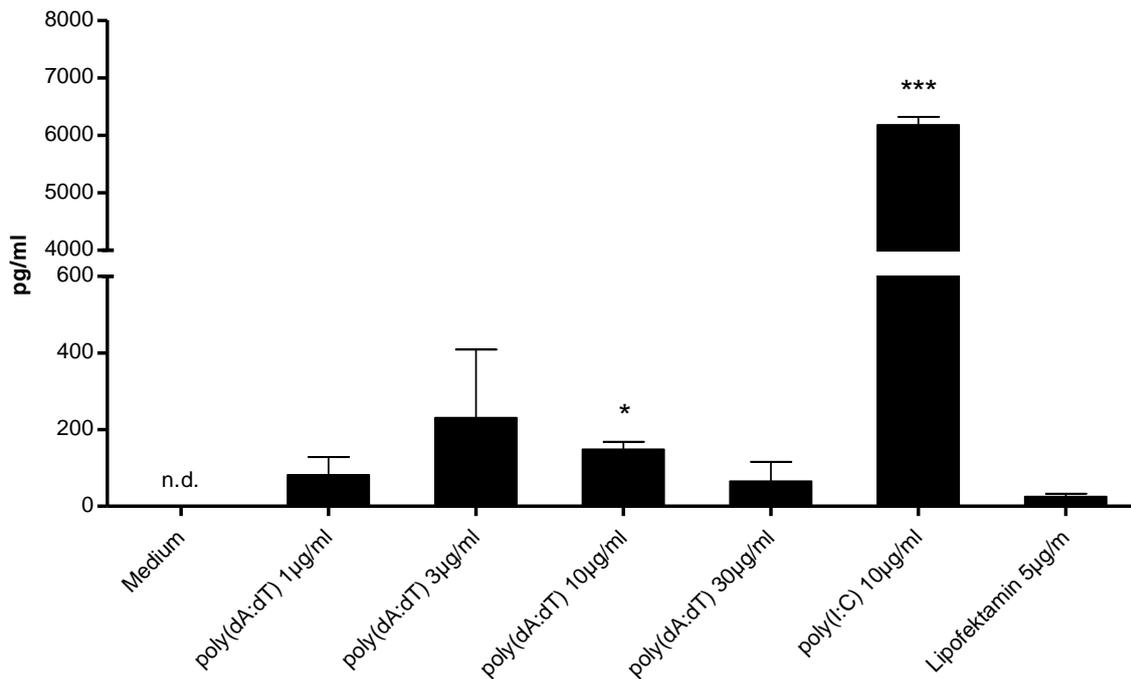


Abbildung 3.6.: Zytosolisches *poly(I:C)* und *poly(dA:dT)* induzieren signifikant die CXCL10-Produktion. Hierfür wurden Min-6 Zellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 1 µl/ml Medium, *poly(dA:dT)* 3 µl/ml Medium, *poly(dA:dT)* 10 µl/ml Medium, *poly(dA:dT)* 30 µl/ml Medium, *poly(I:C)* 10 µl/ml Medium, Lipofektaminkontrolle 5 µl/ml Medium.

Die nach 48 Stunden abgenommenen Medien wurden mittels ELISA auf CXCL10 hin untersucht.

* $p < 0,05$ gegen Medium, *** $p < 0,001$ gegen Medium

In den hier durchgeführten Interferon- β - und CCL5-ELISAs für zeigte zytosolisches *poly(dA:dT)* weder in niedrigen, noch mittleren oder hohen Konzentrationen einen Einfluss auf die Produktion dieser Proteine, während die Stimulation mit zytosolischem *poly(I:C)* auch schon bei mittlerer Dosis große Auswirkungen darauf hatte. Aus dem Ergebnis der ELISA-Tests zum Nachweis von Interleukin6 und Interleukin-1 β resultierte, dass weder zytosolisches *poly(I:C)* noch zytosolisches *poly(dA:dT)* eine Auswirkung auf die Ausschüttung dieser Chemokine zeigten (Daten werden hier nicht gezeigt).

Allerdings wies der durchgeführte CXCL10-ELISA eine signifikante Mehrproduktion nach Stimulation durch zytosolisches *poly(dA:dT)* auf.

3.2.2 mRNA-Expressionsanalyse von Chemokinen und Zytokinen per *Real Time* quantitative PCR

Die Ergebnisse des CXCL-10 ELISA wurden nach Stimulierung von Min6-Insulinomazellen mit zytosolischem *poly*(dA:dT) und *poly*(I:C) auch durch erhöhte CXCL10 mRNA-Werte bestätigt. Auch das Level der mRNA-Expression des IFIT 1 (*Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*) Gens steigt nach Stimulierung von Min6-Insulinomazellen mit zytosolischem *poly*(dA:dT) und *poly*(I:C) (siehe Abbildungen 3.7. und 3.8.).

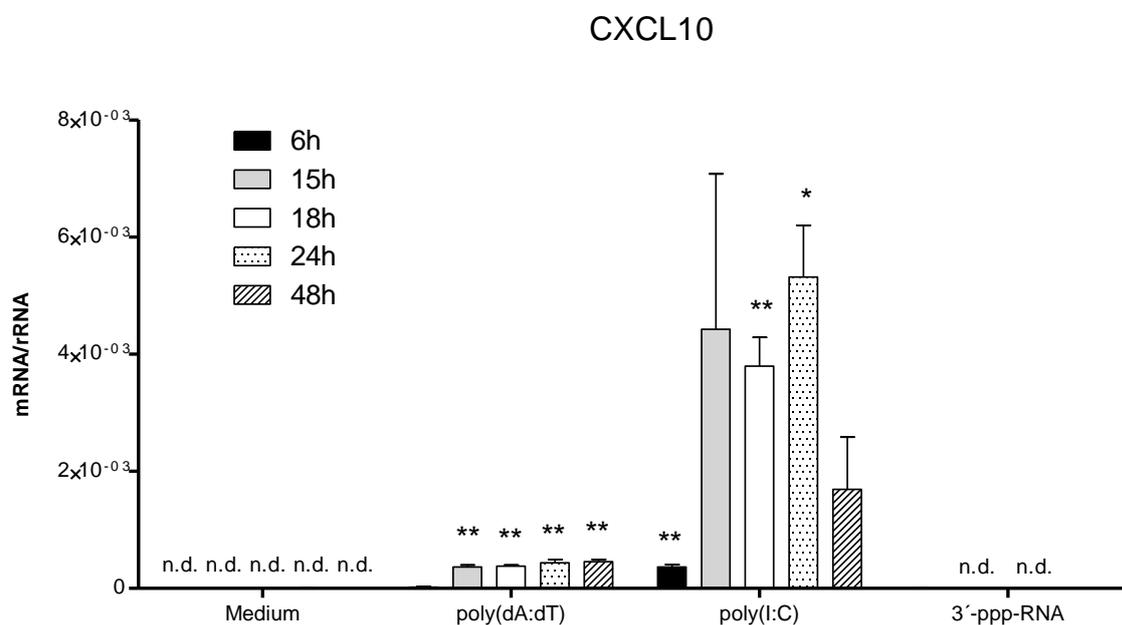


Abbildung 3.7.: Zytosolisches *poly*(I:C) und *poly*(dA:dT) induzieren signifikant CXCL10-Produktion. Hierfür wurden Min-6 Zellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle für 6, 15, 18, 24 und 48 Stunden, *poly*(dA:dT) 10 µl/ml Medium für 6, 15, 18, 24 und 48 Stunden, *poly*(I:C) 10 µl/ml Medium für 6, 15, 18, 24 und 48 Stunden und mit 3'ppp-RNA für 6 und 18 Stunden. Anschließend wurde hieraus RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und im *Real Time* quantitativen PCR Verfahren ausgewertet.

* $p < 0,05$ gegen Medium, ** $p < 0,01$ gegen Medium

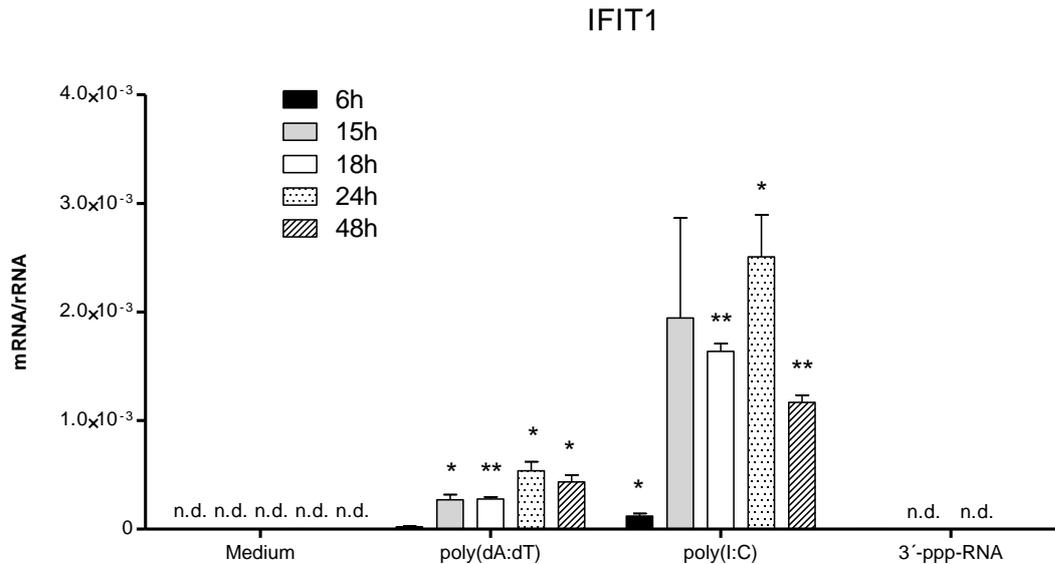


Abbildung 3.8.: *Poly(I:C)* und *poly(dA:dT)* induzieren signifikant IFIT1. Hierfür wurden Min-6 Zellen in insgesamt 17 Gruppen aufgeteilt und folgendermaßen stimuliert: ohne Stimulus für 6, 15, 18, 24 und 48 Stunden, mit *poly(dA:dT)* 10 µl/ml Medium für 6, 15, 18, 24 und 48 Stunden, mit *poly(I:C)* 10 µl/ml Medium für 6, 15, 18, 24 und 48 Stunden und mit 3'ppp-RNA für 6 und 18 Stunden. Anschließend wurde hieraus RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und im RealTime quantitativen PCR-Verfahren ausgewertet.

* $p < 0,05$ gegen Medium, ** $p < 0,01$ gegen Medium

3.3 Einfluß von zytosolischem *poly(I:C)* und *poly(dA:dT)* auf die Apoptose von β -Zellen

3.3.1 Viabilität von Min-6-Insulinomazellen

Um die Apoptose von β -Zellen nach Stimulation mit zytosolischem *poly(dA:dT)* zu untersuchen, wurde zunächst ein Proliferationsfähigkeitstest, wie in Punkt 2.1. beschrieben, durchgeführt.

Zellen wurden auf einer 96-Well-Platte aufgeteilt und, wie zu Abbildung 3.9 beschrieben, unter anderem mit verschiedenen Konzentrationen von zytosolischem *poly(dA:dT)* stimuliert.

Nach Zugabe des Proliferationsfähigkeitstest-Substrats und anschließendem dreistündigem Warten konnte die optische Dichte bei 492nm gemessen werden. Je dunkler die Farbe, desto höher die Lebensfähigkeit der Zellen.

Da die Lipofektaminkontrolle dieselbe Farbintensität wie die Mediumkontrolle zeigte, war davon auszugehen, dass das Lipofektamin keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen hatte. Das zusätzliche FCS ließ die Zellen prosperieren,

während das Camptoesin, ein bekanntes Apoptose-induzierendes Mittel, die Lebensfähigkeit der Zellen schon bei niedriger Dosis erniedrigte, ebenso wie das zytosolische *poly(dA:dT)* (Siehe Abb. 3.9.).

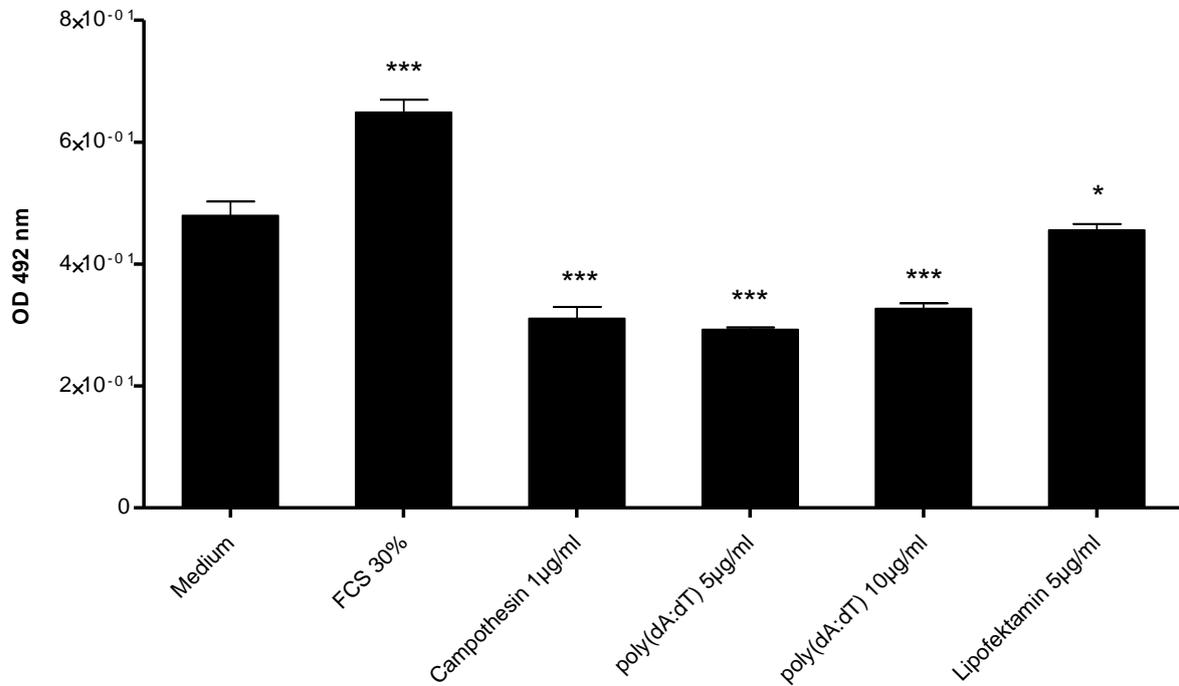


Abbildung 3.9.: Viabilitätstest an Min-6-Zellen: Zytosolisches *poly(dA:dT)* senkt die Lebens- und Proliferationsfähigkeit von Min-6 Insulinomazellen. Hierfür wurden Zellen (jeweils 6 Wells von derselben Probe) folgendermaßen für 24 Stunden stimuliert: Mediumkontrolle, FCS 300 µl/ml Medium, Camptoesin 1 µg/ml Medium, *poly(dA:dT)* 5 µg/ml Medium, *poly(dA:dT)* 10 µg/ml Medium, Lipofektaminkontrolle 5 µg/ml Medium. Nach Zugabe des Proliferationstests-Substrats und anschließendem dreistündigem Warten konnte die optische Dichte bei 492nm gemessen werden. Je dunkler die Farbe, desto höher die Lebensfähigkeit der Zellen. Da die Lipofektaminkontrolle dieselbe Farbintensität zeigte wie die Mediumkontrolle, war davon auszugehen, dass das Lipofektamin keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen hatte. Das zusätzliche FCS ließ die Zellen prosperieren, während das Camptoesin, die Lebensfähigkeit der Zellen schon bei niedriger Dosis erniedrigte, ebenso wie das *poly(dA:dT)*. * p<0,05 gegen Medium, *** p<0,001 gegen Medium

Um auch die Lebensfähigkeit nach Stimulation mit zytosolischem *poly(I:C)* und 3'ppp-RNA zu testen, wurde der Versuch erweitert wiederholt und zusätzlich auf die Wirkung des Pancaspase-Inhibitors Z-VAD hin untersucht. FCS und 3'ppp-RNA ließen die Zellen prosperieren, während Camptoesin und *poly(dA:dT)* die Lebensfähigkeit erniedrigten, bei in etwa gleichbleibender Lebens- und Proliferationsfähigkeit durch *poly(I:C)*. Außerdem war ersichtlich, dass Z-VAD zwar einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Camptoesin hatte, jedoch nicht von *poly(I:C)*, *poly(dA:dT)* und 3'ppp-RNA.

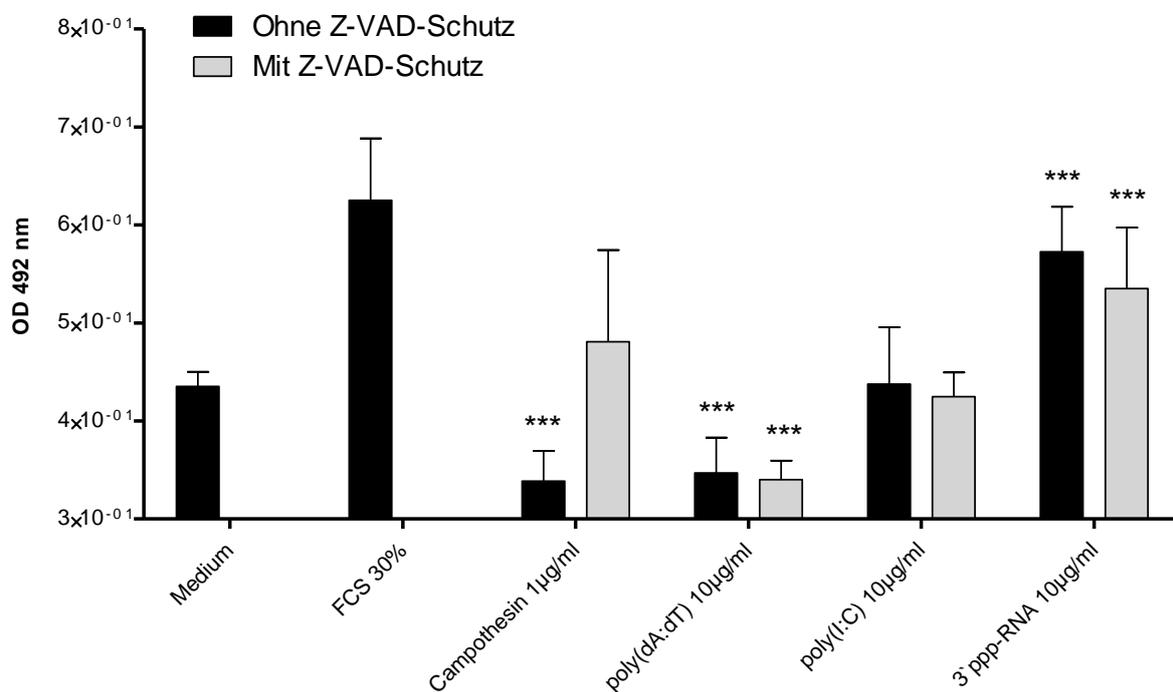


Abb. 3.10.: Viabilitätstest an Min-6-Zellen: FCS und zytosolische 3'ppp-RNA lassen die Min-6-Zellen prosperieren, während zytosolisches Camptoesin und *poly(dA:dT)* die Lebensfähigkeit erniedrigen, bei in etwa gleichbleibender Lebens- und Proliferationsfähigkeit durch zytosolisches *poly(I:C)*. Z-VAD hat zwar einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Camptoesin, aber nicht auf die Proliferationsfähigkeit von *poly(I:C)*, *poly(dA:dT)* und 3'ppp-RNA. Hierfür wurden Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät, nach 24 Stunden wurde für 18 Stunden das Medium zum Hungern lassen der Zellen mit 1%FCS gewechselt, dann nach erneutem Mediumwechsel mit 10 %FCS die eine Hälfte der Zellen für 3,5 Stunden mit Z-VAD stimuliert, während bei der anderen Hälfte nur ein Mediumwechsel mit 10 %FCS gemacht wurde und anschließend wurden jeweils eine Gruppe der mit Z-VAD-vorstimulierten Zellen und eine Gruppe der nicht mit Z-VAD-vorstimulierten Zellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, 30%FCS im Medium, Camptoesin 1µg/ml, *poly(dA:dT)* 10µg/ml, *poly(I:C)* 10µg/ml und 3'ppp-RNA 10µg/ml. *** p<0,001 gegen Medium

3.3.2 Analyse apoptoserelevanter Proteine im Western Blot Verfahren

Nachdem gezeigt wurde, dass zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* die Lebensfähigkeit und Proliferationsfähigkeit von Min-6-Zellen senken kann, wurden solche Zellen für 24h Stunden mit zytosolischem *poly(dA:dT)*, *poly(I:C)*, sowie Stauroporin stimuliert. Aus den gewonnenen Proteinen wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 durchgeführt. Stauroporin ist ein potentes Apoptose-induzierendes Mittel, welches auch sicher Caspase3 aktiviert und hier als Positivkontrolle verwendet wurde.

Wie man auf der Abbildung 3.11. sehen kann, konnte sowohl zytosolisches *poly(dA:dT)* als auch *poly(I:C)* Caspase3 induzieren.

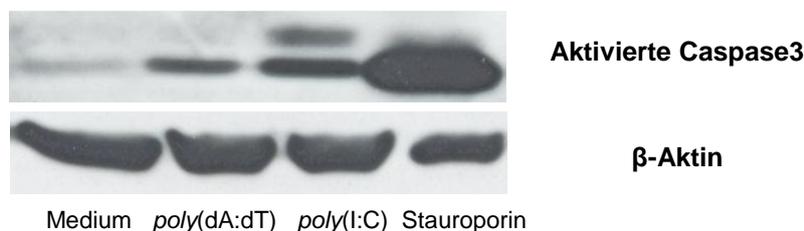


Abbildung 3.11.: Zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* induzieren Caspase3. Hierfür wurden Proteine aus Min-6-Zellen gewonnen, die zuvor für 24h Stunden folgendermaßen stimuliert worden waren: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10 µg/ml Medium, *poly(I:C)* 10 µg/ml Medium und Stauroporin 1 µg/ml Medium. Mit den gewonnenen Proteinen wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase3 durchgeführt. Stauroporin induziert potent Apoptose, aktiviert sicher Caspase3 und wurde hier als Positivkontrolle verwendet.

3.3.3 mRNA-Expressionsanalyse apoptoserelevanter Gene per *Real Time* quantitative PCR

Min-6-Zellen wurden als nächstes für unterschiedliche Zeitdauern mit zytosolischem *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* stimuliert. Im Anschluss wurde daraus mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um im *Real Time* quantitativen PCR-Verfahren (siehe auch Punkt 2.4.) die apoptoserelevanten Gene PUMA, NOXA, APAF1 und einige andere apoptoserelevante Gene zu untersuchen (siehe Abbildungen 3.12. - 3.23.).

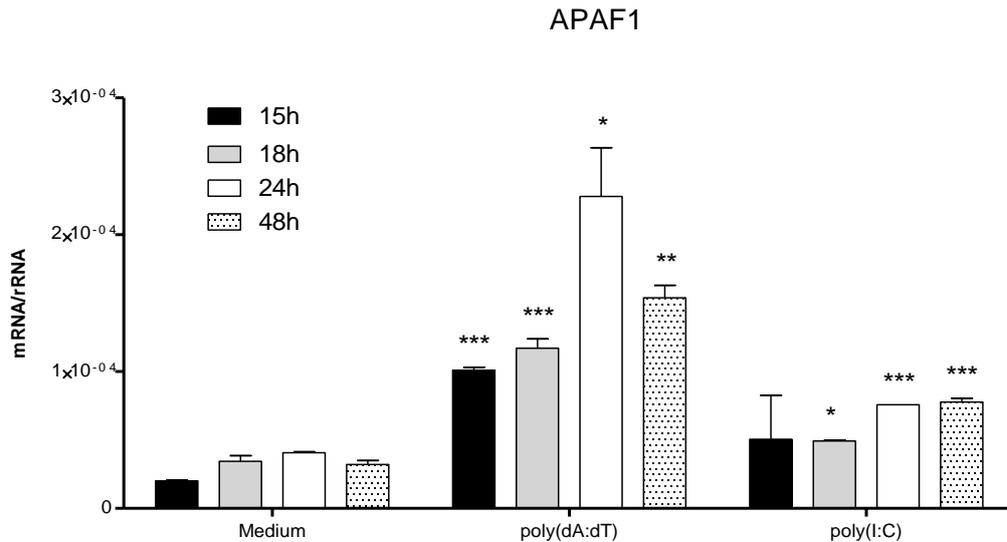


Abbildung 3.12.: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens APAF1 wird v.a. durch zytosolisches *poly(dA:dT)*, weniger durch zytosolisches *poly(I:C)* angehoben. Dazu wurden Min-6-Insulinomazellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium, jeweils für 15, 18, 24 und 48 Stunden. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und im *Real Time* quantitativen PCR-Verfahren auf das Gen APAF1 untersucht.

* $p < 0,05$ gegen Medium, ** $p < 0,01$ gegen Medium, *** $p < 0,001$ gegen Medium

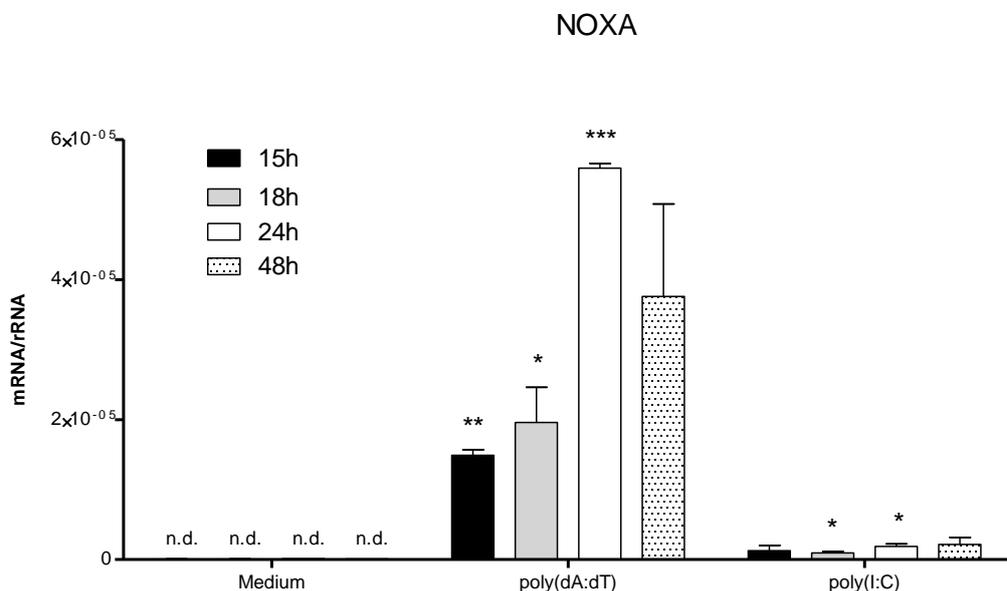


Abbildung 3.13.: Die mRNA-Expression des apoptoserelevanten Gens NOXA wird signifikant v.a. durch zytosolisches *poly(dA:dT)*, jedoch kaum durch zytosolisches *poly(I:C)* angehoben. Dazu wurden Min-6-Insulinomazellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium jeweils für 15, 18, 24 und 48 Stunden. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und im *Real Time* quantitativen PCR-Verfahren auf das Gen NOXA untersucht. * $p < 0,05$ gegen Medium, ** $p < 0,01$ gegen Medium, *** $p < 0,001$ gegen Medium

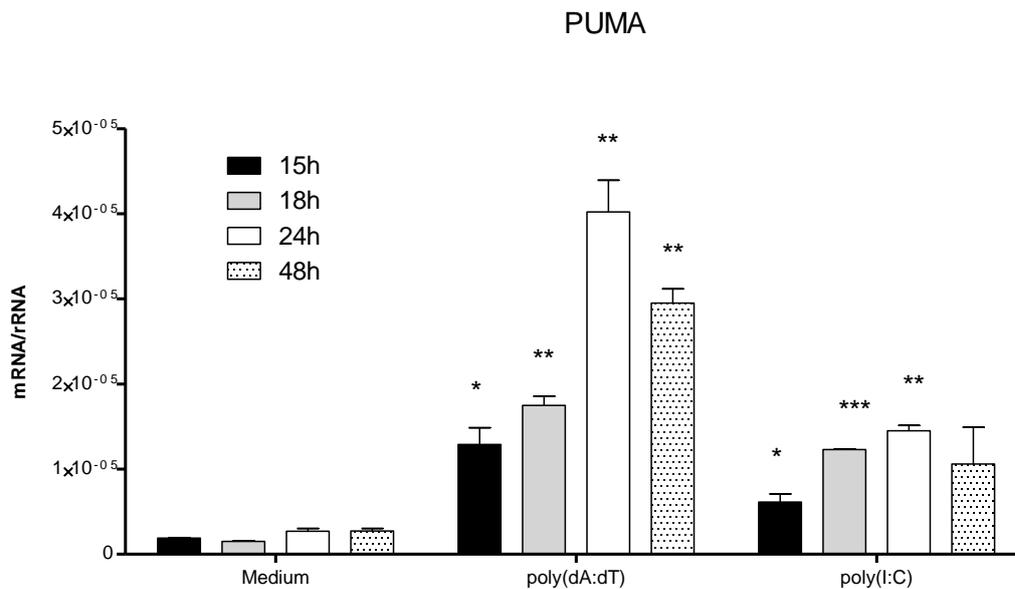


Abbildung 3.14.: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens PUMA wird signifikant v.a. durch zytosolisches *poly(dA:dT)*, etwas weniger durch zytosolisches *poly(I:C)* angehoben. Dazu wurden Min-6-Insulinomazellen folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium jeweils für 15, 18, 24 und 48 Stunden. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und im *Real Time* quantitativen PCR Verfahren auf das Gen PUMA untersucht.

* p<0,05 gegen Medium, ** p<0,01 gegen Medium, *** p<0,001 gegen Medium

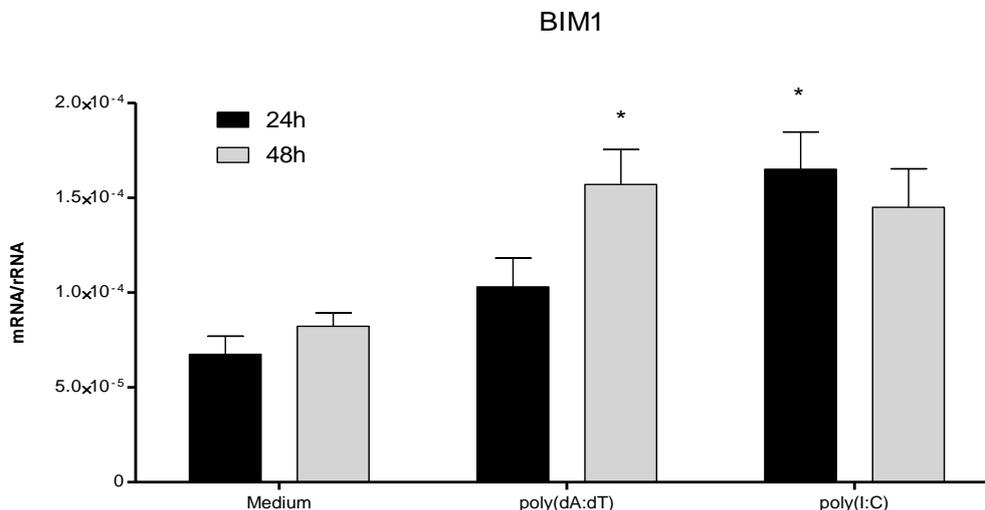


Abbildung 3.15: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BIM1 wird signifikant durch zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen.

* p<0,05 gegen Medium

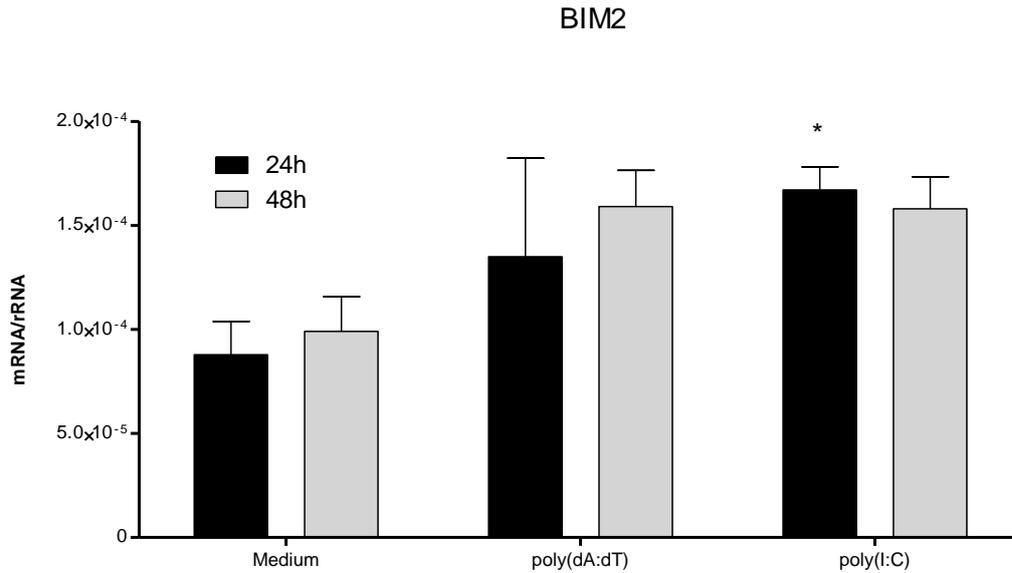


Abbildung 3.16: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BIM2 wird durch zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen.

* $p < 0,05$ gegen Medium

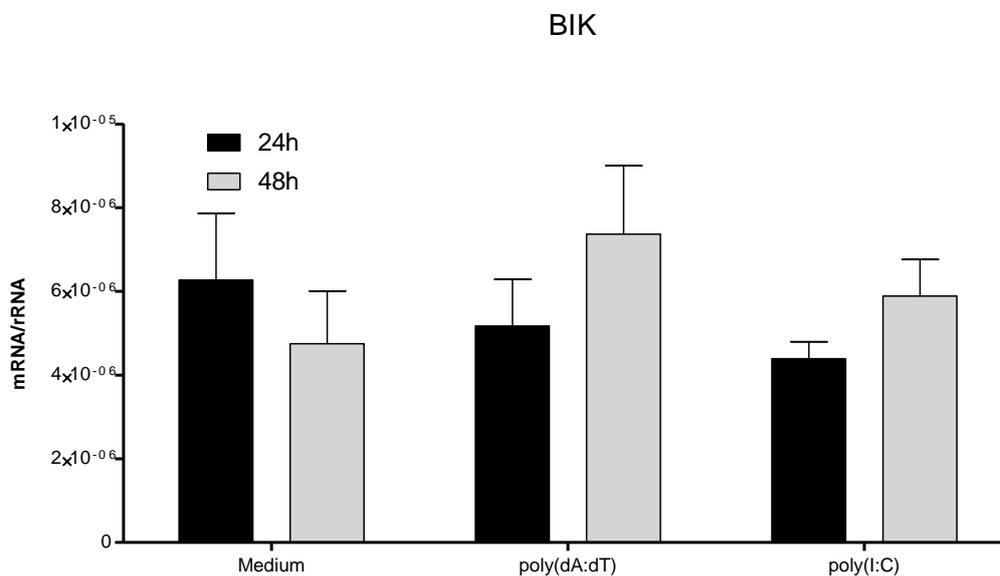


Abbildung 3.17: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BIK zeigt keine signifikanten Veränderungen nach 24 oder 48-Stunden-Stimulation durch zytoplasmatisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)*. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen. * $p < 0,05$ gegen Medium

BCL2

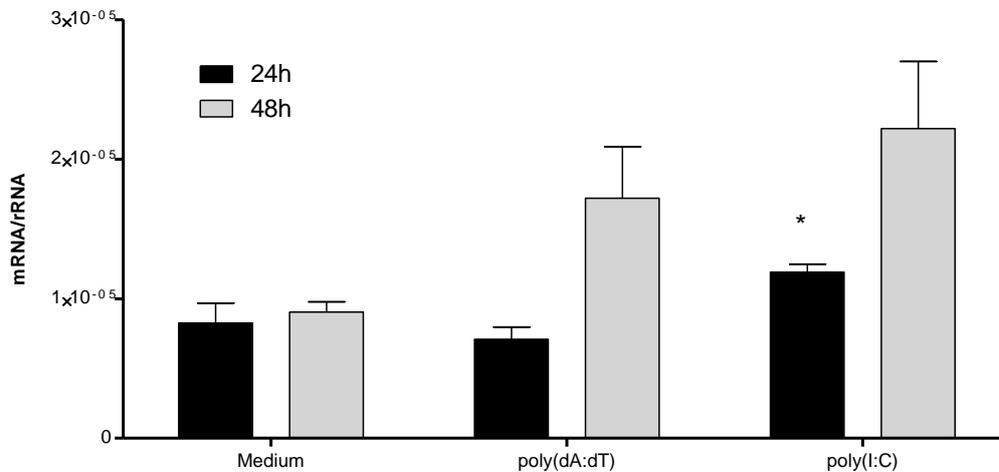


Abbildung 3.18.: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BCL2 wird nach 48-Stunden-Stimulation durch zytoplasmatisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10 μ g/ml Medium und *poly(I:C)* 10 μ g/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen. * $p < 0,05$ gegen Medium

BAX

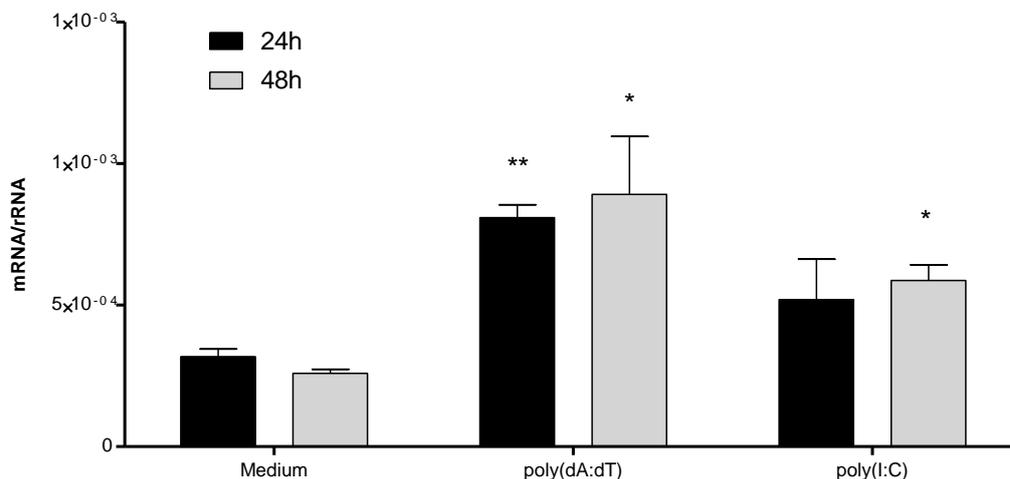


Abbildung 3.19.: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BAX wird signifikant v.a. durch zytoplasmatisches *poly(dA:dT)*, aber auch durch zytoplasmatisches *poly(I:C)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10 μ g/ml Medium und *poly(I:C)* 10 μ g/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen. * $p < 0,05$ gegen Medium, ** $p < 0,01$ gegen Medium

BID

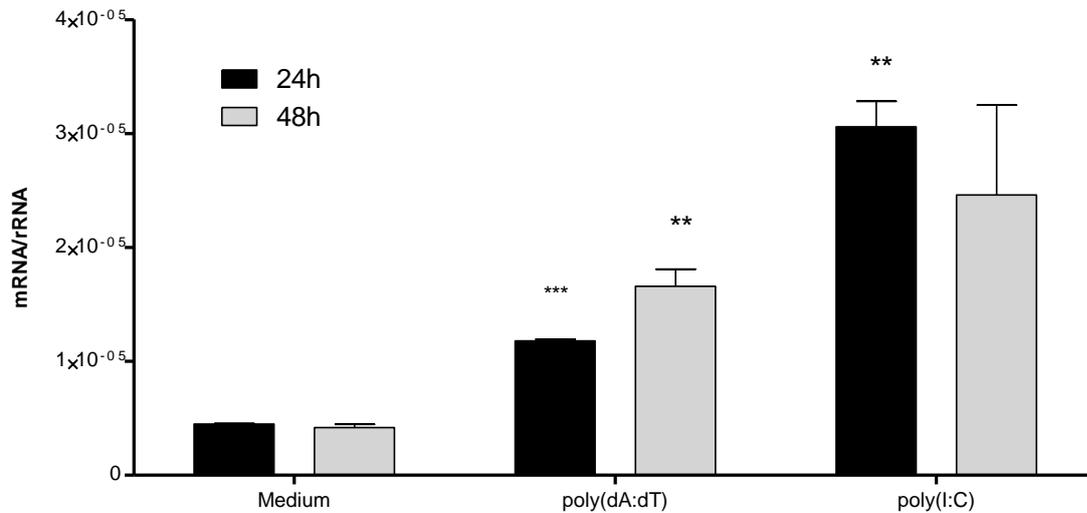


Abbildung 3.20: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BID wird durch zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen.

** p<0,01 gegen Medium, *** p<0,001 gegen Medium

BAK1

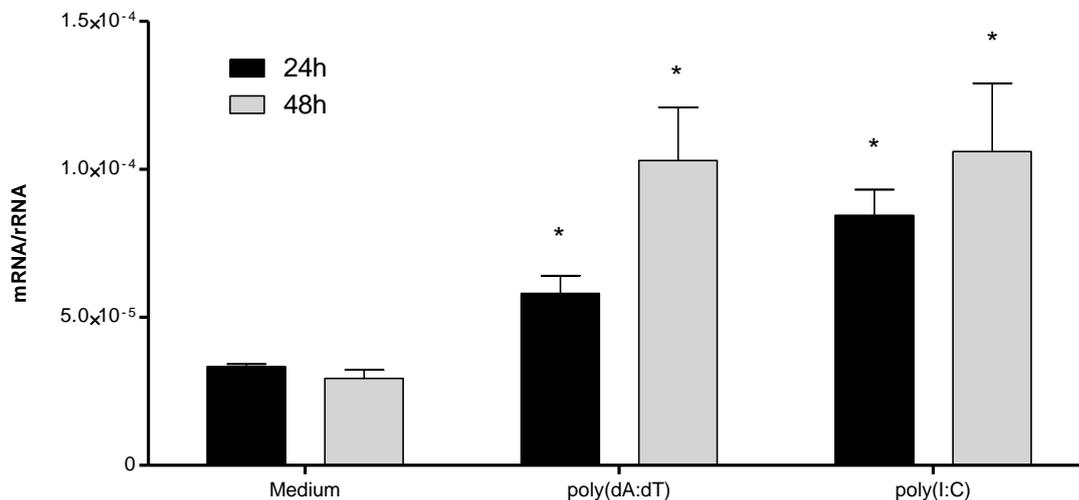


Abbildung 3.21: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BAK1 wird signifikant durch zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen.

* p<0,05 gegen Medium

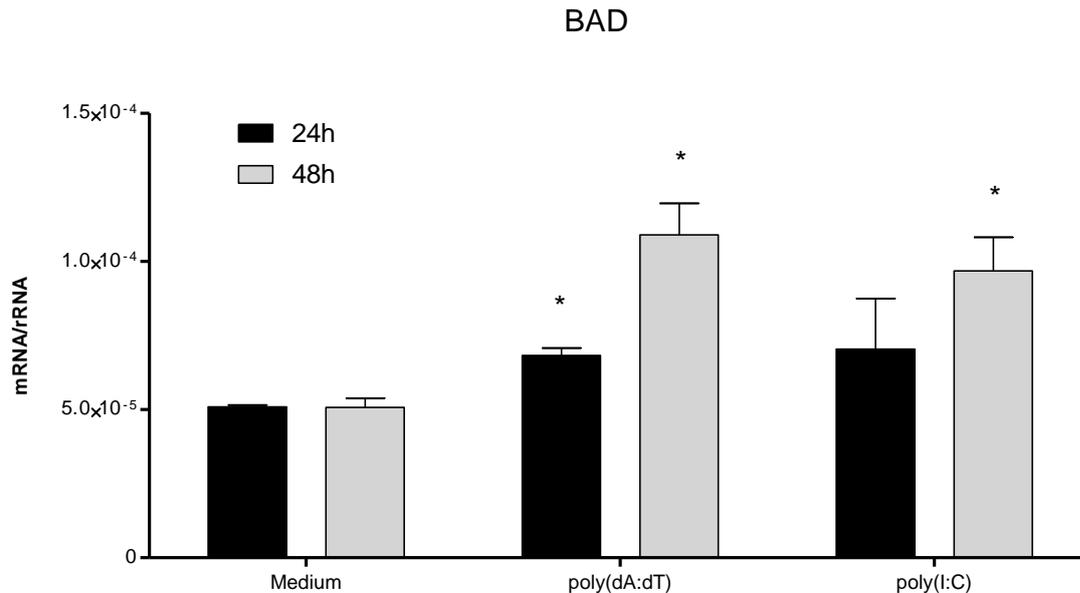


Abbildung 3.22: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens BAD wird signifikant v.a. nach den 48-Stunden-Stimulationen durch zytosolisches *poly(I:C)* und *poly(dA:dT)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen. * $p < 0,05$ gegen Medium

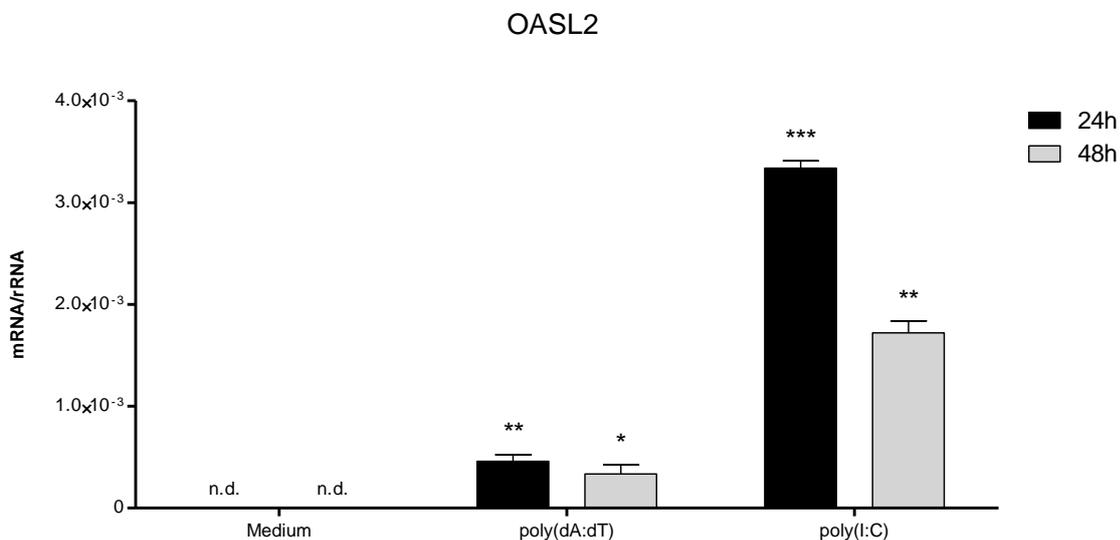


Abb. 3.23: Das mRNA-Expressionslevel des apoptoserelevanten Gens OASL2 wird signifikant v.a. durch zytosolisches *poly(I:C)*, aber auch durch zytosolisches *poly(dA:dT)* angehoben. Min-6 Insulinomazellen wurden für 24 und 48 Stunden folgendermaßen stimuliert: Mediumkontrolle, *poly(dA:dT)* 10µg/ml Medium und *poly(I:C)* 10µg/ml Medium. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine *Real Time* quantitative PCR durchgeführt, um die oben genannten Gene zu untersuchen.

* $p < 0,05$ gegen Medium, ** $p < 0,01$ gegen Medium, *** $p < 0,001$ gegen Medium

Die Stimulation durch zytoplasmatisches *poly(dA:dT)* steigerte vor allem die Level der mRNA-Expression für die Gene PUMA, NOXA und APAF1 signifikant. Zytoplasmatisches *poly(I:C)* konnte auch insbesondere die mRNA-Level dieser drei Gene induzieren, jedoch in einem niedrigeren Ausmaß als *poly(dA:dT)*.

Des Weiteren zeigte auch die mRNA der anderen hier untersuchten Gene nach Stimulation durch zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* teilweise signifikante Anstiege der Expressionslevel.

3.4 Einfluss von STZ in Kombination mit *poly(dA:dT)* auf Blutzuckerspiegel und Gewicht von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen

Nach dem erbrachten Nachweis, dass zytosolisches *poly(dA:dT)* die Zytokin- und Chemokinproduktion in Insulinomazellen induzieren kann und relevant für die Apoptose dieser Zellen ist, sollte vor dem Hintergrund dieser *in vitro*-Erkenntnisse, die Relevanz von zytosolischem *poly(dA:dT)* auch *in vivo* am Mausversuch untersucht werden.

Hierfür wurde zunächst den zwanzig Mäusen des Versuchsaufbaus, wie im Methodenteil detailliert erläutert, an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine niedrige Dosis STZ gespritzt. STZ ist eine Substanz, die bekanntermaßen spezifisch β -Zell-toxisch ist und in hohen Dosierungen Diabetes verursacht. Hier wurden niedrige Dosierungen STZ gespritzt, welche die β -Zellen lediglich vorschädigen, beziehungsweise einen gewissen Teil davon zerstören sollten. Ziel war, die Mäuse in eine prädiabetische Phase mit gerade noch aufrechterhaltener Glukosetolerenz zu bringen.

In einer darauffolgenden Phase wurde den zehn Mäusen der Kontrollgruppe DOTAP mit PBS, den anderen zehn Mäusen der Versuchsgruppe DOTAP, PBS und zusätzlich *poly(dA:dT)* injiziert. DOTAP ist ein kationisches Lipid und fungiert als Vektor, der das *poly(dA:dT)* durch die Zellwand der β -Zellen in ihr Zytoplasma transfektiert. Dieser wurde auch in der Kontrollgruppe appliziert, um eine durch ihn ausgelöste diabetogene Wirkung auszuschließen.

Zwischen den Blutzuckerwerten der Versuchsgruppe und denen der Kontrollgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 3.24.).

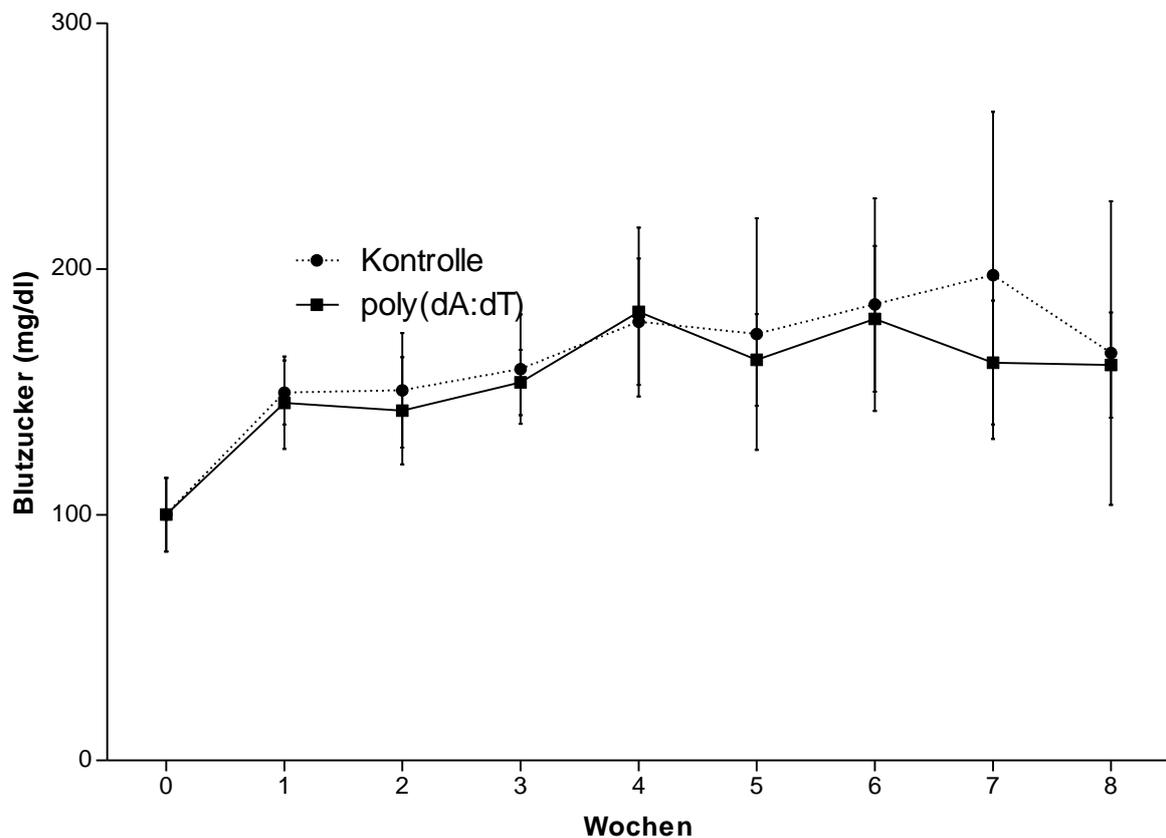


Abbildung 3.24.: Mäuse, denen DOTAP in Kombination mit *poly(dA:dT)* i.p. injiziert wurde, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede von Blutzuckerwerten. In dem Versuchsaufbau wurden der Kontroll- und Versuchsgruppe von Mäusen zuerst niedrige Dosierungen STZ – eine Substanz, die in hohen Dosierungen Diabetes verursacht, hier aber β -Zellen nur vorschädigen sollte – injiziert. In einer darauffolgenden Phase wurde der Kontrollgruppe DOTAP in Kombination mit PBS und der Versuchsgruppe dasselbe zusammen mit zusätzlichem *poly(dA:dT)* injiziert.

Außerdem wurde von den oben erwähnten Mäusen in regelmäßigen Abständen das Gewicht bestimmt. Die Mäuse der *poly(dA:dT)*-Versuchsgruppe wiesen im Schnitt keine signifikanten Gewichtsunterschiede zu denen der Kontrollgruppe auf (siehe Abbildung 3.25.).

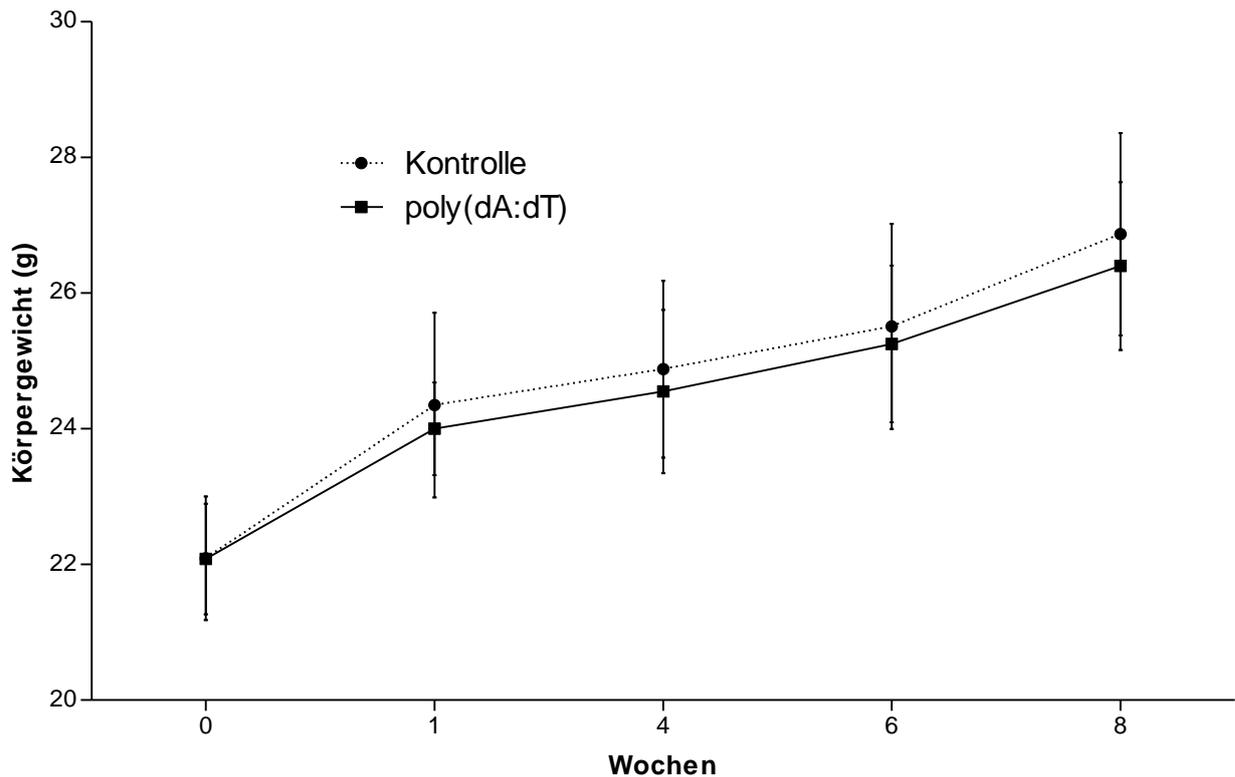


Abbildung 3.25.: Mäuse, denen DOTAP mit *poly(dA:dT)* i.p. gespritzt wurde, zeigten entgegen der Kontrollgruppe keine signifikanten Körpergewichtsunterschiede. In dem Versuchsaufbau wurden der Kontroll- und Versuchsgruppe von Mäusen zuerst niedrige Dosierungen STZ – eine Substanz, die in hohen Dosierungen Diabetes verursacht, hier aber β -Zellen nur vorschädigen sollte – injiziert. In einer darauffolgenden Phase wurde der Kontrollgruppe DOTAP in Kombination mit PBS und der Versuchsgruppe dasselbe zusammen mit zusätzlichem *poly(dA:dT)* injiziert.

4 Diskussion

Beim Diabetes mellitus Typ 1 kommt es zu einer selektiven und entzündlichen Zerstörung der β -Zellen im Pankreas [128, 195-198]. Als Ursachen für diese Entzündung kommen enterovirale Infektionen [127, 199], Gewebeschädigungen oder Gewebestress in Frage. Bislang ging man davon aus, dass β -Zell-spezifische Autoantikörper des erworbenen Immunsystems diese Krankheit induzieren [19].

Die Hypothese dieser Forschungsarbeit war, dass auch Komponenten des angeborenen Immunsystems, die einen evolutionär konservierten Mechanismus zur Kontrolle von Virusinfektionen darstellen [19], zum Sterben von β -Zellen nach Erkennen von zytosolischen Nukleinsäuren beitragen können.

So wurde die Fragestellung postuliert, ob zytosolische Nukleinsäuren eine Rolle in der Entzündung und dem Zelltod von β -Zellen spielen. Nachfolgend sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

4.1 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Die Expressionsanalysen der Nukleinsäurerezeptoren TLR3, TLR7, TLR9, RIG-I, MDA-5 und ZBP1 aus murinem Pankreasgewebe und Inseln wiesen zugunsten der Inseln eine signifikant erhöhte Expression der letzten drei genannten Rezeptoren auf. *In vitro* Stimulierungen mit Interferon- β und Interferon- γ /TNF- α von murinen Inselzellen zeigten auch eine signifikante Expressions-Induktion von RIG-I, MDA-5 und ZBP1. Dies konnte für die Rezeptoren RIG-I und MDA-5 auch im Western Blot, nach Stimulierung von Min-6-Insulinomazellen mit Interferon- β , bestätigt werden.

ELISA-Tests und mRNA-Expressionsanalysen konnten nachweisen, dass zytosolische dsRNA und dsDNA bei murinen Insulinomazellen eine Zytokin- und Chemokin-stimulierende Wirkung haben. Außerdem war in Proliferationstests eine verminderte Viabilität nach zytosolischen dsDNA und dsRNA-Stimulierungen festzustellen. Western Blots wiesen nach ähnlichen Stimulierungen von Insulinomazellen eine erhöhte Caspase3 Aktivität auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nach solchen Stimulierungen auch apoptoserelevante Gen-Expressionen relevant induziert werden können. Die *in vitro* Versuche konnten also die Bedeutung von zytosolischen Nukleinsäuren in Entzündung und Zelltod von Insulinproduzierenden β -Zellen nachweisen.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen, die auf eine Induktion von Entzündung und Zelltod in β -Zellen hindeuteten, konnten in unseren Tierversuchen keine diabetogene Eigenschaften für die synthetische dsDNA *poly(dA:dT)* festgestellt werden. Dieser Befund ist jedoch sehr wahrscheinlich auf die technischen Limitationen dieses Versuches zurückzuführen und lässt die Eingangshypothese nicht ohne Weiteres verwerfen.

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

4.2.1 Bedeutung der Expressionanalyse von Nukleinsäurerezeptoren in Langerhansschen Inseln, Pankreasgewebe und β -Zellen

Viele Rezeptoren und Liganden, Stimulatoren und Inhibitoren der PAMP-Signalwege des angeborenen Immunsystems sind bereits erforscht. Diese spielen gerade in der Anfangsphase des Diabetes mellitus Typ 1 eine wichtige Rolle [16]. So z.B. kann extrazelluläre virale dsRNA über den TLR3 Zelltod induzieren [115, 200]. Allerdings sind einige dieser Signalwege noch gänzlich oder zumindest teilweise unbekannt. Insbesondere die zytosolischen DNA- Rezeptoren und deren Signalkaskaden sind zu großen Teilen noch unerforscht. Gerade in den letzten Jahren wurden einige neue solcher Rezeptoren entdeckt, allerdings gestalten sich diese sehr vielfältig und sind in unterschiedlichen Zelltypen sehr variabel vertreten (Siehe Abb 4.1).

DNA sensor	Pathogens sensed	Ligands tested	Cell type	Signalling molecules involved	Ref
DAI	HCMV, HSV-1, <i>Streptococcus pneumoniae</i>	AT-rich B-DNA, viral, bacterial, mammalian gDNA 500 bp >> 100 bp > 75 bp	L929	TBK1, IRF3, RIP1, RIP3, NF- κ B	[21,70]
RNA pol III	<i>Leg. pneumophila</i> , Adenovirus, EBV, HSV-1?	AT-rich B-DNA, EBERs	HEK293, HeLa, MEF, mBMDM, RAW264.7, human monocytes, L929, Mutu III	RIG-I, MAVS, TBK1, DDX3, IRF3	[26,27]
LRRFIP1	<i>L. monocytogenes</i> , VSV	dsDNA, dsRNA AT-rich B-DNA, GC-rich Z-DNA	murine 1° PM, RAW264.7	β -catenin, p300, IRF3	[32]
DHX9	HSV	CpG-A	human pDCs	MyD88, NF- κ B (p50)	[33]
DHX36	HSV	CpG-B	human pDCs	MyD88, IRF7	[33]
IFI16/p204	HSV-1	dsDNA Sequence-independent 70 bp >> 50 bp	THP1, RAW264.7, MEF, HeLa, BMDM	STING, TBK1, IRF3, NF- κ B	[29]
Ku70	HSV-2G	dsDNA, ssDNA, sequence-independent 500 bp >> 50 bp	HEK293, human MDM, murine spleen cells	IRF1, IRF7, IFN λ 1	[34]

PM, peritoneal macrophage; MDM, monocyte-derived macrophage.

Abb. 4.1: Charakteristika von zytosolischen DNA Erkennungsrezeptoren, die Typ-I-Interferonantworten induzieren [105].

Am Anfang meiner Studie waren viele der in Abbildung 4.1. aufgeführten DNA-Rezeptoren unentdeckt und es war vor allem unbekannt, welche Nukleinsäure-rezeptoren in β -Zellen vorhanden sind. So wurde in einer ersten Versuchsreihe das Vorkommen von einigen Rezeptoren in solchen Zellen überprüft, um einen eventuellen für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 relevanten Signalweg des angeborenen Immunsystems studieren zu können. Hierfür wurden Inselzellen aus dem Pankreas von C57/Bl6 Mäusen isoliert. Anschließend wurde von diesen Zellen die mRNA-Expression der Gene RIG-I, MDA5, ZBP1, TLR3, TLR7 und TLR9 im Vergleich zum übrigen Pankreasgewebe bestimmt. Es zeigte sich ein Vorkommen der Gene RIG-I, MDA-5 und ZBP1 in Inselzellen und gegenüber dem Gesamtpankreas eine vermehrte Expression. Die Expressionsanalysen der RIG-I-like Rezeptoren stimmten mit den zeitgleich zu meinen Ergebnissen publizierten der Gruppe von M. Garcia überein [198].

Der DNA-abhängige Aktivator von IRFs (DAI) (hier ZBP1 genannt), war das erste Molekül, von dem als möglicher zytoplasmatischer DNA-Rezeptor berichtet wurde [88]. *Knockdown*-Studien mit *small-interfering*(si)RNAs ließen vermuten, dass DAI essentiell für die Interferoninduktion als Antwort auf Stimulationen mit verschiedenen dsDNAs oder Viren sei. Auch eine mRNA-Expression der untersuchten TLR-Gene konnte in Inselzellen nachgewiesen werden. Die Expression der Gene TLR3 und TLR9 war in Inseln niedriger als im restlichen Pankreasgewebe, die von TLR7 in etwa gleich hoch. Diese Erkenntnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass gerade die im Zytoplasma gelegenen Nukleinsäurerezeptoren wichtiger für die Signalkaskade in Inselzellen und somit auch in β -Zellen sind, als die extrazytoplasmatisch gelegenen TLRs (siehe Abbildung 3.1.).

Für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 stellt die Insulitis einen essentiellen Faktor dar [16, 18]. Nach dem Expressionsnachweis der oben genannten Nukleinsäurerezeptoren war die nächste Überlegung, ob diese durch Entzündungsmediatoren zu einer vermehrten Expression in pankreatischen β -Zellen bewegt werden können. Hierfür wurden Min6- β -Insulinomazellen zum einen mit Interferon- β und zum anderen mit Interferon- γ und TNF- α stimuliert. In der anschließend durchgeführten *Real Time* quantitativen PCR zeigte sich vor allem eine vermehrte Expression der Gene RIG-I und MDA-5. Die Expression des ZBP1-Gens konnte durch Interferon- γ /TNF α hochreguliert werden, jedoch nicht durch Interferon- β . Auch

die mRNA-Expression des TLR3-Gens ließ sich durch diese Stimulantien etwas anheben, während sich die der TLR7- und TLR9-Gene kaum haben beeinflussen lassen. Diese Erkenntnisse könnten wieder ein Hinweis darauf sein, dass die im Zytoplasma gelegenen Nukleinsäurerezeptoren im Entstehungsmechanismus der Insulinitis wichtiger als die membrangebundenen TLRs sind. Bestätigt wurden diese Entdeckungen über die zytosolischen Nukleinsäure-rezeptoren nach Stimulierung von Min-6-Insulinomazellen mit Interferon- β auch im Western Blot. Die Proteinmengen von RIG-I und MDA-5 waren danach erhöht, die von ZBP1 hingegen nicht. Dies deckte sich mit Studien über ZBP1-defiziente Mäuse, die aufwiesen, dass sowohl aus diesen Tieren isolierte Zellen auf die Stimulationen mit *poly*(dA:dT) oder plasmatischer DNA reagieren, als auch die Tiere selbst auf Infektionen durch einen DNA-Virus mit einer normalen Immunantwort antworten konnten [89, 90]. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass ZBP1 nur eine nebensächliche oder ersetzbare Rolle in der DNA-Erkennung spielt und kein essentieller zytosolischer DNA-Rezeptor ist. Im Einklang mit diesen Entdeckungen stand auch, dass ein *Knockdown* von ZBP1 in L929 Fibroblasten die Typ-1-Interferonproduktion als Antwort auf dsDNA stark erniedrigte, während derselbe Knockdown in embryonalen Mausfibroblasten die Immunantwort kaum beeinflusste [90].

Folglich kann die Immunantwort auf intrazelluläre DNA in verschiedenen Zelltypen variieren und es hat sich im Laufe der Evolution mehr als nur ein Rezeptor entwickelt, der zytoplasmatische dsDNA erkennt. ZBP1 scheint in murinen β -Zellen - wenn überhaupt - nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.2.2 Einfluss von *poly*(I:C) und *poly*(dA:dT) auf Zytokin- und Chemokin-Produktion von β -Zellen

Noch immer konnte nicht in Erfahrung gebracht werden, wie in insulinproduzierenden β -Zellen dsDNA im normalerweise DNA-freien Zytoplasma erkannt wird und welche Signalkaskaden es auslösen kann.

Hauptziel dieser Studie war es, die Rolle von zytosolischen Zwischenprodukten des viralen Replikationszykluses, wie insbesondere dsDNA, aber auch dsRNA und ssRNA in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 in β -Zellen zu erkunden.

Die Forschungsgruppen von A. Pichlmair und V. Hornung hatten bereits aufgewiesen, dass zytosolische ssRNA, die im Replikationszyklus von Viren wie z.B. dem Influenza A Virus anfällt, die Signalkaskaden der Rezeptoren RIG-I und MDA-5 aktivieren kann. In Ihren Versuchen verwendeten sie ssRNA in Form von 5'-Triphosphaten (5'-ppp) [62, 63]. Andererseits entdeckten die Gruppen von Yoneyama und Kato anhand von Versuchen am Zell- (L929 Mauszellen) und Mausmodell, dass auch zytosolische dsRNA, welche ebenfalls ein Zwischenprodukt im Replikationszyklus vieler Viren ist, diese Signalkaskaden aktivieren kann. Für ihre Studien verwendeten sie zytosolische dsRNA als Stimulus in Form von *poly(I:C)* [53, 61]. Außerdem wird die Ausschüttung von Interferonen anihiliert, wenn cDCs von RIG-I -/- Mäusen mit Paramyxoviren infiziert werden. Die Interferon-Produktion in pDCs ist jedoch von TLRs abhängig. Das lässt schlussfolgern, dass das Erkennen von viraler RNA durch RIG-I zellabhängig ist [58].

Die Gruppen von D. Heitmeier und M. Sobel zeigten bereits in den 1980er und 1990er Jahren, dass dsRNA auch die Funktion von β -Zellen schädigt und *poly(I:C)* Diabetes mellitus in Ratten hervorrufen kann [201, 202]. Außerdem wies die Gruppe von D. Liu auf, dass dsRNA zusammen mit Interferon- γ und IL-1 β die Chemokin-Expression hochregulieren und NF- κ B abhängige Apoptose in β -Zellen induziert [119]. Diese drei zuletzt genannten Studien jedoch verwendeten extrazelluläres *poly(I:C)*.

Zeitgleich zu meiner Studie isolierte die Forschungsgruppe von M.Garcia β -Zellen aus Ratten und transfektierte das Zytosol dieser mit der dsRNA *poly(I:C)*. Als Vektor wurde das kationische Lipid Lipofektamin verwendet. Resultierend war eine Induktion des Interferon- β und NF- κ B Promotors sowie eine Insulinitis über die Aktivierung des RIG-I und MDA-5 Signalwegs festzustellen [198].

Aufgrund der bereits bestehenden Erkenntnis, dass ssRNA und dsRNA auch in pankreatischen β -Zellen Apoptose und Zeldysfunktion hervorrufen können, wurde in dieser Studie als Stimulus neben synthetischen RNAs [119, 198, 201, 202] auch das synthetische dsDNA-imitierende *poly(dA:dT)* verwendet. So sollte erörtert werden, ob nicht nur RNA, wie sie im Replikationszyklus von Viren vorkommt, sondern auch zytosolische dsDNA, die u.a. auch als Zwischenprodukt viraler Replikation im Zytosol vorkommt, sich auf zelluläre Dysfunktion und Apoptose in insulinproduzierenden β -Zellen auswirkt.

Es war sowohl per *Real Time* quantitative PCR als auch per Western Blot bereits nachgewiesen worden, dass die Expression von RIG-I und MDA-5 durch Stimulation mit Interferon- β induziert werden kann. In logischer Konsequenz stellte sich die Frage, ob eine Bindung solcher zytosolischer Nukleinsäuren an zytosolische Nukleinsäurerezeptoren auch zu einer Produktion von Zytokinen und Chemokinen führen würde. Diese stünde am Ende dieser Signalkaskaden [54]. Hier wurden als Liganden *poly*(dA:dT), als künstliche dsDNA, 3'-ppp-RNA als künstliche ssRNA und *poly*(I:C) als künstliche dsRNA verwendet.

In dem durchgeführten Interferon- β - und CCL5-ELISA zeigte eine Stimulierung durch zytosolisches *poly*(dA:dT) weder in niedrigen noch mittleren oder hohen Konzentrationen einen Einfluss auf die Produktion dieser Proteine, während die zytosolische Stimulierung mit *poly*(I:C) auch schon bei mittlerer Dosierung große Auswirkungen aufwies. Am Ende der Signalkaskade des zytosolischen DNA-rezeptors DAI steht in L929 Fibroblasten nach Transfektion mit *poly*(dA:dT) die Ausschüttung von Typ-I-Interferonen [90]. Fehlende Interferon- β Ausschüttung nach Transfektion mit *poly*(dA:dT) macht ein Vorhandensein dieses Rezeptors in murinen β -Zellen unwahrscheinlich.

Auch die RNA-Polymerase III sorgt dafür, dass in vielen verschiedenen Zelltypen *poly*(dA:dT) über den RIG-I-Signalweg erkannt wird und Typ-I-Interferone ausgeschüttet werden [94]. Dies gilt auch für LRRFIP1, welches nach dsDNA Transfektion über einen β -katenin-spezifischen Signalweg Interferon- β ausschüttet [109]. Folglich ist auch die Aktivität von Polymerase III und LRRFIP1 in murinen β -Zellen in Frage zu stellen.

Der Interleukin6- und Interleukin-1 β ELISA zeigte, dass weder *poly*(I:C) noch *poly*(dA:dT) eine Auswirkung auf die Ausschüttung dieser Chemokine hatten (Daten werden hier nicht gezeigt).

Interleukin-1 β würde am Ende der Signalkaskade des zytoplasmatischen DNA-Rezeptors AIM2 stehen [100]. P204 ist ein weiterer muriner zytosolischer DNA-Rezeptor, der nach Aktivierung über eine TBK1 und IRF3 abhängige Signalkaskade Typ-I-Interferone und proinflammatorische Zytokine ausschüttet [104]. Dies ließ vermuten, dass p204, ebenso wie AIM2, in β -Zellen keine oder eine untergeordnete Rolle im Erkennen von dsDNA spielt. Am Ende der Signalkaskade des zytosolischen DNA-Rezeptors DHX9 steht unter anderem die Ausschüttung von Interleukin6 [107].

Das lässt auch diesen als DNA-Erkennungsrezeptor in murinen β -Zellen unwahrscheinlich wirken.

Allerdings wies der durchgeführte ELISA-Test für das CXCL10-Protein (auch *Interferon gamma-induced protein 10* (IP-10) genannt) eine signifikante Mehrproduktion nach Stimulation durch zytosolisches *poly(dA:dT)* auf.

Nach Stimulierung von Min-6-Insulinomazellen mit zytosolischem *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* konnte auch eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des CXCL-10 Gens die Ergebnisse des CXCL-10 ELISA bestätigen.

Außerdem wurde die mRNA-Expression des IFIT 1 (*Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*) Gen nach einer solchen Stimulierung von Min-6-Insulinomazellen mit zytosolischem *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* signifikant angehoben. Das lässt eine gewisse Rolle von *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* in der Ausschüttung von Interferonen vermuten, da IFIT 1 und CXCL10 durch Interferone induziert werden.

Poly(dA:dT) kann also gewisse Komponenten des Entzündungsapparats, der für eine Insulinitis von so großer Bedeutung ist, aktivieren [16]. Welcher Signalweg dabei aktiviert wird und welche Erkennungsrezeptoren involviert sind, muss in weiteren Versuchen erörtert werden. So könnte z.B. eine Typ-III-Interferonausschüttung wie Interferon- λ 1, welches am Ende der Signalkaskade des zytoplasmatischen DNA-Rezeptors Ku70 steht [108], nach Transfektion von β -Zellen mit zytosolischem *poly(dA:dT)* überprüft werden.

4.2.3 Einfluss von zytosolischem *poly(I:C)* und *poly(dA:dT)* auf die Apoptose von β -Zellen

In den durchgeführten Proliferationstest konnte nachgewiesen werden, dass sowohl *poly(I:C)* als auch *poly(dA:dT)* die Lebens- und Proliferationsfähigkeit von Min-6-Insulinomazellen deutlich senken konnten. Dies bestärkte die Annahme, dass sowohl dsRNA als auch dsDNA Liganden für zytosolische Nukleinsäurerezeptoren sind und somit virale dsRNA und dsDNA eine Rolle im β -Zelltod haben können.

Auf Proteinebene konnte in Min-6 β -Insulinomazellen das für Apoptose so wichtige aktivierte Caspase3-Protein [203] in erhöhten Werten nach Stimulation sowohl durch *poly(I:C)* als auch durch *poly(dA:dT)* nachgewiesen werden. Das lies die Vermutung aufkommen, dass der im Proliferationstest gesehene β -Zelltod apoptotischer Natur sein könnte. Diese Erkenntnisse stimmten mit denen der Gruppe von M. Garcia

überein. Sie zeigte, dass sowohl zytosolisches *poly(I:C)*, als auch 3'-ppp-RNA hauptsächlich Apoptose und weniger Nekrose in murinen β -Zellen verursachen [198]. Jedoch hatten sie nicht aufgewiesen, dass ein solcher Effekt auch durch eine dsDNA wie *poly(dA:dT)* erzielt werden kann.

Um die Art des im Viabilitätstest festgestellten Zelltodes zu bestimmen, wurden im *Real Time* quantitativen PCR-Verfahren in einer weiteren Versuchsreihe die apoptoserelevanten Gene PUMA, NOXA, APAF1 und einige andere ebenso apoptoserelevante Gene untersucht. Diese aktivieren am Ende ihrer Kaskade auch Capase3 [183].

Die Stimulation durch zytoplasmatisches *poly(dA:dT)* konnte vor allem die Expression der Gene PUMA, NOXA und APAF1 signifikant induzieren. Zytoplasmatisches *poly(I:C)* vermochte dies auch insbesondere im Falle dieser drei Gene, jedoch in einem niedrigeren Ausmaß als *poly(dA:dT)*.

Auch die mRNA der anderen hier untersuchten apoptoserelevanten Gene wiesen nach Stimulation durch zytosolisches *poly(dA:dT)* und *poly(I:C)* teilweise signifikante Expressionsinduktionen auf.

4.2.4 Tierversuche

Die Gruppe von Garcia [120] hatte im Verlaufe unserer Studie bereits die *in vitro* Bedeutung von zytosolischem *poly(I:C)* aufgedeckt. Neu jedoch waren die durch unsere Zellversuche gewonnenen Erkenntnisse, dass in murinen β -Insulinomazellen und Inselzellen durch Stimulierung mit *poly(dA:dT)* Apoptose und Entzündung hervorgerufen werden kann. So überlegten wir, ob durch *in vivo* Injektionen von *poly(dA:dT)* in Tierversuchen an Mäusen sich ein derartiger Zelltod von insulinproduzierenden pankreatischen β -Zellen ergeben kann, dass sich daraus eine Signifikanz in Blutzuckerspiegeln oder sogar ein klinisch symptomatischer Diabetes ableitet.

Hierfür wurde zunächst allen Mäusen des Versuchsaufbaus wiederholt eine niedrige Dosis STZ gespritzt. STZ ist eine Substanz, die spezifische β -Zytotoxizität aufweist und stellt eine etablierte Forschungsmethode dar, um Diabetes mellitus bei Mäusen zu induzieren. Hier wurde jedoch eine sehr niedrige Dosis gespritzt, welche die β -Zellen lediglich vorschädigen, beziehungsweise einen gewissen Teil davon zerstören

sollte [204]. Ziel war, die Mäuse in eine prädiabetische Phase mit gerade noch aufrechterhaltener Glukosetoleranz zu bringen.

In einer darauffolgenden Phase wurde der Kontrollgruppe DOTAP zusammen mit PBS injiziert, wohingegen der Versuchsgruppe ein Gemisch aus DOTAP, PBS und zusätzlichem *poly*(dA:dT) gespritzt wurde. DOTAP ist ein kationisches Lipid, welches als Vektor fungierte, um das *poly*(dA:dT) durch die Zellwand der β -Zellen in ihr Zytoplasma zu transportieren. Dieser wurde auch in der Kontrollgruppe appliziert, um eine durch ihn ausgelöste diabetogene Wirkung auszuschließen.

Sinn des Versuches war zu erforschen, ob *poly*(dA:dT) die gerade noch aufrecht erhaltene Glukosetoleranz umstoßen kann und inwieweit *poly*(dA:dT) einen Effekt auf Blutzuckerspiegel und Gewicht der Mäuse, beziehungsweise auch klinisch relevante diabetogene Eigenschaften aufweist. Überraschenderweise zeigten die Mäuse der Versuchs- im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe keine signifikanten Blutzuckerwert- oder Körpergewichts-Unterschiede. Die Ergebnisse der *in vivo* Tierversuche konnten also nicht die der *in vitro* Zell-experimente bestätigen.

Es ist natürlich möglich, dass diese Resultate der Realität entsprechen und zytosolische dsDNA für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 keine klinisch relevanten Eigenschaften aufweist. Möglich ist jedoch auch, dass unvorhergesehene Störfaktoren und Variablen eintraten und die Ergebnisse der Tierversuche verfälschten. Vielleicht waren die Mäuse im Studiendesign zu jung. Die Gruppe S.Hugues zeigte 2002, dass niedrige Dosierungen STZ bei vier Wochen alten Mäusen protektiv auf Inselzellen wirkt [205], (unsere Mäuse waren sechs Wochen alt) während in der Studie von H.Kim dieselbe Menge STZ bei älteren Mäusen diabetogene Eigenschaften hatte [131, 156]. Eine von vielen weiteren Möglichkeiten könnte sein, dass das intraperitoneal gespritzte *poly*(dA:dT) durch Nukleasen verdaut wurde, noch bevor es in den Inseln wirken konnte. Außerdem ist ungewiss, ob *poly*(dA:dT), falls es überhaupt das Pankreasgewebe erreichte, durch das kationische Lipid in das Zytosol der β -Zellen transfektiert wurde. Vielleicht war auch einfach die Dosis *poly*(dA:dT) zu niedrig. Es bestehen also viele Unwägbarkeiten, welche die Hypothese nicht ohne Weiteres verwerfen lassen. So könnte in zukünftigen Versuchen zum Beispiel radioaktiv markierte DNA verwendet werden, um eine Verteilung dieser nach intraperitonealer Injektion zu erforschen. Die

Durchführung solcher Versuche würde jedoch die technischen Möglichkeiten dieser Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades in der Medizin übersteigen.

Zu bedenken ist jedoch auch, dass die Ergebnisse aus den Zellversuchen *in vitro* Befunde darstellen. Zu großen Teilen wurde an murinen Insulinomazellen gearbeitet. Man weiß nicht, ob diese die gleichen Eigenschaften aufweisen, wie es bei Inseln oder β -Zellen der Fall wäre. Außerdem kann vom Zellmodell nicht immer auf das Tiermodell geschlossen werden. Und auch die künstlichen Nukleinsäuren müssen nicht immer so wirken, wie z.B. Viren oder deren Produkte es würden. Ferner muss das, was bei diesen Tieren pathogene Eigenschaften zeigt, bei Menschen nicht dasselbe bewirken und umgekehrt. All die am Modell durchgeführten Versuche geben nur Hinweise auf das, was sich in Wirklichkeit abspielen könnte.

Jedoch konnten die hier aufgeführten Befunde eines zeigen: dsDNA in Form von *poly(dA:dT)* kann auf Zellebene eine gewisse Rolle im Tod und Entzündung von Insulin-produzierenden β -Zellen spielen. Außerdem könnte sie – sei es direkt oder über eine vorherige Umwandlung z.B. in dsRNA [94] - einen Ligand der zytosolisch gelegenen Nukleinerkennungszepatoren RIG-I und MDA-5, und/oder eines anderen, noch unbekanntes DNA-Rezeptors, sowie Aktivator ihrer Signalkaskaden darstellen. Inwieweit diese Erkenntnisse in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 eine Rolle spielen, muss in Zukunft weiter untersucht werden.

4.3 Stand der klinischen Forschung und Ausblick

Die aktuell praktizierte symptomatische Therapie der ca. 900.000 und mehr werdenden Diabetes mellitus Typ 1 Patienten zeigt keine befriedigenden Resultate [206]. Obwohl es einer täglichen, unkomfortablen, zeitraubenden und teuren Selbstüberwachung und Einstellung bedarf, können Blutzuckerspiegel über das von außen gesteuerte Injizieren von Insulin nicht auf einem so konstanten Niveau gehalten werden, wie es bei gesunden Menschen der Fall ist [207]. Zwar gab es in den letzten Jahren technische Fortschritte wie z.B. Insulinpumpen, dennoch sind Patienten mit dieser Erkrankung durch akut auftretende lebensbedrohliche Hypoglykämien gefährdet. Außerdem können mikro- und makrovaskuläre Komplikationen bislang nicht zuverlässig verhindert werden. So bilden ernstzunehmende Folgeerkrankungen von Niere, Auge, Herz, peripheres und

zentrales Nervensystem und daraus resultierenden Komplikationen bei diesen Patienten die Regel.

Schon seit 1984 versucht man das Hauptproblem dieser Erkrankung durch einen Erhalt der β -Zellmasse zu bekämpfen, bevor sie durch Insulinitis und autoimmunem Geschehen dezimiert wurde. Über 30 Studien mit allgemeinen Immunsuppressiva, darunter auch Cyclosporin, Prednison, Azathioprin, aber auch mit Antigen-therapien und Nikotinamid, wurden bereits durchgeführt. Allesamt hatten aber nur geringe Erfolge und/oder starke unerwünschte Nebenwirkungen [208]. Nachdem in den letzten zehn Jahren große Fortschritte in der Früherkennung von Diabetes mellitus Typ 1 erzielt worden waren, konnten neuere Studien, nach einem großräumigen Screening (die Gruppe von L. Harrison untersuchte z.B. 100000 finnische Kinder [209]), Forschung zu primär präventiven, gezielten Therapien an sehr großen Patientenkollektiven anstellen. Es gab z.B. Ansätze mit anti-T-Zell-Aktivität. In der Studie von K. Herold [210] wiesen von den zwölf Patienten, denen Teplizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD3 verabreicht worden war, nach einem Jahr neun Patienten weiterhin eine stabile Insulinausschüttung auf. Dies war in der Kontrollgruppe nur bei zwei von zwölf Patienten der Fall. Andere Studien verwendeten anti-B-Zell-Aktivität z.B. durch den anti-CD20 Antikörper Rituximab [211]. Die Patienten demonstrierten signifikant niedrigere HbA1c-Werte und brauchten weniger Insulin. Jedoch konnten, genau wie in der Teplizumab Studie, die positiven Ergebnisse nur für sechs Monate aufrechterhalten werden. Danach verlief die Progredienz der Krankheit in der Versuchsgruppe parallel zu derjenigen aus der Kontrollgruppe. Es gibt noch viele weitere Studien mit weiteren Ansätzen. Alle aufzuzählen würde jedoch den Rahmen dieser Dissertation sprengen.

Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zum β -Zelltod führen, könnte dazu beitragen, die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 zu verhindern, so wie es bei anderen Autoimmunkrankheiten (Systemischer Lupus erythematoses, multiple Sklerose) bereits möglich geworden ist. Bisher sehen wir dem zerstörenden Autoimmunprozess tatenlos zu und behandeln nur die Komplikationen (wie bei der Hashimotothyreoiditis). Allerdings ist der Hormonausgleich beim Diabetes mellitus Typ 1 zur Vermeidung von Folgeerscheinungen so ineffizient, dass eine Verhinderung der β -Zellzerstörung weiterhin als therapeutisches Ziel attraktiv erscheint.

5 Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 1 ist trotz großer medizinischer Fortschritte noch immer nicht heilbar und die aktuell praktizierte symptomatische Therapie der ca. 900.000 und mehr werdenden Patienten zeigt keine befriedigenden Resultate [206]. Es kommt hierbei zu einer selektiven und entzündlichen Zerstörung der β -Zellen im Pankreas [128, 195-198]. Als Ursachen für diese Entzündung kommen enterovirale Infektionen [127, 199], Gewebeschädigungen oder Gewebestress in Frage. Bislang jedoch ging man davon aus, dass β -Zell-spezifische Autoantikörper des erworbenen Immunsystems diese Krankheit induzieren [19]. Die Hypothese dieser Forschungsarbeit war, dass auch Komponenten des angeborenen Immunsystems, die einen evolutionär konservierten Mechanismus zur Kontrolle von Virusinfektionen darstellen [19], zum Sterben von β -Zellen nach Erkennen von zytosolischen Nukleinsäuren beitragen können.

Am Anfang meiner Studie waren viele der zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren unentdeckt und es war vor allem unbekannt, welche Rezeptoren des angeborenen Immunsystems in β -Zellen vorkommen. So wurde in einer ersten Versuchsreihe das Vorkommen von einigen dieser Rezeptoren überprüft, um einen eventuellen für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 relevanten Signalweg des angeborenen Immunsystems studieren zu können. Die Expressionsanalysen der Nukleinsäurerezeptoren TLR3, TLR7, TLR9, RIG-I, MDA-5 und ZBP1 aus murinem Pankreasgewebe und Inseln wiesen zugunsten der Inseln eine signifikant erhöhte Expression der letzten drei genannten Rezeptoren auf. Ferner wurde eine Expressions-Induktion dieser durch Entzündungsmediatoren untersucht. *In vitro* Stimulierungen mit Interferon- β und Interferon- γ /TNF- α von murinen Inselzellen zeigten daraufhin eine signifikante Expressions-Induktion von RIG-I, MDA-5 und ZBP1. Dies konnte für die Rezeptoren RIG-I und MDA-5 auch im Western Blot, nach Stimulierung von Min-6-Insulinomazellen mit Interferon- β , bestätigt werden.

Wie die Gruppe von Garcia zeitgleich zu meiner Studie aufwies, stellen insbesondere zytosolische dsRNAs Liganden für zytosolische Nukleinsäurerezeptoren und Aktivoren der angekoppelten Signalkaskaden in β -Zellen dar [198]. Zwar sind die erst kürzlich gewonnenen Erkenntnisse über DNA-Erkennungs Signalwege in ihrer Anzahl noch gering, allerdings konnte die Relevanz dieser z.B. schon für die Autoimmunerkrankung des systemischen Lupus erythematodes nachgewiesen

werden. Um also die Rolle von dsDNA in der Insulinitis und Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I zu erforschen, wurde die Fragestellung postuliert, ob auch durch dsDNA stimulierte zytosolische Nukleinsäurerezeptoren Entzündungsmediatoren freisetzen. ELISA-Tests und mRNA-Expressionsanalysen konnten nachweisen, dass zytosolische dsRNA und dsDNA bei murinen Insulinomazellen eine Zytokin- und Chemokin-stimulierende Wirkung haben.

Es stellte sich ferner die Frage, ob nach zytoplasmatischer dsDNA-Stimulierung der Nukleinsäurerezeptoren Zelltod stattfindet und diese einen Einfluss auf die Proliferations- und Lebensfähigkeit aufweist. In hierfür angefertigten Proliferationstests war eine verminderte Viabilität nach zytosolischer dsDNA und dsRNA-Stimulierungen festzustellen. Western Blots wiesen nach ähnlichen Stimulierungen von Insulinomazellen eine erhöhte Caspase3 Aktivität auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nach solchen Stimulierungen auch apoptoserelevante Gen-Expressionen relevant induziert werden können. Die *in vitro* Versuche konnten also eine Relevanz von zytosolischen Nukleinsäuren im Zelltod von Insulinproduzierenden β -Zellen nachweisen.

Um die *in vitro* gewonnene Erkenntnisse auch im Mausmodell zu bestätigen und die Wirkung von zytosolischer dsDNA in β -Zellen bei Mäusen zu untersuchen, wurde im Tierversuch C57BL/6 Wildtyp-Mäuse *poly(dA:dT)* samt Vektor i.p. injiziert und der Verlauf eines eventuellen Diabetes mellitus beobachtet, sowie mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen, die auf eine Induktion von Entzündung und Zelltod in β -Zellen hindeuteten, konnten in unseren Tierversuchen keine diabetogene Eigenschaften für die synthetische dsDNA *poly(dA:dT)* festgestellt werden. Dies ist jedoch ein Befund, der am Ende durch technische Limitationen des Versuchsansatzes begründet sein dürfte.

Virale DNA ist ein möglicher Mediator des β -Zelltods beim Diabetes mellitus Typ 1, da Apoptose, neben Induktion einer lokalen Entzündung ein evolutionär konservierter Mechanismus zur Kontrolle von Virusinfektionen ist. Bei viraler Infektion von β -Zellen kommt es zum selektiven Verlust von Insulin-produzierenden Zellen und somit zum Diabetes mellitus Typ 1.

Literaturverzeichnis

1. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 221-9.
2. Gianani, R. and G.S. Eisenbarth, *The stages of type 1A diabetes: 2005*. Immunol Rev, 2005. **204**: p. 232-49.
3. Peng, H. and W. Hagopian, *Environmental factors in the development of Type 1 diabetes*. Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(3): p. 149-62.
4. Virtanen, S.M. and M. Knip, *Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age*. Am J Clin Nutr, 2003. **78**(6): p. 1053-67.
5. Harrison, B., *Principles of Internal Medicine*: McGraw-Hill Professional Publishing
6. Fauci, A., *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2008.
7. Mehnert H, S.E., Usadel KH, Häring HU *Diabetologie in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag Stuttgart 2003.
8. Ziegler AG, H.M., Scherbaum WA: , *Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ-1 Diabetes*.
9. Galler A, K.T., Stange T, Rothe U, Kunath H, Näke A, Vogel C, Kiess W und, et al., *Epidemiologie des Diabetes mellitus im Kindesalter: Daten aus dem Sächsischen Kinder-Diabetes-Register*. Kinder-und Jugendmedizin ; 4:201-205,, 2005.
10. Rosenbauer, J., et al., *Incidence of childhood Type 1 diabetes mellitus is increasing at all ages in Germany*. Diabetologia, 2002. **45**(3): p. 457-8.
11. Karvonen, M., et al., *Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group*. Diabetes Care, 2000. **23**(10): p. 1516-26.
12. Karvonen, M., et al., *A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group*. Diabetologia, 1993. **36**(10): p. 883-92.
13. *Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999*. Diabet Med, 2006. **23**(8): p. 857-66.
14. Onkamo, P., et al., *Worldwide increase in incidence of Type 1 diabetes--the analysis of the data on published incidence trends*. Diabetologia, 1999. **42**(12): p. 1395-403.
15. *Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group*. Lancet, 2000. **355**(9207): p. 873-6.
16. Eizirik, D.L., M.L. Colli, and F. Ortis, *The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(4): p. 219-26.
17. Schober, E., et al., *Incidence and time trend of type 1 and type 2 diabetes in Austrian children 1999-2007*. J Pediatr, 2009. **155**(2): p. 190-3 e1.
18. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
19. Janeway, *Immunobiology* 2008.
20. Gepts, W., *Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus*. Diabetes, 1965. **14**(10): p. 619-33.

21. Foulis, A.K., et al., *The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom*. Diabetologia, 1986. **29**(5): p. 267-74.
22. Bach, J.F., *Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease*. Endocr Rev, 1994. **15**(4): p. 516-42.
23. Haskins, K. and M. McDuffie, *Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1433-6.
24. Paul, W.E. and R.A. Seder, *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell, 1994. **76**(2): p. 241-51.
25. Tian, J., P.V. Lehmann, and D.L. Kaufman, *Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 2039-43.
26. Liblau, R.S., S.M. Singer, and H.O. McDevitt, *Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 34-8.
27. Katz, J.D., C. Benoist, and D. Mathis, *T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes*. Science, 1995. **268**(5214): p. 1185-8.
28. Naserke, H.E., et al., *Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6963-9.
29. Foulis, A.K. and M.A. Farquharson, *Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing beta-cells in recent-onset type 1 diabetes mellitus*. Diabetes, 1986. **35**(11): p. 1215-24.
30. Foulis, A.K., *Class II major histocompatibility complex and organ specific autoimmunity in man*. J Pathol, 1986. **150**(1): p. 5-11.
31. Knip, M., et al., *Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S125-36.
32. Barnett, A.H., et al., *Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs*. Diabetologia, 1981. **20**(2): p. 87-93.
33. Kaprio, J., et al., *Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland*. Diabetologia, 1992. **35**(11): p. 1060-7.
34. Kyvik, K.O., A. Green, and H. Beck-Nielsen, *Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins*. BMJ, 1995. **311**(7010): p. 913-7.
35. Olmos, P., et al., *The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins*. Diabetologia, 1988. **31**(10): p. 747-50.
36. Pulendran, B. and R. Ahmed, *Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development*. Cell, 2006. **124**(4): p. 849-63.
37. Ranjan, P., et al., *Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity*. Trends Mol Med, 2009. **15**(8): p. 359-68.
38. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
39. Medzhitov, R., *Approaching the asymptote: 20 years later*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 766-75.
40. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
41. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.

42. Brodsky, I.E. and D. Monack, *NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens*. *Semin Immunol*, 2009. **21**(4): p. 199-207.
43. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. *Cell*, 1996. **86**(6): p. 973-83.
44. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. *Nature*, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
45. Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. *Cell*, 1988. **52**(2): p. 269-79.
46. Belvin, M.P. and K.V. Anderson, *A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996. **12**: p. 393-416.
47. Mantovani, A., et al., *Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(6): p. 328-36.
48. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1143**: p. 1-20.
49. Carty, M., et al., *The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(10): p. 1074-81.
50. Beutler, B., *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling*. *Nature*, 2004. **430**(6996): p. 257-63.
51. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(7): p. 499-511.
52. Sun, Y.W., *RIG-I, a Human Homolog Gene of RNA Helicase, is Induced by Retinoic Acid During the Differentiation of Acute Promyelocytic Leukemia Cell*. Shanghai Second Medical University, Shanghai., 1997.
53. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-7.
54. Barral, P.M., et al., *Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity*. *Pharmacol Ther*, 2009. **124**(2): p. 219-34.
55. Huang, F., et al., *Differentiation induction subtraction hybridization (DISH): a strategy for cloning genes displaying differential expression during growth arrest and terminal differentiation*. *Gene*, 1999. **236**(1): p. 125-31.
56. Jiang, H., & Fisher, P. B. , *Use of a sensitive and efficient subtraction hybridization protocol for the identification of genes differentially regulated during the induction of differentiation in human melanoma cells*. *Mol Cell Different* 1(3), 85-299) 1993.
57. Kang, D.C., et al., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(2): p. 637-42.
58. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 19-28.
59. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 2851-8.

60. Gitlin, L., et al., *Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8459-64.
61. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
62. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
63. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
64. Plumet, S., et al., *Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response*. PLoS One, 2007. **2**(3): p. e279.
65. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
66. Liu, S., et al., *IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(2): p. 358-65.
67. Smyth, D.J., et al., *A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 617-9.
68. Todd, J.A., et al., *Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 857-64.
69. Isaacs, A., R.A. Cox, and Z. Rotem, *Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon*. Lancet, 1963. **2**(7299): p. 113-6.
70. Rotem, Z., R.A. Cox, and A. Isaacs, *Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acid*. Nature, 1963. **197**: p. 564-6.
71. Lampson, G.P., et al., *Inducers of interferon and host resistance. I. Double-stranded RNA from extracts of Penicillium funiculosum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(2): p. 782-9.
72. Hornung, V. and E. Latz, *Intracellular DNA recognition*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 123-30.
73. Tokunaga, T., et al., *Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity*. J Natl Cancer Inst, 1984. **72**(4): p. 955-62.
74. Tokunaga, T., et al., *Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of Mycobacterium bovis BCG induce interferons and activate natural killer cells*. Microbiol Immunol, 1992. **36**(1): p. 55-66.
75. Yamamoto, S., et al., *Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 4072-6.
76. Krieg, A.M., et al., *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 546-9.
77. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
78. Fox, B.A., et al., *Lipofection indirectly increases expression of endogenous major histocompatibility complex class I molecules on tumor cells*. Cancer Gene Ther, 1998. **5**(5): p. 307-12.

79. Park, J.H., et al., *Up-regulation of the expression of major histocompatibility complex class I antigens by plasmid DNA transfection in non-hematopoietic cells*. FEBS Lett, 1998. **436**(1): p. 55-60.
80. Okabe, Y., et al., *Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation*. J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1333-9.
81. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 40-8.
82. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 93-103.
83. Jin, L., et al., *MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(16): p. 5014-26.
84. Zhong, B., et al., *The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 538-50.
85. Zhong, B., et al., *The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 397-407.
86. Ishikawa, H. and G.N. Barber, *STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 674-8.
87. Ishikawa, H., Z. Ma, and G.N. Barber, *STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity*. Nature, 2009. **461**(7265): p. 788-92.
88. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
89. Ishii, K.J., et al., *TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines*. Nature, 2008. **451**(7179): p. 725-9.
90. Wang, Z., et al., *Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5477-82.
91. Kumar, H., et al., *Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1795-803.
92. Sun, Q., et al., *The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses*. Immunity, 2006. **24**(5): p. 633-42.
93. Cheng, G., et al., *Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 9035-40.
94. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1065-72.
95. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. Cell, 2009. **138**(3): p. 576-91.
96. Samanta, M., et al., *EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN*. EMBO J, 2006. **25**(18): p. 4207-14.
97. Cerretti, D.P., et al., *Molecular characterization of the gene for human interleukin-1 beta converting enzyme (IL1BC)*. Genomics, 1994. **20**(3): p. 468-73.

98. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
99. Muruve, D.A., et al., *The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 103-7.
100. Hornung, V., et al., *AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 514-8.
101. Fernandes-Alnemri, T., et al., *AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 509-13.
102. Burckstummer, T., et al., *An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome*. Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 266-72.
103. Roberts, T.L., et al., *HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA*. Science, 2009. **323**(5917): p. 1057-60.
104. Unterholzner, L., et al., *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 997-1004.
105. Keating, S.E., M. Baran, and A.G. Bowie, *Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction*. Trends Immunol, 2011. **32**(12): p. 574-81.
106. Choubey, D. and R. Panchanathan, *Interferon-inducible Iff200-family genes in systemic lupus erythematosus*. Immunol Lett, 2008. **119**(1-2): p. 32-41.
107. Kim, T., et al., *Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15181-6.
108. Zhang, X., et al., *Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4541-5.
109. Yang, P., et al., *The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway*. Nat Immunol, 2010. **11**(6): p. 487-94.
110. Baccala, R., et al., *TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 543-51.
111. Zipris, D., *Innate immunity and its role in type 1 diabetes*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2008. **15**(4): p. 326-31.
112. Vives-Pi, M., et al., *Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 208-18.
113. Wen, L., et al., *The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3173-80.
114. Giarratana, N., et al., *A vitamin D analog down-regulates proinflammatory chemokine production by pancreatic islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2280-7.
115. Rasschaert, J., et al., *Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33984-91.
116. Ylipaasto, P., et al., *Global profiling of coxsackievirus- and cytokine-induced gene expression in human pancreatic islets*. Diabetologia, 2005. **48**(8): p. 1510-22.

117. Hultcrantz, M., et al., *Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cells*. *Virology*, 2007. **367**(1): p. 92-101.
118. Liu, D., M. Darville, and D.L. Eizirik, *Double-stranded ribonucleic acid (RNA) induces beta-cell Fas messenger RNA expression and increases cytokine-induced beta-cell apoptosis*. *Endocrinology*, 2001. **142**(6): p. 2593-9.
119. Liu, D., et al., *Double-stranded RNA cooperates with interferon-gamma and IL-1 beta to induce both chemokine expression and nuclear factor-kappa B-dependent apoptosis in pancreatic beta-cells: potential mechanisms for viral-induced insulinitis and beta-cell death in type 1 diabetes mellitus*. *Endocrinology*, 2002. **143**(4): p. 1225-34.
120. Dogusan, Z., et al., *Double-stranded RNA induces pancreatic beta-cell apoptosis by activation of the toll-like receptor 3 and interferon regulatory factor 3 pathways*. *Diabetes*, 2008. **57**(5): p. 1236-45.
121. Guillot, L., et al., *Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(7): p. 5571-80.
122. Loo, Y.M., et al., *Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity*. *J Virol*, 2008. **82**(1): p. 335-45.
123. Foulis, A.K., M.A. Farquharson, and A. Meager, *Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus*. *Lancet*, 1987. **2**(8573): p. 1423-7.
124. Devendra, D., et al., *Interferon-alpha as a mediator of polyinosinic:polycytidylic acid-induced type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(9): p. 2549-56.
125. Lang, K.S., et al., *Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease*. *Nat Med*, 2005. **11**(2): p. 138-45.
126. Rasschaert, J., et al., *Global profiling of double stranded RNA- and IFN-gamma-induced genes in rat pancreatic beta cells*. *Diabetologia*, 2003. **46**(12): p. 1641-57.
127. Drescher, K.M. and S.M. Tracy, *The CVB and etiology of type 1 diabetes*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008. **323**: p. 259-74.
128. Dotta, F., et al., *Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(12): p. 5115-20.
129. Christen, U., et al., *A viral epitope that mimics a self antigen can accelerate but not initiate autoimmune diabetes*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(9): p. 1290-8.
130. Filippi, C.M. and M.G. von Herrath, *Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons*. *Diabetes*, 2008. **57**(11): p. 2863-71.
131. Kim, H.S., et al., *Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes*. *Immunity*, 2007. **27**(2): p. 321-33.
132. Goldberg, A., et al., *Toll-like receptor 4 suppression leads to islet allograft survival*. *FASEB J*, 2007. **21**(11): p. 2840-8.
133. Wen, L., et al., *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes*. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1109-13.
134. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 610-21.
135. Arimilli, S., et al., *Chemokines in autoimmune diseases*. *Immunol Rev*, 2000. **177**: p. 43-51.
136. Eizirik, D.L., et al., *Use of microarray analysis to unveil transcription factor and gene networks contributing to Beta cell dysfunction and apoptosis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **1005**: p. 55-74.

137. Shimada, A., et al., *Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2001. **24**(3): p. 510-5.
138. Nicoletti, F., et al., *Serum concentrations of the interferon-gamma-inducible chemokine IP-10/CXCL10 are augmented in both newly diagnosed Type 1 diabetes mellitus patients and subjects at risk of developing the disease*. Diabetologia, 2002. **45**(8): p. 1107-10.
139. Hanifi-Moghaddam, P., et al., *Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus*. Diabet Med, 2006. **23**(2): p. 156-63.
140. Pflieger, C., et al., *Relation of circulating concentrations of chemokine receptor CCR5 ligands to C-peptide, proinsulin and HbA1c and disease progression in type 1 diabetes*. Clin Immunol, 2008. **128**(1): p. 57-65.
141. Wang, X., et al., *Identification of a molecular signature in human type 1 diabetes mellitus using serum and functional genomics*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1929-37.
142. Chen, M.C., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells*. Diabetologia, 2001. **44**(3): p. 325-32.
143. Cardozo, A.K., et al., *IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice*. Diabetologia, 2003. **46**(2): p. 255-66.
144. Martin, A.P., et al., *Islet expression of M3 uncovers a key role for chemokines in the development and recruitment of diabetogenic cells in NOD mice*. Diabetes, 2008. **57**(2): p. 387-94.
145. Martin, A.P., et al., *Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(11): p. 3025-33.
146. Eizirik, D.L. and T. Mandrup-Poulsen, *A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis*. Diabetologia, 2001. **44**(12): p. 2115-33.
147. Cameron, M.J., et al., *Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type 1 diabetes*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 1102-10.
148. Bradley, L.M., et al., *Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2511-20.
149. Cardozo, A.K., et al., *Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 909-20.
150. Gysemans, C.A., et al., *Dual role of interferon-gamma signalling pathway in sensitivity of pancreatic beta cells to immune destruction*. Diabetologia, 2001. **44**(5): p. 567-74.
151. Cardozo, A.K., et al., *A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48879-86.
152. Eldor, R., et al., *Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5072-7.
153. Gysemans, C.A., et al., *Disruption of the gamma-interferon signaling pathway at the level of signal transducer and activator of transcription-1 prevents immune destruction of beta-cells*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2396-403.

154. Callewaert, H.I., et al., *Deletion of STAT-1 pancreatic islets protects against streptozotocin-induced diabetes and early graft failure but not against late rejection*. *Diabetes*, 2007. **56**(8): p. 2169-73.
155. Eizirik, D.L., et al., *Use of a systems biology approach to understand pancreatic beta-cell death in Type 1 diabetes*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 3): p. 321-7.
156. Filippi, C.M. and M.G. von Herrath, *Islet beta-cell death - fuel to sustain autoimmunity?* *Immunity*, 2007. **27**(2): p. 183-5.
157. Liadis, N., et al., *Caspase-3-dependent beta-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(9): p. 3620-9.
158. Cardozo, A.K., et al., *Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca²⁺ ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells*. *Diabetes*, 2005. **54**(2): p. 452-61.
159. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(1): p. 42-61.
160. Albert, M.L., *Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?* *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(3): p. 223-31.
161. Blachere, N.E., R.B. Darnell, and M.L. Albert, *Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation*. *PLoS Biol*, 2005. **3**(6): p. e185.
162. Scheuner, D. and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(3): p. 317-33.
163. Kent, S.C., et al., *Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope*. *Nature*, 2005. **435**(7039): p. 224-8.
164. Nakayama, M., et al., *Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice*. *Nature*, 2005. **435**(7039): p. 220-3.
165. Wong, F.S., et al., *Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library*. *Nat Med*, 1999. **5**(9): p. 1026-31.
166. Skowera, A., et al., *CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(10): p. 3390-402.
167. Klinke, D.J., 2nd, *Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus*. *PLoS One*, 2008. **3**(1): p. e1374.
168. Steele, C., et al., *Insulin secretion in type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53**(2): p. 426-33.
169. Strandell, E., D.L. Eizirik, and S. Sandler, *Reversal of beta-cell suppression in vitro in pancreatic islets isolated from nonobese diabetic mice during the phase preceding insulin-dependent diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(6): p. 1944-50.
170. Strandell, E., et al., *Role of infiltrating T cells for impaired glucose metabolism in pancreatic islets isolated from non-obese diabetic mice*. *Diabetologia*, 1992. **35**(10): p. 924-31.
171. Marchetti, P., et al., *Function of pancreatic islets isolated from a type 1 diabetic patient*. *Diabetes Care*, 2000. **23**(5): p. 701-3.

172. Koulmanda, M., et al., *Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13074-9.
173. Sarvetnick, N.E. and D. Gu, *Regeneration of pancreatic endocrine cells in interferon-gamma transgenic mice*. Adv Exp Med Biol, 1992. **321**: p. 85-9; discussion 91-3.
174. Sreenan, S., et al., *Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse*. Diabetes, 1999. **48**(5): p. 989-96.
175. Sherry, N.A., et al., *Effects of autoimmunity and immune therapy on beta-cell turnover in type 1 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3238-45.
176. Ablamunits, V., et al., *Autoimmunity and beta cell regeneration in mouse and human type 1 diabetes: the peace is not enough*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1103**: p. 19-32.
177. Darville, M.I. and D.L. Eizirik, *Notch signaling: a mediator of beta-cell de-differentiation in diabetes?* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(4): p. 1063-8.
178. Kutlu, B., et al., *Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells*. Diabetes, 2003. **52**(11): p. 2701-19.
179. Eizirik, D.L., S. Sandler, and J.P. Palmer, *Repair of pancreatic beta-cells. A relevant phenomenon in early IDDM?* Diabetes, 1993. **42**(10): p. 1383-91.
180. In't Veld, P., et al., *Screening for insulinitis in adult autoantibody-positive organ donors*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2400-4.
181. Harrison, L.C., et al., *Type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases?* J Autoimmun, 2008. **31**(3): p. 306-10.
182. Leist, M. and M. Jaattela, *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 589-98.
183. Strasser, A., *The role of BH3-only proteins in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 189-200.
184. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family: regulators of cell death*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 395-419.
185. Zamzami, N., et al., *Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins*. Oncogene, 1998. **16**(17): p. 2265-82.
186. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
187. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
188. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
189. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 683-94.
190. Kelekar, A. and C.B. Thompson, *Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis*. Trends Cell Biol, 1998. **8**(8): p. 324-30.
191. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
192. Shibue, T., et al., *Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2233-8.

193. Attardi, L.D. and R.A. DePinho, *Conquering the complexity of p53*. Nat Genet, 2004. **36**(1): p. 7-8.
194. ; Available from: <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>.
195. Nairn, C., et al., *Enterovirus variants in the serum of children at the onset of Type 1 diabetes mellitus*. Diabet Med, 1999. **16**(6): p. 509-13.
196. Richardson, S.J., et al., *The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes*. Diabetologia, 2009. **52**(6): p. 1143-51.
197. Gillespie, K.M., *Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention*. CMAJ, 2006. **175**(2): p. 165-70.
198. Garcia, M., et al., *Regulation and function of the cytosolic viral RNA sensor RIG-I in pancreatic beta cells*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(11): p. 1768-75.
199. Honeyman, M., *How robust is the evidence for viruses in the induction of type 1 diabetes?* Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 616-23.
200. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
201. Heitmeier, M.R., A.L. Scarim, and J.A. Corbett, *Double-stranded RNA inhibits beta-cell function and induces islet damage by stimulating beta-cell production of nitric oxide*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12531-6.
202. Sobel, D.O., et al., *Poly I:C induces development of diabetes mellitus in BB rat*. Diabetes, 1992. **41**(4): p. 515-20.
203. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
204. Pei, D., et al., *Effect of influenza A virus non-structural protein 1(NS1) on a mouse model of diabetes mellitus induced by Streptozotocin*. Biochem Biophys Res Commun, 2012.
205. Hugues, S., et al., *Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 169-81.
206. Unwin, N., D. Gan, and D. Whiting, *The IDF Diabetes Atlas: providing evidence, raising awareness and promoting action*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(1): p. 2-3.
207. Gallagher, M.P., R.S. Goland, and C.J. Greenbaum, *Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1243**: p. 119-34.
208. Greenbaum, C.J., *Type 1 diabetes intervention trials: what have we learned? A critical review of selected intervention trials*. Clin Immunol, 2002. **104**(2): p. 97-104.
209. Harrison, L.C., *Vaccination against self to prevent autoimmune disease: the type 1 diabetes model*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(2): p. 139-45.
210. Herold, K.C., et al., *Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1692-8.
211. Pescovitz, M.D., et al., *Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function*. N Engl J Med, 2009. **361**(22): p. 2143-52.

Abkürzungsverzeichnis

2-ME	β -Mercapto Ethanol
5`pppRNA	5` Triphosphat RNA
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
APAF-1	<i>apoptotic-protease-activating factor 1</i>
ASC	<i>apoptosis-related speck-like Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATG	Gen, welches das " <i>autophagy-related protein 12</i> " codiert
ATP	Adenosin Triphosphat
BB-Ratten	<i>biobreeding rat</i>
BCL-2	<i>B-Cell lymphoma 2</i>
BH	<i>BCL-2 Homology Domain</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BZ	Blutzucker
dsRNA	<i>double stranded</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
Cardif	<i>CARD adaptor inducing Interferon-β</i>
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CCR	<i>chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CTD	C-terminale Domäne
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10</i>
DAI	DNA-abhängiger Aktivator von IRFs
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DISH	<i>Differentiation Induction Substraction Hybridisation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonukleic Acid</i>
dNTP	<i>2`deoxynucleoside 5`triphosphate</i>

DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)Propyl]-N,N,N-Trimethylammonium Methyl-Sulfat
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>emitting chemiluminescence reagent</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMCV	<i>encephalomyocarditis virus</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FasL	<i>Fas Death Receptor Ligand</i>
FasR	<i>Fas Death Receptor</i>
FCS	Fötales Bovines Serum
FITC	<i>Fluoresce-iniso-thio-cyanat</i>
h	Stunde
HBSS	<i>Hank´s Buffered Salt Solution</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFI16	<i>Interferon-inducible protein 16</i>
IFIH1	<i>Interferon induces with Helicase C domain 1</i> (Synonym MDA5)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor κ-B kinase</i>
IKK ϵ /i	<i>inhibitor of nuclear factor κ-B kinase ϵ/i</i>
IPS-1	IFN-Beta Promotor Stimulator (siehe auch "MAVS")
IRAK	<i>Interleukin-1 Receptor Associated Kinases</i>
IRF	<i>Interleukin Releasing Faktor</i>
ISD	IFN-stimulatory DNA
ISG	Gen, welches das " <i>Interferon-induced 17 kDa protein</i> " codiert
JAK	Janus-aktivierte Kinase
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid

mA	<i>Milliampere</i>
Mal	<i>MyD88 adaptor-like protein</i> (siehe "Tirap")
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling</i>
MD2	<i>Myeloides Differentiation Protein 2</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation Gene 5</i>
mDC	<i>Myeloide dendritische Zellen</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MHC	<i>Major-histocompatibility-complex</i>
Min	<i>Minute</i>
mg	<i>Milligramm</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure</i>
mRNA	<i>Messenger Ribo Nukleic Acid</i>
MTLA	<i>Medizinisch Technischer Labor Assistent</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
µl	<i>Mikroliter</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural Killer Cells</i>
NLR	<i>NOD-like Rezeptoren</i>
NLRP	<i>nucleotide-binding oligomerization domain leucin-rich repeat and pyrin domain containing protein</i>
NLRX1	<i>a highly conserved nucleotide-binding domain (NBD)- and leucine-rich-repeat (LRR) containing Protein</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NOD-Mice	<i>Non-obese diabetic Mice</i>
NOXA	<i>Latein: "Schaden" (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
NTC	<i>Non template Control</i>
dNTP	<i>Desoxyribo-Nukleosidtriphosphat</i>
P38	<i>P38 mitogen-activated protein kinases</i>

PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered-saline</i> , Phosphat-gepuff. Kochsalz
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDC	plasmazytoide Dendritische Zellen
PKR	RNA-aktivierte Protein Kinase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PS	Penicillin-Streptomycin
ppp	Triphosphat
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RCF	Relative Zentrifugalkraft
RD	Repressor Domänen
RIG-I	<i>Retinoic Inducible Gene 1</i>
RIP 1	<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 1</i>
RLR	<i>RIG-I-like</i> Rezeptoren
RLT	RNeasy <i>Lysis Buffer</i> (Fa. Quiagen)
RNA	<i>Ribo Nukleic Acid</i>
RNF125	Gen welches die "E3 ubiquitin-protein ligase RNF125" codiert
RPM	Rotationen pro Minute
RT	Raum Temperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
SARM	Selektiver Androgenrezeptor Modulator
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SDS	Na-Dodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
STING	<i>Stimulator of IFN Genes</i>
STZ	Streptozotosin
T1H	T1 Helper Zellen
TBK1	Serine/threonine-protein kinase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>

TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRADD	<i>TNF-Receptor1-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>Tumor Necrosis Factor receptor associated factors</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TNF receptor-inhibitory factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
IU	<i>International Units</i>
V	Volt
VISA	<i>Virus-induced signaling adaptor</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WHO	<i>World-health organisation, Weltgesundheitsorganisation</i>
ZBP1	<i>Z-DNA-binding protein 1</i>
Z-VAD	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon

Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders. Durch ihn wurde mir eine aufregende und hochinteressante Forschungsarbeit zum Erwerb des Doktorgrades ermöglicht. Einerseits war Herr Prof. Anders – immer für mich da, wenn ich ihn brauchte, um den roten Faden in meiner Arbeit wiederzufinden und mir zu helfen, wenn ich mit meiner Forschung in einer Sackgasse stand, andererseits war immer dafür gesorgt, dass es mir im Labor nie an Reagentien und anderen kostspieligen Utensilien fehlte. Ich möchte mich ganz herzlich für seine starke Förderung, auch in Verbindung mit seinem Antrag, mich in das GraduiertenKolleg aufzunehmen, bedanken.

Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau Dr. J. Lichtnekert, die es trotz ihrer klinischen Tätigkeit schaffte, mich in meiner Doktorarbeit zu begleiten.

Ganz herzlich möchte ich Herrn Dr. rer. biol. hum. M. Lech für seine Hilfe im Labor danken.

Ich möchte mich auch bei Frau Heni Eka Susanti bedanken, die mir bei der Mauszucht half und mir auch sonst in den kleinen Fragen des Labors beistand.

Gleichermaßen danke ich auch Ewa Radomska, Dan Draganovic und der ganzen Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und für die nette Atmosphäre, welche ich während meiner Tätigkeit im Labor erleben durfte.

Mein Dank gilt auch dem DFG, welcher mich in das Graduierten Kolleg 1202 aufnahm und mich wissenschaftlich sowie finanziell unterstützte.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die immer versucht haben Aufgaben und Sorgen zu übernehmen, wenn ich das Gefühl hatte, dass diese mich erdrücken. Danken möchte ich auch denen, die meine Dissertation korrekturgelesen haben.