

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Antivirale Immunantwort und Virus-induzierte Apoptose
von Insulin-produzierenden
Zellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephanie Saskia Käser

aus München

2014

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

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

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Martin Füchtenbusch

PD Dr. rer. biol. hum. habil. Wolfgang Erl

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

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2014

Eidesstattliche Versicherung

Käser, Stephanie Saskia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Antivirale Immunantwort und Virus-induzierte Apoptose von Insulin-produzierenden Zellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.08.2014

Stephanie Saskia Käser

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Diabetes mellitus Typ 1	8
1.1.1	Geschichte, Definition, Inzidenz und Folgeerkrankungen des Typ 1 Diabetes	8
1.1.2	Virale Pathogenese und Pathologie des Typ 1 Diabetes	13
1.2	Innates Immunsystem	15
1.2.1	Erkennung von dsRNA	16
1.2.2	Erkennung von dsDNA	18
1.2.3	Typ 1 Diabetes, innates Immunsystem, Interferone und Interferon-induzierte Gene	22
1.3	Apoptose	28
1.3.1	Intrinsischer Weg der Apoptose	30
1.3.2	Extrinsischer Weg der Apoptose	31
1.3.3	Apoptose und Beta-Zellen	33
1.4	Charakterisierung der Insulin-produzierenden MIN6- und INS-1-Zellen	35
1.5	Ziel und Hypothese	36
2	Material und Methoden	38
2.1	Material	38
2.1.1	Geräte	38
2.1.2	Chemikalien und Material für die Zellkultur	39
2.1.3	Zelllinien	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	41
2.2.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen	42
2.2.3	Stimulationsexperimente	42
2.2.4	TUNEL-Färbung	44
2.2.5	Western Blot	45
2.2.6	Durchflusszytometrie	52
2.2.7	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	54
2.2.8	Quantitative <i>real time</i> PCR (qRT-PCR)	56
2.2.9	Statistische Auswertung	62

3	Ergebnisse	64
3.1	Effekte von poly(dA:dT) auf MIN6-Zellen	64
3.1.1	Poly(dA:dT) induziert die Expression von zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren in MIN6-Zellen	64
3.1.2	Poly(dA:dT) induziert die Expression von Typ I-Interferon IFN- β und Typ I-Interferon-induzierten Genen in MIN6-Zellen	65
3.1.3	Poly(dA:dT) induziert die Expression von Chemokin CXCL10 in MIN6-Zellen	68
3.2	Effekte von poly(dA:dT) auf INS-1-Zellen	69
3.2.1	Poly(dA:dT) induziert die Expression des zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptors RIG-I in INS-1-Zellen	69
3.2.2	Poly(dA:dT) induziert die Expression von Typ I-Interferon IFN- β und Typ I-Interferon-induzierten Genen in INS-1-Zellen	70
3.2.3	Poly(dA:dT) induziert die Expression von Chemokin CXCL10 in INS-1-Zellen	73
3.3	Poly(dA:dT) führt zu Apoptose in MIN6-Zellen	74
3.4	Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 8 in MIN6-Zellen	76
3.5	Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 9 in MIN6-Zellen	78
3.6	Poly(dA:dT) führt in MIN6-Zellen zu früher und später Apoptose	81
3.7	Caspase 8-Inhibitor und Caspase 9-Inhibitor hemmen die durch poly(dA:dT) ausgelöste Apoptose in MIN6-Zellen	82
3.8	Poly(dA:dT) aktiviert die pro-apoptotischen Gene Puma und Noxa in MIN6-Zellen	84
4	Diskussion	88
4.1	Bedeutung des innate Immunsystems in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes	88
4.2	Effekte der dsDNA-Erkennung in MIN6- und INS-1-Zellen	91
4.3	Bedeutung der Apoptose in MIN6-Zellen	94
4.4	Limitationen der experimentellen Strategie	97
4.5	Klinische Bedeutung für den Typ 1 Diabetes	98
5	Zusammenfassung	102
6	Veröffentlichungen	104
7	Literaturverzeichnis	105
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	116
9	Verzeichnis der Abkürzungen	120
10	Danksagung	128

Vorbemerkungen:

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2010 bis Oktober 2011 in den Forschungslabors der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit von Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders und Frau Dr. med. Julia Lichtnekert.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität, München unterstützt.

Kapitel 1: Einleitung

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus Typ 1

1.1.1 Geschichte, Definition, Inzidenz und Folgeerkrankungen des Typ 1 Diabetes

Aretaios von Kappadokien erwähnte im Jahre 100 n. Chr. erstmals den Diabetes mellitus als eine Krankheit mit starkem Durstempfinden und gesteigertem Harnfluss. Der Begriff „Diabetes“ kommt aus dem altgriechischen *διαβειν* und bedeutet durchfließen; das altgriechische Adjektiv *μελιτος* heißt honigsüß [1]. Paracelsus nahm im 16. Jahrhundert an, dass der Diabetes mellitus eine Stoffwechselkrankheit sei [2]. Adolf Kussmaul beschrieb Ende des 19. Jahrhunderts das diabetische Koma mit Bewusstlosigkeit, Apathie und tiefer Atmung. Bei der Diagnostik der diabetischen Ketoazidose im Rahmen einer Erstmanifestation des Typ 1 Diabetes spielt noch heute die „Kussmaul-Atmung“ eine wichtige Rolle [3]. Paul Langerhans entdeckte 1869 im Rahmen seiner Dissertation die Inselzellen in der Bauchspeicheldrüse, die später auch nach ihm benannt wurden [4]. 1889 erkannten Oskar Minkowski und Josef von Mehring den Zusammenhang zwischen der gestörten Funktion des Pankreas und dem Diabetes [5]. Frederick G. Banting und Charles H. Best isolierten aus Inselzellen des Pankreas von Kälbern und Rindern einen Extrakt, den sie zunächst am Typ 1 Diabetes erkrankten Hunden tierexperimentell intravenös oder subkutan injizierten. Dabei stellten sie fest, dass sich der Blutglukosespiegel normalisierte und keine Glukosurie mehr nachweisbar war. Auf Grund dieser Erkenntnisse injizierten sie den Extrakt auch am Menschen. In einem *Case Report* von 1922 beschrieben sie die Behandlung mit dem Extrakt im *Toronto General Hospital* bei einem 14-jährigen Jungen mit diabetischer Ketoazidose. Dabei registrierten sie einen Rückgang der Ketoazidose und eine Verbesserung des Gesundheitszustandes des Patienten [6]. Für die Entdeckung des Insulins erhielten Frederick G. Banting und Charles H. Best 1923 den Nobelpreis für Medizin [7,8].

Im Jahr 1998 teilte die WHO (*World Health Organization*), die ADA (*American Diabetes Association*) und die DDG (Deutsche Diabetes Gesellschaft) den Diabetes mellitus in vier Kategorien ein: Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes, andere spezifische Diabetes-Typen (A-H, Erkrankungen des exokrinen Pankreas) und Gestationsdiabetes [9].

Laut Statistischem Bundesamt lebten im Jahr 2010 19,9 Millionen 0-25 Jahre alte Kinder und junge Erwachsene in Deutschland [10]. Laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes sind 0,14 % der 0-25-Jährigen in Deutschland vom Typ 1 Diabetes betroffen [11]. Somit waren in Deutschland im Jahr 2010 ca. 28 000 Kinder und Jugendliche am Typ 1 Diabetes erkrankt. Typ 1

Diabetes mellitus stellt damit die häufigste Stoffwechselerkrankung im Kindes- und Jugendalter in Deutschland dar.

Typ 1 Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung, die meist im Kindesalter beginnt und für die bis heute keine kurative Therapie existiert [12]. Es handelt sich um eine T-Zell-vermittelte Erkrankung, welche durch den progressiven und selektiven Verlust von Insulin-produzierenden Zellen charakterisiert ist [13]. Wenn 80-90 % der Insulin-produzierenden Zellen zerstört sind, kommt es zur klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes. Erstsymptome des Typ 1 Diabetes sind Polyurie und Polydipsie, Gewichtsverlust und Polyphagie. Der resultierende absolute Insulinmangel führt zu einer gestörten Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettzelle. Es kommt zur Hyperglykämie, zum zellulären Insulinmangel mit Lipolyse und daher resultierender Ketoazidose, die im letalen *Coma diabeticum* enden kann. Ketoazidose bedeutet die Bildung von Ketonkörpern und die Verschiebung des pH-Wertes. Der Fettabbau in der Leber führt durch die Synthese von Ketonkörpern wie 3-Hydroxybutyrat und Acetoacetat zur diabetischen Ketoazidose. Kennzeichnend sind der süßliche Acetongeruch und die „Kussmaul-Atmung“. Weitere Auswirkungen des Insulinmangels sind Elektrolytverlust, Hyperosmolarität und Glukosurie. Der Typ 1 Diabetes ist häufig mit weiteren Autoimmunerkrankungen wie der Hashimoto Thyreoiditis in 4-25 %, der Zöliakie in 1-4 %, der perniziösen Anämie in 2-4 % oder dem Morbus Addison in 0,5 % assoziiert [14]. Im Gegensatz zu den meisten Autoimmunerkrankungen ist die Inzidenz des Typ 1 Diabetes bei Männern zwischen 25-29 Jahre höher als bei gleichaltrigen Frauen [12].

Die Inzidenz des Typ 1 Diabetes stieg in den letzten Jahren weltweit an. Vor allem die nordeuropäischen Staaten wie Finnland, Schweden und Norwegen, ebenso wie Großbritannien und der nordamerikanische Raum sind von der steigenden Prävalenz des Typ 1 Diabetes betroffen. Weltweit hat Finnland die höchste Inzidenzrate von 40,9 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern pro Jahr (Abbildung 1 und 2) [15]. Vor allem sind Kinder unter 5 Jahre von der steigenden Inzidenz des Typ 1 Diabetes betroffen. In Finnland liegt die Inzidenzrate bei Kindern zwischen 0-4 Jahre bei 4,7 % [16].

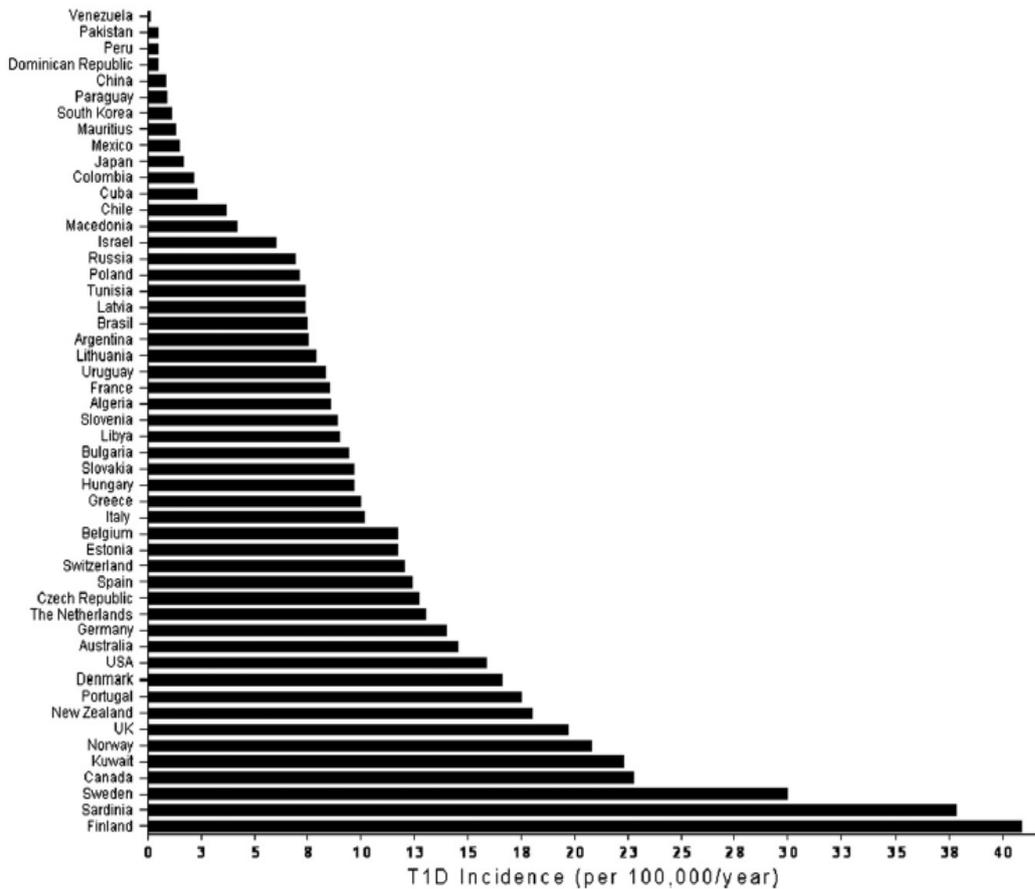


Abbildung 1: Inzidenz des Typ 1 Diabetes bei Kindern unter 14 Jahre (pro 100 000 Einwohner pro Jahr). Finnland hat die höchste Inzidenz mit 40,9 Neuerkrankungen pro Jahr. Sardinien liegt mit 37,8 Neuerkrankungen pro Jahr an zweiter Stelle. Es folgen Schweden und Canada. Deutschland hat die höchste Inzidenzrate aller Mitteleuropäischen Staaten [15] [17].

Weltweit kommt es zu 70 000 Neuerkrankungen pro Jahr, was einer jährlichen Steigerungsrate von 3 % entspricht. Laut einer Studie der *International Diabetes Federation* waren im Jahr 2006 weltweit 440 000 Kinder im Alter von 0-14 Jahren am Typ 1 Diabetes erkrankt. In Finnland hat sich die Inzidenzrate von 1980 bis 2005 verdoppelt [15].

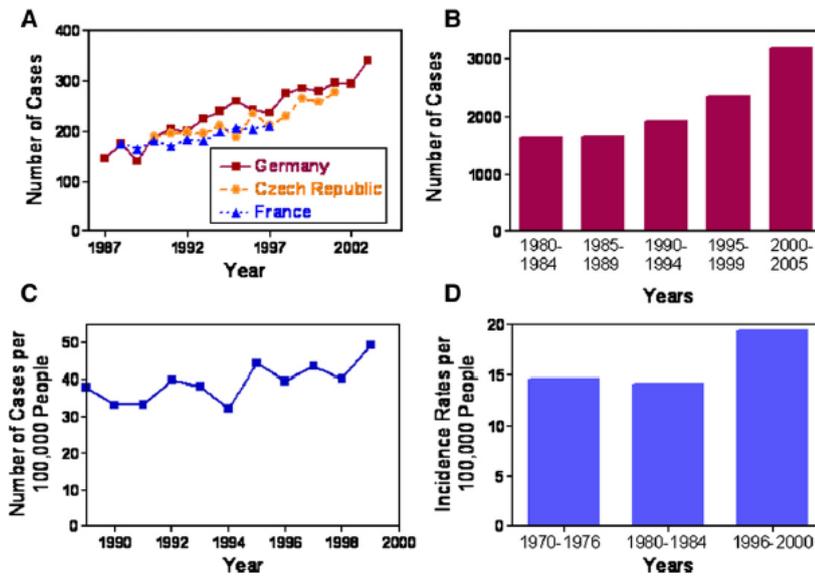


Abbildung 2: Trend der Inzidenzraten in Europa bei Kindern von 0-14 Jahren. A: In Deutschland stieg im Vergleich mit Frankreich und der Tschechischen Republik die Inzidenzrate des Typ 1 Diabetes von 1987 bis 2002 etwas steiler an. B: Die Anzahl der an Typ 1 Diabetes erkrankten Kinder in Finnland verdoppelte sich von 1980 bis 2005. C: Die Anzahl der Fälle von an Typ 1 Diabetes erkrankten Kindern erhöhte sich in Sardinien von 1990 bis 2000 um 10 neue Erkrankungsfälle pro 100 000 Einwohner. D: Die Inzidenzrate des Typ 1 Diabetes bei dänischen Kindern stieg von 1970 bis 2000 pro 100 000 Einwohner um ca. 25 % an [15].

Auf Grund der steigenden Prävalenz und Inzidenz sowie der Folgeerkrankungen des Typ 1 Diabetes stellt diese Erkrankung eine große medizinische und sozioökonomische Herausforderung dar.

Die Folgeerkrankungen der diabetischen Mikroangiopathie sind die diabetische Nephropathie, die diabetische Retinopathie und die diabetische Neuropathie. Sie entstehen durch die Schädigung der kleinen Gefäße in Niere, Retina und Axonen.

Nach einer Krankheitsdauer von 15-20 Jahren erkranken 15-40 % der Typ 1 Diabetiker an einer diabetischen Nephropathie [18]. Hauptursache für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz ist die diabetische Nephropathie. 3 % der Patienten mit terminalem Nierenversagen und daher eingeleiteter Nierenersatztherapie sind Typ 1 Diabetiker [19].

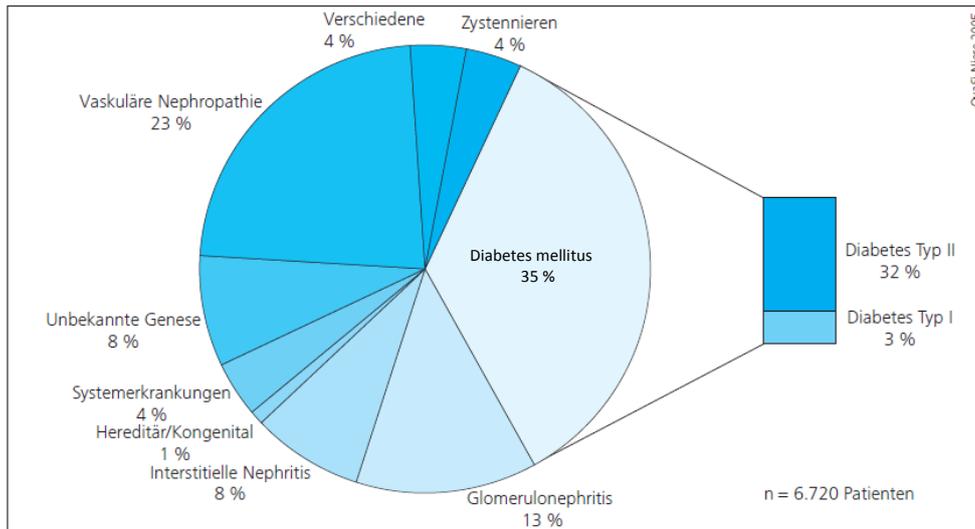


Abbildung 3: Diagnosen bei Beginn der Nierenersatztherapie. Die Graphik aus dem QUASI-Niere-Bericht von 2005 zeigt alle Ursachen für den Beginn einer Dialysetherapie. Hauptursache für die Nierenersatztherapie stellt der Diabetes mellitus mit 35 % dar. Der Typ 1 Diabetes macht davon 3 % aus [19].

Die diabetische Retinopathie zeichnet sich durch die Bildung von abnormen Gefäßen, Einblutungen und der Entwicklung des Maculaödems aus. Die diabetische Retinopathie tritt bei nahezu allen Typ 1 Diabetikern nach 20-jähriger Krankheit auf [20].

7-57 % aller Typ 1 Diabetiker entwickeln eine Schädigung der *Vasa nervorum*. Die klinische Manifestation der Neuropathie ist eine Rarität bei Kindern und zeigt sich gewöhnlich erst im späteren Erwachsenenalter. Charakteristisch sind Parästhesien, verminderte Thermo-sensibilität sowie reduziertes Schmerzempfinden. Im Rahmen der autonomen Neuropathie kommt es zur Störung der Funktion innerer Organe wie Darm und Blase. Entmarkung und axonale Schädigung charakterisieren die Polyneuropathie histologisch [21].

Neben der diabetischen Mikroangiopathie ist die diabetische Makroangiopathie eine weitere Folge der Stoffwechselerkrankung. Arterieller Hypertonus sowie Dyslipoproteinämie verstärken die Ablagerung arteriosklerotischer Plaques an den Gefäßen [22]. Die Mortalität und Morbidität der Typ 1 Diabetiker mit kardiovaskulären Folgeerkrankungen im Rahmen der Makroangiopathie hat sich in den letzten Jahren verdoppelt bis vervierfacht [22] [23]. In einer Kohortenstudie mit 23 571 Patienten mit Typ 1 Diabetes fanden Laing et al. 2003 heraus, dass vor allem bei jungen weiblichen Typ 1 Diabetikern das Risiko der Mortalität in Folge der kardiovaskulären Erkrankungen hoch ist. 20-29-jährige Typ 1 Diabetikerinnen hatten ein 45-fach höheres Risiko an einer ischämischen Herzerkrankung zu sterben als ihre gesunden Gleichaltrigen [24]. Die Mortalität des Typ 1 Diabetes durch kardiovaskuläre Folge-

erkrankungen ist derzeit höher als die Mortalität in Folge der diabetischen Nephropathie [22] [25].

1.1.2 Virale Pathogenese und Pathologie des Typ 1 Diabetes

Typ 1 Diabetes ist eine multifaktorielle Erkrankung. Vor allem Genetik und Umweltfaktoren wie Viren spielen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine Rolle.

20 % der Typ 1 Diabetiker haben eine positive Familienanamnese und 30-50 % exprimieren die HLA-DR3/DR4 und HLA-DQB1 02/03 Assoziation [26]. Dieser Gen-Lokus, den man in ca. 45 % der Typ 1 Diabetiker fand, wurde auf der MHC-Klasse-II-Region des Chromosom 6p21 (IDDM1) festgestellt [27,28]. Der Vererbungsmodus des Typ 1 Diabetes ist jedoch unbekannt. Bei eineiigen Zwillingen sind nur in 30-50 % beide Zwillinge vom Typ 1 Diabetes betroffen. Daher scheinen zusätzlich zu den genetischen Aspekten exogene Ursachen wie virale Infektionen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine Rolle zu spielen [15]. Die Inzidenzrate des Typ 1 Diabetes ist zu hoch, um die Ursache alleine durch genetische Aspekte zu erklären [29]. Es ist unwahrscheinlich, dass sich diejenigen Gene, welche in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine Rolle spielen, in einem Zeitraum von nur 50 Jahren verändert haben. Eine mögliche Erklärung für die hohe Inzidenzrate des Typ 1 Diabetes besteht darin, dass sich die Gene von Niedrig- auf Hochrisikogene verändert haben und zwar auf Grund von Veränderungen in der Umwelt [15]. Viren [30] oder Nahrungsbestandteile wie Kuhmilchproteine oder Gluten [31], erhöhtes Alter der Mutter bei der Geburt [32] und Toxine [33] werden in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes diskutiert. Die Inzidenz des Typ 1 Diabetes ist in den industrialisierten Ländern weitaus höher als in den Entwicklungsländern. Diese Beobachtung führte zur Hygiene-Hypothese [34]: Es könnte sein, dass die reduzierte Konfrontation mit Infektionen in den industrialisierten Ländern zu einer erhöhten Inzidenz von Autoimmunerkrankungen wie dem Diabetes Typ 1 führt [35-37].

In der vorliegenden Studie wurde die virale Pathogenese des Typ 1 Diabetes untersucht. Typ 1 Diabetes ist eine chronische Erkrankung, welche durch den progressiven und selektiven Verlust von Beta-Zellen im Pankreas über die Rekrutierung von autoreaktiven T-Zellen und pro-inflammatorischen Makrophagen gekennzeichnet ist [38]. Es kommt zur Zerstörung der Insulin-produzierenden Beta-Zellen durch einen Entzündungsprozess, welcher als Autoimmun-insulitis bezeichnet wird. Die Beta-Zellen des Pankreas sind nicht mehr in der Lage Insulin zu produzieren. Bei Diagnosestellung enthalten die meisten Langerhansschen Inseln keine Insulin-produzierenden Beta-Zellen mehr. Meist besteht eine lymphozytäre Infiltration.

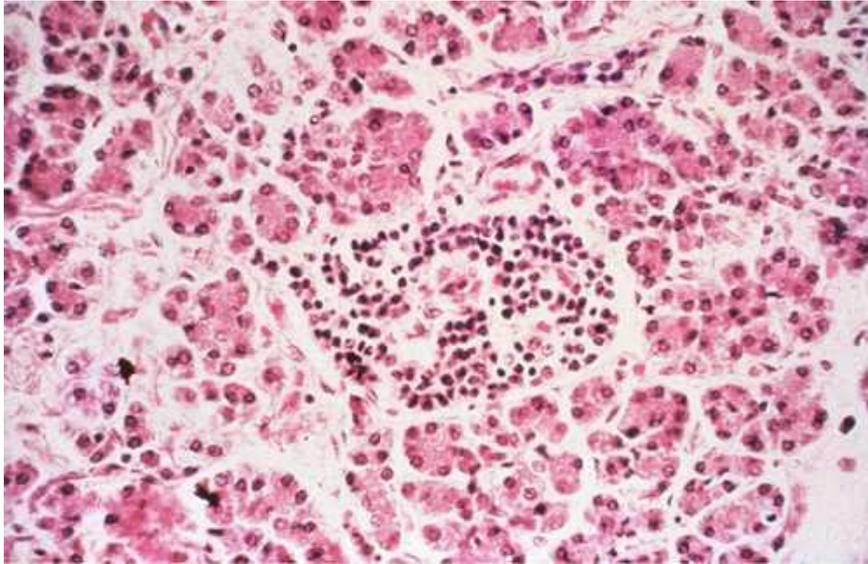


Abbildung 4: Lymphozytäre Infiltration in die Beta-Zelle. T-Lymphozyten wandern in die Beta-Zelle ein [39].

Tiermodelle haben ergeben, dass es im Pankreas innerhalb des Lymphknotens zu einer initialen Antigenpräsentation kommt. Antigene werden dabei durch dendritische Zellen den T-Zellen präsentiert [40].

Epidemiologische und experimentelle Daten zeigen, dass virale Infektionen mit der Pathogenese des Typ 1 Diabetes assoziiert sind. Die zugrunde liegenden Mechanismen jedoch, wie Viren die Funktion und das Überleben der Beta-Zellen beeinflussen, sind unbekannt. Viele Viren, wie Enteroviren, Rotaviren, Adenoviren, Reoviren, Retroviren, Zytomegalieviren und Herpes-simplex-Viren, sind an der Pathogenese des Typ 1 Diabetes beteiligt [41] [42-45]. Viren können entweder aus dsRNA (Doppelstrang-RNA), aus ssRNA (Einzelstrang-RNA), aus dsDNA (Doppelstrang-DNA) oder ssDNA (Einzelstrang-DNA) bestehen [46]. Coxsackie-Viren gehören zu den ssRNA-Enteroviren und sind in der Literatur am häufigsten in Zusammenhang mit der Entstehung des Typ 1 Diabetes beschrieben worden. Infizieren Enteroviren die Beta-Zellen des Pankreas, bewirken sie eine direkte Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen und die Freisetzung von IFN- α (*Interferon- α*). Im weiteren Verlauf kommt es zur Zerstörung der Beta-Zellen durch zytotoxische CD8+T-Zellen. Enteroviren wurden in den Beta-Zellen des Pankreas von Typ 1 Diabetikern immunhistochemisch nachgewiesen [47] [48]. Coxsackie-Viren und ihre Komponenten wurden im Blut von Patienten mit Typ 1 Diabetes festgestellt [49]. Die persistierende und die wiederholte Infektion mit Coxsackie-Virus führt zur Produktion von IFN- α und anderen pro-inflammatorischen Molekülen, was zur Induktion des Typ 1 Diabetes in genetisch prädisponierten Patienten führt. Auch poly(I:C), ein dsRNA-Analogon, welches

während des Lebenszyklus von Viren generiert wird, führt zu Beta-Zell-Apoptose über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) und IRF3 (*Interferon-regulating factor 3*) [50].

Viren induzieren Typ 1 Diabetes im NOD (*nonobese diabetic*)-Maus- und im BBDR (*biobreding diabetes-resistant*)-Ratten-Modell. Isolierte Coxsackie-Viren, die in die NOD-Mäuse injiziert wurden, führten zur Beta-Zell-Zerstörung und zum Diabetes [51]. Im BBDR-Ratten-Modell induzierte der ssDNA-Virus KVR (*Kilham Rat Virus*), ein Mitglied der Parvoviren, in 25 % der Tiere über einen T-Zell-vermittelten Prozess Typ 1 Diabetes [52] - der dsDNA-Vaccinia-Virus, ein Mitglied der Poxviren, jedoch nicht [53]. DsDNA-Viren wie Herpes-simplex-Viren und Zytomegalieviren sind epidemiologisch mit der Expression des Typ 1 Diabetes assoziiert [42-44]. In der vorliegenden Studie wurde die Korrelation zwischen dem dsDNA-Analogon poly(dA:dT) und Typ 1 Diabetes untersucht.

1.2 Innates Immunsystem

Das innate bzw. angeborene Immunsystem erkennt sowohl Mikroorganismen wie Viren (*PAMPs, pathogen associated molecular patterns*) als auch körpereigenes apoptotisches oder nekrotisches Zellmaterial (*DAMPs, danger associated molecular patterns*) [54] durch Pathogenerkennungsrezeptoren (PRR) wie Toll-like-Rezeptoren (TLR), RIG-I-like-Helikasen (RLH) wie MDA-5 oder RIG-I sowie Inflammasome. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind durch ein einzelnes Gen kodiert [55]. Die angeborene Pathogenerkennung bekämpft Krankheitserreger lokal. Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen charakterisieren das angeborene Immunsystem. Reicht die Immunantwort über das angeborene Immunsystem nicht aus um Pathogene, wie Viren oder Bakterien, zu bekämpfen, kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem erkennt Antigene von Mikroorganismen durch hoch spezifische B- und T-Zell-Rezeptoren, die während der somatischen Genrekombination geformt werden. Das adaptive Immunsystem repräsentiert ein „immunologisches Gedächtnis“. In der adaptiven Immunantwort spielen die Lymphozyten eine wichtige Rolle: B-Lymphozyten produzieren Antikörper und T-Lymphozyten produzieren zytotoxische CD8+T-Zellen, welche Virus-infizierte Zellen über MHC-Klasse-I-Komplexe töten können, sowie CD4+T-Zellen, den sogenannten T-Helferzellen, welche über MHC-Klasse-II-Komplexe Makrophagen und B-Zellen aktivieren können. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem innaten Immunsystem liegt, wird auf eine detaillierte Beschreibung des adaptiven Immunsystems verzichtet.

1.2.1 Erkennung von dsRNA

Christiane Nüsslein-Vollhard identifizierte 1985 das Toll-Protein [56]. Toll ist für die dorso-ventrale Anlage der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* verantwortlich. Toll spielt nicht nur in der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege, sondern auch in der Maus und im Menschen eine Rolle. Das Homolog von Toll wird im Menschen als Toll-like-Rezeptor bezeichnet. Die Toll-like-Rezeptoren verdanken ihren Namen den Toll-Proteinen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [56]. Bruce Beutler und Jules Hoffmann erhielten für die Aufdeckung der Funktion der Toll-like-Rezeptoren im Menschen 2011 den Medizin-Nobelpreis.

Toll-like-Rezeptoren spielen im innatem Immunsystem in der Abwehr von Pathogenen und Krankheitserregern eine wichtige Rolle. Es gibt 13 Toll-like-Rezeptoren: 10 im Menschen (TLR 1-10) und 12 in der Maus (TLR 1-9 und 11-13). Toll-like-Rezeptoren können entweder an der Zelloberfläche oder im Endosom, einem Vesikel, welches während der Endozytose von der Zelle gebildet wird, lokalisiert sein. Die Toll-like-Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 befinden sich endosomal im Zytoplasma der Zelle. Die anderen Toll-like-Rezeptoren sind an der Zelloberfläche lokalisiert [57]. Toll-like-Rezeptoren erkennen Pathogene wie Viren und produzieren Moleküle, welche zur antiviralen Immunantwort führen. Toll-like-Rezeptoren sind Pathogenerkennungsrezeptoren, welche über verschiedene Signaltransduktionsmechanismen und über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression von Chemokinen, Zytokinen und Typ I-Interferonen führen.

Toll-like-Rezeptoren besitzen zusätzlich zu ihrem extrazellulären oder endosomalen Anteil, der seinen Liganden erkennt, einen intrazellulären Anteil, der über verschiedene Adaptormoleküle wie MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), TRIF (*TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*), TRAM (*TRIF related adaptor molecules*) und TIRAP (*TIR-associated protein*) zur Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Typ I-Interferonen führt [58,59].

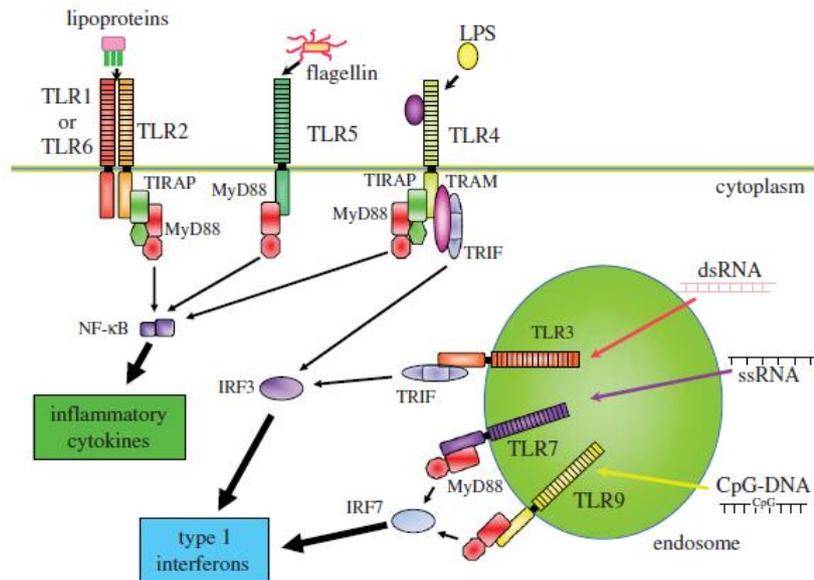


Abbildung 5: TLR-Liganden und ihre Signalwege. DsRNA aktiviert TLR3 über das Adaptormolekül TRIF und den Transkriptionsfaktor IRF3. SsRNA aktiviert TLR7 über das Adaptormolekül MyD88 und den Transkriptionsfaktor IRF7. CpG-DNA aktiviert TLR9 über das Adaptormolekül MyD88 und den Transkriptionsfaktor IRF7. Alle drei Signalwege führen zur Induktion von Typ I-Interferonen [59].

DsRNA wie sie im Lebenszyklus von Viren produziert wird, bindet an den endosomal lokalisierten TLR3 (Toll-like-Rezeptor 3). Dadurch kommt es über das Adaptormolekül TRIF zur Aktivierung von Interferon-regulatorischen Faktoren (IRF) wie IRF3. Es folgt die Ausschüttung von Typ I-Interferonen. SsRNA hingegen wird im Endosom von TLR7 erkannt, der als Adaptormolekül MyD88 benutzt. Es kommt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktor IRF7 sowie zur Ausschüttung von Typ I-Interferonen (Abbildung 5) [59]. Poly(I:C), eine synthetische dsRNA, führt über TLR3 und IRF3 zur Apoptose von primären Ratten-Beta-Zellen [50].

Zusätzlich zu den Toll-like-Rezeptoren spielen im innate Immunsystem die im Zytosol lokalisierten RIG-I-like-Rezeptoren eine Rolle [60,61]. RIG-I (*retinoic acid inducible gene*), MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) gehören zu dieser Familie.

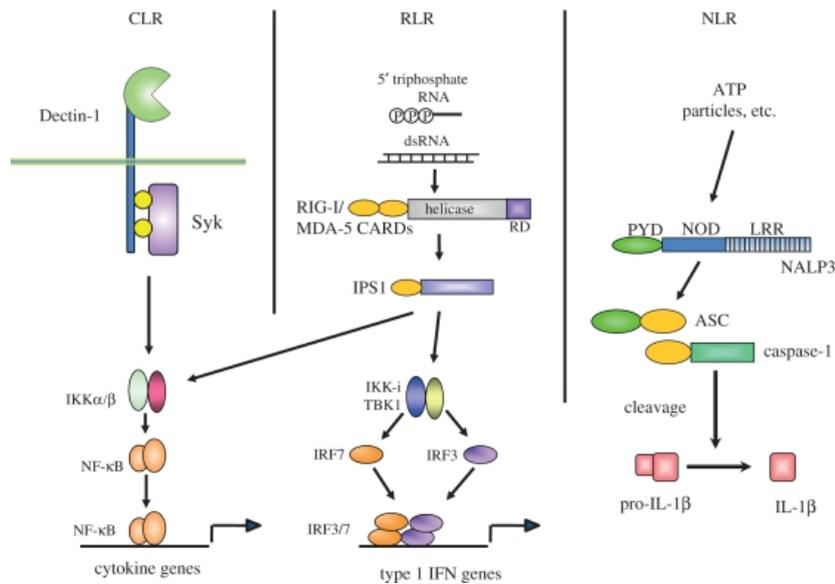


Abbildung 6: RIG-I-like-Rezeptoren (RLR): DsRNA wird von den zytosolischen Rezeptoren MDA-5 und RIG-I erkannt und führt über die Aktivierung von Adaptorprotein IPS-1 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 [59].

Zytosolische dsRNA wird durch die im Zytoplasma befindlichen RIG-I-like-Helikasen (RLH) wie RIG-I und MDA-5 erkannt. Über das Adaptorprotein IPS-1 (*Interferon- β promotor stimulator 1*), auch bezeichnet als MAVS, VISA oder Cardif, werden die Transkriptionsfaktoren IRF7 oder IRF3 aktiviert, was zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Typ I-Interferonen führt.

1.2.2 Erkennung von dsDNA

Die Erkennung von viraler dsDNA ist sehr komplex. Pathogenerkennungsrezeptoren des innatens Immunsystems erkennen gefährliche Pathogene wie DNA-Viren oder endogene apoptotische DNA [54]. Die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd ist schwierig. Über Signaltransduktionsmechanismen kann das innate Immunsystem stark aktiviert werden.

Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9)

CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin)-DNA wird durch den endosomal lokalisierten TLR9 erkannt, der über die Aktivierung von MyD88 zur Aktivierung von IRF7 führt, was die Ausschüttung von Typ I-Interferonen nach sich zieht [62] (siehe Abbildung 5 [59]). In einem Modell zur viralen Induktion eines autoimmunen Diabetes, dem BBDR-Ratten-Modell, wurden

Ratten mit Parvovirus KVR infiziert und entwickelten über den TLR9-Weg einen Autoimmundiabetes [63].

Zusätzlich zum TLR9 gibt es einige TLR-unabhängige DNA-Erkennungswege wie den DAI-Rezeptor und das AIM2-Inflammasom [64]. Diese Rezeptoren erkennen mikrobielle DNA und körpereigene DNA und aktivieren das Immunsystem. Die Infektion von TLR9-defizienten Zellen mit DNA-Viren, wie Herpes-simplex-Viren (HSV 1) oder intrazellulären Bakterien, wie *Listeria monocytogenes*, führt zur Aktivierung von Typ I-Interferonen. Die Transfektion mit synthetischer dsDNA aktiviert TLR9-unabhängig Typ I-Interferone [65-67]. Zusätzlich zu den Toll-like-Rezeptoren existieren zytosolische non-Toll-like-Rezeptoren, die das innate Immunsystem aktivieren und zur Induktion von Typ I-Interferonen führen. Fremde DNA oder RNA können entweder direkt aus dem Genom der einwandernden Pathogene, wie beispielsweise Viren, oder durch die Transkription und Replikation von viralen und bakteriellen Genen entstehen. Auch endogene nicht-pathogene DNA, welche von apoptotischen Zellen freigesetzt wird, kann die Typ I-Interferon-Ausschüttung in einer TLR9-unabhängigen Weise aktivieren [68,69].

DAI- / ZBP 1-Rezeptor

Der DAI (*DNA dependent activator of IFN regulatory factors*)-Rezeptor, auch ZBP 1 (*Z-DNA-binding protein 1*) genannt, ist ein weiterer Sensor für dsDNA. Seine Aktivierung führt zur Ausschüttung von Typ I-Interferonen [70]. Da die Defizienz des DAI-Rezeptors dennoch zur Ausschüttung von Typ I-Interferonen nach Stimulation mit poly(dA:dT), einem Analogon synthetischer B-Form-DNA, führt, deutet dies darauf hin, dass es noch weitere Rezeptoren für dsDNA geben muss [71].

AIM2-Inflammasom

Das AIM2-Inflammasom (*absent in melanoma 2*) führt nach Aktivierung durch dsDNA zur Ausschüttung von Interleukinen IL-1 β sowie IL-18. Das AIM2-Molekül gehört zu den hämatopoetischen Interferon-induzierenden Kern-Proteinen der HIN 200-Proteinfamilie. Es handelt sich um einen Proteinkomplex, auch Inflammasom genannt. DNA verschiedenen Ursprungs führt zur Aktivierung des AIM2-Inflammasoms. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass poly(dA:dT), Plasmid-DNA sowie bakterielle DNA von *Listeria monocytogenes* zur Aktivierung des AIM2-Inflammasoms führen [72] [73] [74]. Während der Aktivierung von AIM2 kommt es zur Interaktion von AIM2 mit ASC, einem Adaptormolekül von AIM2. Dies führt über die Aktivierung der Caspase 1 zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Moleküle wie IL-1 β und IL-18. P202 ist ein weiteres Mitglied der HIN 200-Proteinfamilie, das zytoplasmatische DNA

bindet, jedoch im Gegensatz zum AIM2-Inflammasom zur Unterdrückung der Caspase 1-Aktivierung führt.

RIG-I-Rezeptor und Polymerase III

Zwei unabhängige Forschergruppen fanden heraus, dass poly(dA:dT) über Polymerase III im Zytoplasma in dsRNA umgeschrieben werden kann. Diese dsRNA enthält ein 5'-Ende und kann durch RIG-I erkannt werden. Beide DAI und RIG-I führen über den TBK 1 (*TANK-binding kinase 1*)-IRF3-Weg zur Produktion von Typ I-Interferonen [72,75]. Das im Endoplasmatischen Retikulum befindliche STING-Transmembranprotein (*Transmembran protein stimulator of interferon genes*) ist ein Adaptorprotein von TBK 1 [76].

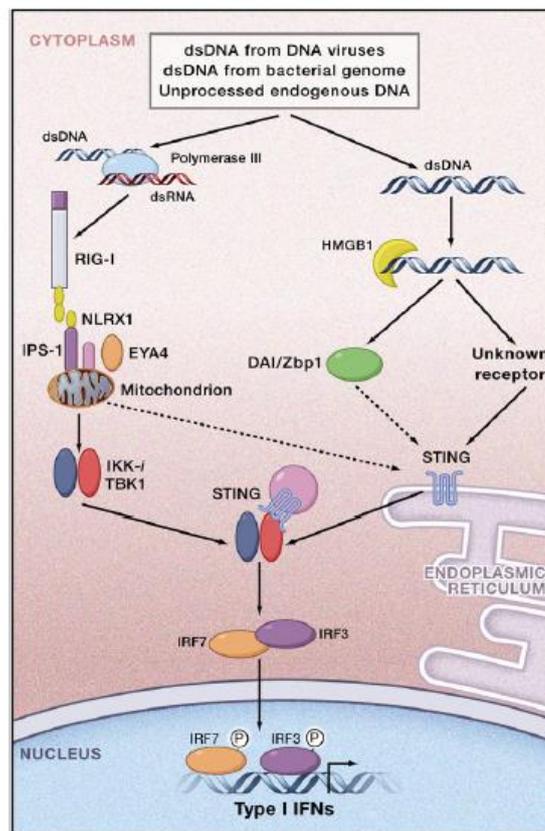


Abbildung 7: RIG-I als DNA-Sensor: DsDNA wird über die Polymerase III in dsRNA umgeschrieben und über RIG-I erkannt [77].

LRRFIP 1

LRRFIP 1 (*Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1*) erkennt AT-reiche, rechtsgewundene B-Form-dsDNA sowie GC-reiche, linksgewundene Z-Form-dsDNA. LRRFIP 1 führt β -Katenin-abhängig zur Produktion von IFN- β . β -Katenin bindet an das C-terminale Ende von IRF3, was zu einer erhöhten IFN- β -Expression führt [78].

IFI 16

IFI 16 (*Interferon-inducible protein 16*) wurde erstmals 2010 identifiziert. IFI 16 wird durch virale, bakterielle und durch poly(dA:dT)-DNA aktiviert. Das Adaptormolekül STING transloziert an IFI 16 und führt zur Ausschüttung von Typ I-Interferon IFN- β . Da IFI 16 wie das AIM2-Inflammasom Caspase 1 aktivieren kann, wird IFI 16 zu den AIM2-like-Rezeptoren (ALR) gezählt [79].

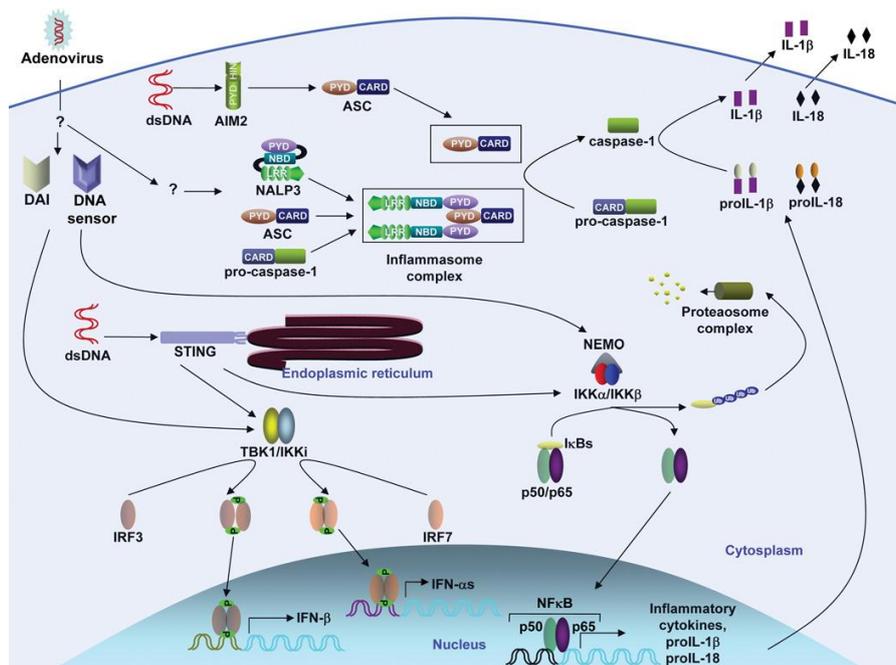


Abbildung 8: Die Erkennung von DNA durch DNA-Rezeptoren: Die Aktivierung der zytosolischen DNA-Rezeptoren führt nach der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression von IFN- β , IFN- α sowie von inflammatorischen Zytokinen wie pro-IL-1 β und pro-IL 18 im Nucleus [80].

1.2.3 Typ 1 Diabetes, innates Immunsystem, Interferone und Interferon-induzierte Gene

Nach Aktivierung des innaten Immunsystems durch seine Pathogenerkennungsrezeptoren, Toll-like-Rezeptoren, RIG-I-like-Helikasen und Inflammasome, kommt es zur Hochregulation von Zytokinen. Interleukine, welche von Leukozyten produziert werden, Chemokine, welche die T-Lymphozyten an die Beta-Zelle rekrutieren, und Interferone werden zu den Zytokinen gezählt. Typ 1 Diabetes basiert auf einer Zytokin-vermittelten entzündlichen Zerstörung der Insulin-produzierenden Zellen des Pankreas. Diese Entzündung wird als Dialog zwischen den einwandernden Immunzellen und den Beta-Zellen angesehen. Der Dialog wird über Zytokine geführt, die entweder von den Beta-Zellen oder von den Immunzellen des adaptiven Immunsystems freigesetzt werden. Die Erkennung von endogenen und exogenen Liganden durch TLR3 und TLR4, RIG-I und MDA-5 sowie durch andere Pathogenerkennungsrezeptoren des innaten Immunsystems aktiviert Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, IRF3 und STAT-1 (*Signal transducers and activators of transcription 1*) in der Beta-Zelle.

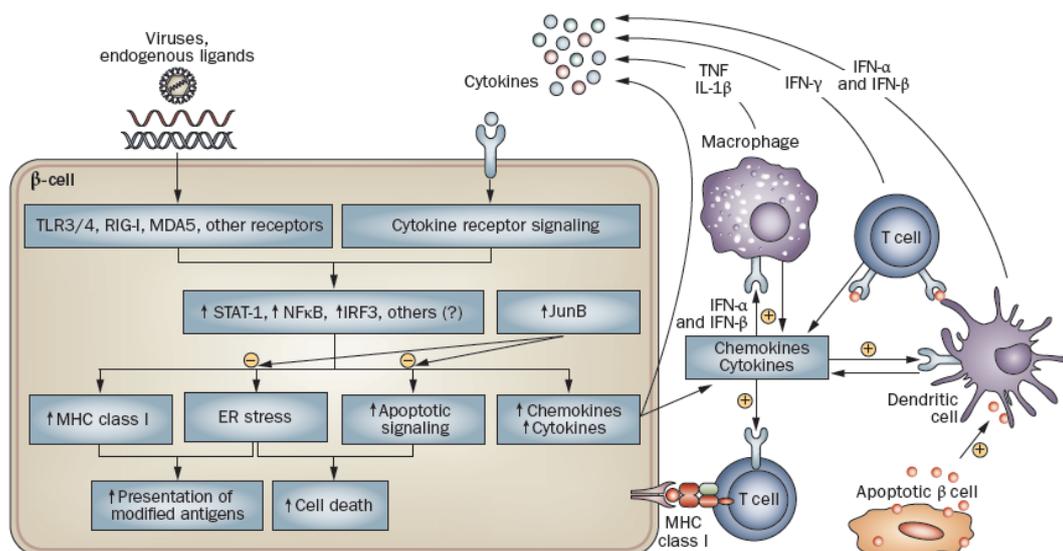


Abbildung 9: Interaktion zwischen der Beta-Zelle und den Immunzellen führt zur Induktion und Amplifikation der Insulinitis. Viren und endogene Liganden binden an TLR3, TLR4, RIG-I, MDA-5 und andere Rezeptoren. Über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT-1, NF κ B, und IRF3 kommt es zur Hochregulation der MHC-Klasse-I-Rezeptoren auf der Beta-Zelle, zur Aktivierung des apoptotischen signaling und zur Hochregulation von Chemokinen und Zytokinen. Dies führt zu Apoptose der Beta-Zelle. Über die MHC-Klasse-I-Moleküle können Antigene den CD8+T-Zellen präsentiert werden. Dadurch kommt es zu einer Verbindung zwischen innatem und adaptivem Immunsystem [81].

STAT-1 reguliert die Zytokin-induzierte Apoptose [82]. Dies wiederum führt zur Aktivierung des *apoptotic signaling*, was letztendlich in die Beta-Zell-Apoptose mündet [83]. Die Erkennung von viralen Nukleinsäuren erfolgt unabhängig vom adaptiven Immunsystem. Um die Virus-Replikation und die Ausbreitung des Virus zu verhindern, entscheidet sich die Zelle dafür „Selbstmord“ zu begehen. Programmierter „Selbstmord“ der Zelle, auch Apoptose genannt, ist der letzte Ausweg, um die weitere Ausbreitung und Vervielfältigung des Virus zu verhindern. Zusätzlich kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, welche die Immunzellen der adaptiven Immunantwort an die Beta-Zelle rekrutieren. Hierbei spielt vor allem das Chemokin CXCL10 (*CXC-Chemokine ligand 10*) eine wichtige Rolle, da es durch Interferone induziert wird und über den Chemokinrezeptor CXCR3 (*CXC-Chemokine receptor 3*) zur Aktivierung von zytotoxischen CD8+T-Zellen führt [84]. CXCL10, CCL2 (*Chemokine ligand 2*) und CCL20 (*Chemokine ligand 20*) rekrutieren Makrophagen an die Beta-Zelle. Auf der Beta-Zelle werden vermehrt MHC-Klasse-I-Moleküle exprimiert. Die zytotoxischen CD8+T-Zellen können MHC-Klasse-I-Moleküle auf den Beta-Zellen erkennen. Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF, IFN- α , IFN- β und IFN- γ werden von Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen freigesetzt und aktivieren wiederum die Transkriptionsfaktoren NF κ B, IRF3 und STAT-1, die die Entzündungsreaktion aufrechterhalten. Der Teufelskreis mündet in den progressiven und selektiven Verlust der Beta-Zellen. Der Transkriptionsfaktor JunB wirkt diesem Prozess entgegen und hemmt die Beta-Zell-Apoptose [81]. Die Interaktion von Beta-Zellen und Immunzellen führt zur Induktion und Amplifikation der Insulitis und zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch die innate Immunität. Um die Virus-infizierte Zelle zu eliminieren hat das Immunsystem zwei Abwehrstrategien: Erstens aktivieren Viren oder virale Produkte Pathogenerkennungsrezeptoren, welche eine endogene Immunantwort und Apoptose der Beta-Zellen auslösen, um eine weitere Replikation des Virus zu verhindern. Zweitens aktivieren das Virus oder virale Bestandteile sowie apoptotisches Zellmaterial die Immunzellen, welche exogen an die Beta-Zelle rekrutiert werden und über weitere progrediente Zytokinfreisetzung zur Zelllyse und Aufrechterhaltung der Insulitis führen. Die Aktivierung des innaten Immunsystems bewirkt die Freisetzung von Zytokinen und die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Beta-Zelle. Über MHC-Klasse-I-Moleküle werden den T-Zellen Antigene präsentiert. Zytotoxische Zellen wie CD8+T-Zellen töten die infizierten Zellen über extern induzierte Zelllyse und Apoptose [81].

Interferone und Interferon-induzierte Gene

Typ I-, Typ II- und Typ III-Interferone spielen in der antiviralen Immunantwort eine wichtige Rolle [85] [86] [87] [88]. Interferone wurden erstmals 1957 beschrieben [89]. Typ I-Interferone bestehen aus 7 Klassen, nämlich IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ und IFN- τ . Zu den Typ II-Interferonen zählt IFN- γ . Typ III-Interferone bestehen aus drei Klassen: IFN- λ 1, IFN- λ 2, und IFN- λ 3 [88]. Typ I-Interferone aktivieren Apoptose in Virus-infizierten Zellen. Außerdem können Typ I-Interferone T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen aktivieren [86]. IFN- α wird im Menschen hauptsächlich von dendritischen Zellen produziert, während IFN- β von allen Zell-Typen freigesetzt werden kann [90]. IFN- α wurde im Pankreas von Typ 1 Diabetikern isoliert [91]. Typ I-Interferone binden an ihren Interferon-Rezeptor. Interferone führen über den JAK (Janus-aktivierte Kinase)-STAT-1-Signalweg zur Bildung antiviraler Gene [86] [92]. Typ I-Interferone haben zahlreiche immunmodulierende und regulierende Effekte und aktivieren antivirale Mechanismen.

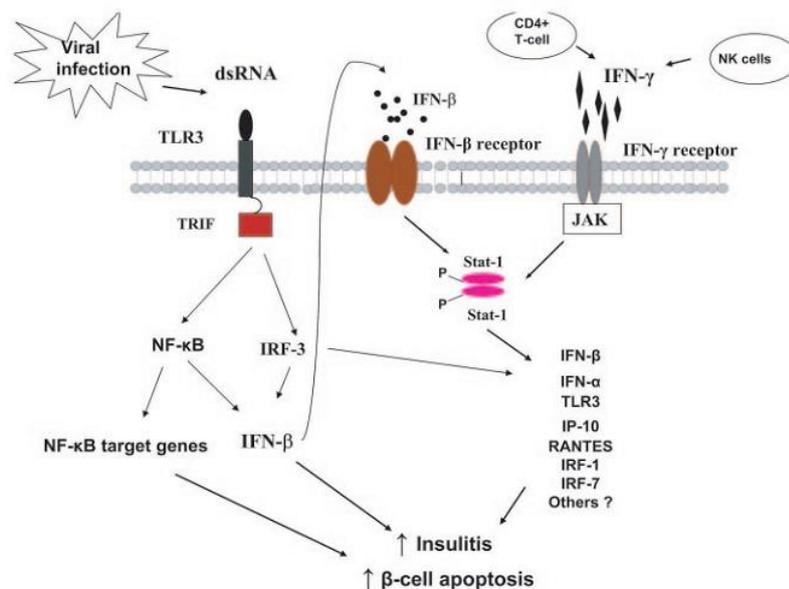


Abbildung 10: DsRNA aktiviert TLR3. Über IRF3 kommt es zur IFN- β -Produktion, zur Insulinitis und zu Beta-Zell-Apoptose. Typ I-Interferon, IFN- β , aktiviert über den IFN- β -Rezeptor den Transkriptionsfaktor STAT-1; Typ II-Interferon, IFN- γ , aktiviert den JAK (Janus-aktivierte Kinase)-STAT-1-Signal-Weg und führt zur Expression von antiviralen Genen [50].

Zu den Typ I-Interferon-induzierten Genen gehören MX1 (*Myxovirus resistance 1 protein*), OASL2 (*2-5-oligoadenylate synthase like protein 2*) und IFIT1 (*Interferon induced with tetratricopeptide repeats 1*).

Die nukleare GTPase MX1 (*Myxovirus resistance 1 protein*) kann an virale Nukleokapside oder andere virale Komponenten binden, um diese zu degradieren [93]. Die Expression der MX-Proteine wird von Typ I-Interferonen und Typ III-Interferonen kontrolliert [94]. MX-Proteine führen zu einer Immunresistenz gegenüber Influenzaviren. MX1 ist ein GTP-bindendes Protein [95]. Es gehört zu den GTPasen (*dynamamin-like large guanosine triphosphatases*). MX-GTPasen hemmen RNA-Viren, wie Influenzaviren und Mitglieder der Bunyaviren. Die Viren werden in ihrer Translation und Transkription zu Beginn ihres Lebenszyklus inhibiert. MX-GTPasen erkennen Viren oder virale Produkte an ihrer Nukleokapsid-ähnlichen Struktur und hemmen den Transport der viralen Nukleokapside in den Nukleus, wo die virale Replikation und Transkription stattfinden [96]. MX1 kann virale Nukleokapside und virale Produkte binden und degradieren [93].

Die durch Interferone induzierten *2'-5'-oligoadenylate synthetases* (OAS) enthalten vier Gene: OAS1, OAS2, OAS3, und OASL. Das murine OASL1-Protein ist inaktiv, im Gegensatz zum aktiven murinen OASL2. Das murine OASL2 benötigt dsRNA als Cofaktor und hat eine enzymatische und eine Ubiquitin-ähnliche Domäne [97]. OASL2 (*2-5-oligoadenylate synthase like protein 2*) aktiviert die antivirale Endoribonuklease RNase L. Die RNase L spaltet virale RNA, was zur Produktion von kleinen viralen RNA-Produkten führt. Diese verstärken über die Aktivierung von RIG-I, MDA-5 und IPS-1 die Ausschüttung von Typ I-Interferonen [98].

IFIT1 (*Interferon induced with tetratricopeptide repeats 1*) ist ein weiteres Interferon-induziertes Gen und wurde erstmals 1983 beschrieben. Die ISG56/IFIT1/P56-Familie liegt auf Chromosom 10. Ihre vier Mitglieder sind ISG56/IFIT1/P56, ISG54/IFIT2/P54, ISG60/IFIT3/P60, ISG58/IFIT5/P58.

Tabelle 1: Die ISG56/IFIT1-Familie. Im Menschen existieren vier verschiedene Gene: ISG56, ISG54, ISG60 und ISG58 [99].

Gene			Protein		Synonyms
Human	Mouse	Gene symbol	Human	Mouse	
ISG56	ISG56	IFIT1	P56 (478 aa)	P56 (462 aa)	IFI-56(K), GARG-16; 561
ISG54	ISG54	IFIT2	P54 (472 aa)	P54 (470 aa)	IFI-54(K), GARG-39, Cig-42
ISG60	ISG49	IFIT3	P60 (490 aa)	P49 (403 aa)	RIG-G, IFI-60, GARG-49, Cig-49, IRC2, IFIT4
ISG58		IFIT5	P58 (482 aa)		RI58

Unter physiologischen Bedingungen liegen diese Gene in ihrer inaktiven Form vor. Ihre Transkription und Aktivierung erfolgt nach Stimulation mit Interferonen, viralen Infektionen und PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), wie dsRNA.

IFN- β und IFN- α sind starke Aktivatoren von IFIT1, wohingegen IFN- γ schwächer IFIT1 aktiviert. Verschiedene DNA- oder RNA-Viren, wie Sendai-Virus, Respiratorischer-Synzytial-Virus (RSV), Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), West-Nile-Virus, Lymphozytischer-Choriomeningitis-Virus (LCMV), Influenzavirus, Reovirus, Herpes-simplex-Virus (HSV), Zytomegalievirus (CMV) und Adenovirus, sind effiziente Induktoren von IFIT1/ISG56/P56.

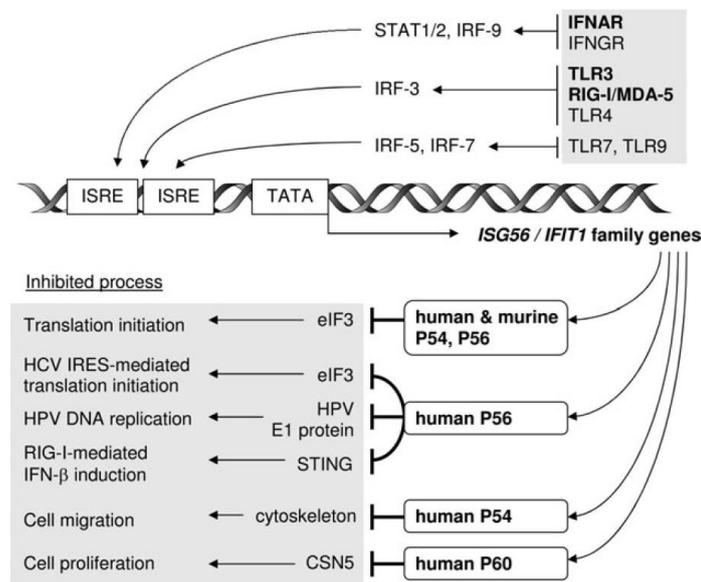


Abbildung 11: Aktivierung der ISG65/IFIT1-Gene: Die Stimulation der Rezeptoren des innate Immunsystems wie IFNAR (IFN- α - β receptor) sowie TLR3 und die zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 aktivieren über Transkriptionsfaktoren wie STAT1 und IRF-3 die ISRE (IFN-stimulated response elements) und führen zur Transkription von ISG56/IFIT1 [99].

Die Funktion von IFIT1/P56 liegt in der Hemmung der viralen Replikation. IFIT1/P56 bindet an eIF3, ein Molekül, welches für die Translation von Viren benötigt wird, und hemmt dadurch die virale Translation. P56 bindet zum Beispiel selektiv an die E1-Helikase des humanen Papilloma-Virus. Dadurch wird die virale DNA-Replikation verhindert. IFIT1/P56 hemmt STING und dadurch wird über RIG-I die IFN- β -Freisetzung gehemmt [100].

Viren können eine Autoimmunreaktion gegen Beta-Zellen durch freigesetzte Antigene oder durch eine Verschiebung der Balance zwischen regulatorischen und zytotoxische T-Zellen induzieren. Im *Molekularen Mimikry* werden körpereigene Beta-Zell-Antigene als fremd erkannt und mit viralen Antigenen verwechselt [101]. Als virale Antigene wurden Coxsackieviren, Rubellaviren, Rotaviren und Zytomegalieviren identifiziert. Virale Antigene enthalten Epitope, welche Eigenantigenen ähnlich sind. T-Zell-Rezeptoren können nicht zwischen Eigen- und Fremdartigenen unterscheiden. Zytotoxische Zellen wie CD8+T-Zellen töten die infizierten Zellen über extern induzierte Zelllyse und Apoptose, so dass die virale Infektion eliminiert wird. Die Persistenz der Selbstantigene führt jedoch zum chronischen Autoimmunprozess und zur Autoimmunentzündung, der sogenannten Autoimmuninsulinitis.

Es gibt einige Hinweise darauf, dass ein Virus die Beta-Zelle direkt zerstören kann. In den meisten Fällen sind jedoch Immunzellen wesentlich an der Zerstörung der Beta-Zellen beteiligt [29]. TLR-unabhängige Signalwege scheinen bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes eine Rolle zu spielen. Das Gen IFIH1, auch unter MDA-5 bekannt, wurde als Typ 1 Diabetes-Prädispositionsloкус beschrieben. Als Reaktion auf eine Infektion durch Enteroviren werden Gene wie IFIH1 in Insulin-produzierenden Beta-Zellen aktiviert. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von Typ I-Interferonen. Typ I-Interferone hemmen nicht nur die virale Replikation, sondern verstärken auch die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Zytotoxische CD8+T-Zellen erkennen die infizierten Beta-Zellen über die Präsentation viraler Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen und können sie töten [102,103].

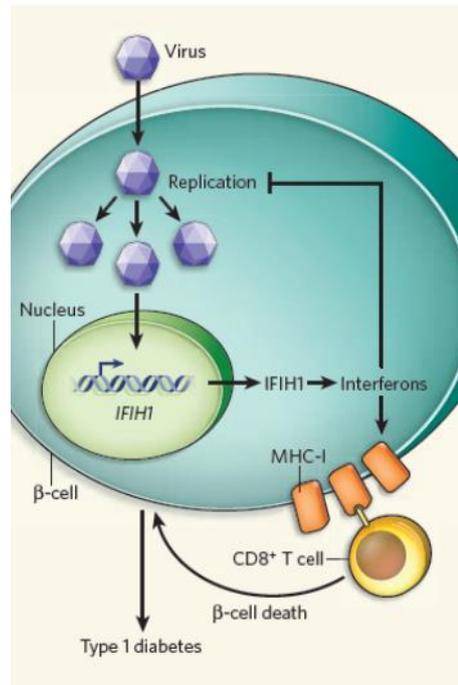


Abbildung 12: Viren infizieren die Beta-Zelle und aktivieren zytosolische Rezeptoren wie IFIH1, auch als MDA-5 bekannt. Es kommt zur Ausschüttung von Typ I-Interferonen, welche einerseits die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Beta-Zelle hochregulieren und andererseits die Replikation des Virus verhindern [102,103].

1.3 Apoptose

Apoptose kommt aus dem altgriechischen Wort *αποπτειν*, was das Herunterfallen von Blättern bedeutet. Apoptose stellt eine evolutionär konservierte Form des Zelltodes dar und wurde 1972 erstmals von John Kerr definiert [104]. Bei Apoptose handelt es sich um einen programmierten „Selbstmord“, welcher entweder von außen durch Immunzellen oder auf Grund von zellinternen Prozessen ausgelöst werden kann. Unter physiologischen Bedingungen existiert ein Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellverlust. Im Rahmen der Apoptose spielen proteolytische Enzyme, die sogenannten Caspasen, eine wichtige Rolle [105]. Es werden Effektor- und Initiatorcaspasen unterschieden. Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die in ihrer inaktiven Proform vorliegen und durch einen Stimulus in die aktive Form übergehen können [106]. Es gibt 11 Caspasen beim Menschen und 9 Caspasen in der Maus [107] [108].

Tabelle 2: Initiator- und Effektorcaspasen bei Maus und Mensch. Die wichtigste Effektorcaspase ist Caspase 3. Die wichtigsten Initiatorcaspasen sind Caspase 8 und 9 [108].

Human	Mouse	Pro-domain	Activators	Established or proposed function
Initiators				
casp 8	casp 8	DED	FADD	Death receptor signaling, cell proliferation
casp 10	none	DED	FADD	Death receptor signaling
casp 9	casp 9	CARD	Apaf-1/cyt c	casp 3/7 activation after mitochondrial stress
casp 1	casp 1	CARD	Ipaf, ASC, inflammasome	IL-1 β /IL-18 maturation, apoptosis
casp 5 ^a	casp 11 ^a	CARD	inflammasome	IL-1 β /IL-18 maturation, LPS stress
casp 4 ^a				
(casp 12) ^a	casp 12 ^a	CARD	TRAF-2, calpain	ER stress
casp 2	casp 2	CARD	DEFCAP, RAIDD	Premitochondrial stress
Executioners				
casp 3	casp 3	short	casp 9,8, others?	Cleavage of most apoptotic substrates
casp 7	casp 7	short	casp 9,8, others?	Cleavage of most apoptotic substrates
casp 6	casp 6	short	casp 3,7	Lamin cleavage

^aDue to recent gene duplications, there is some uncertainty as to which of these genes are orthologs in human and mice. A cluster of genes for casp1–casp5–casp4–(casp12) resides on human chromosome 11q22.3, but the last seems to have acquired inactivating mutations [Fischer et al. 2002]. The syngeneic mouse cluster is casp1–casp11–casp12. Although casp4 could be the human homolog of mouse casp 12, its nucleotide sequence is more similar to casp11 (68%) than casp12 (57%).

Während der Apoptose kommt es zum Schrumpfen der Zelle und zum Abbau der DNA durch Endonukleasen in die sogenannte DNA-Leiter, die mittels TUNEL-Färbung dargestellt werden kann. Die apoptotische Zelle zerfällt in Vesikel. Die Zellreste werden durch die an die Zelle durch Chemokine rekrutierten Makrophagen zerstört. Auf der apoptotischen Zelle können Phosphatidyl-Serin-Moleküle nachgewiesen werden. Lichtmikroskopisch lässt sich der Ablauf der Apoptose verfolgen. Zunächst löst sich die betroffene Zelle aus dem Gewebeverband. An der Zellmembran bilden sich Blasen. Der Zellkern wird kleiner; es entstehen Apoptosekörperchen [109]. Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der während der Entwicklung der Zellen eine wichtige Rolle spielt. Der programmierte Zelltod dient der Elimination von entarteten Zellen, der Beseitigung von infizierten Zellen und dem Abbau schädlicher Zellen des Immunsystems [109]. Die Fehlsteuerung der Apoptose mündet entweder in Autoimmunerkrankungen oder in onkologische Erkrankungen. Man unterscheidet den intrinsischen, mitochondrialen oder Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-regulierten Weg der Apoptose und den extrinsischen Weg der Apoptose [110].

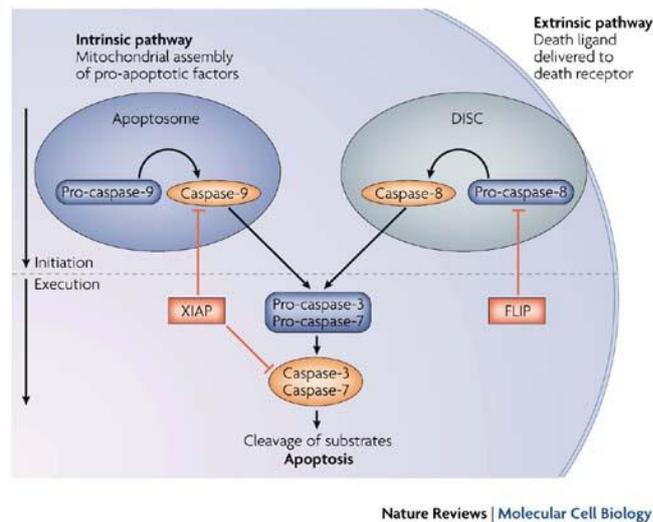


Abbildung 13: Intrinsischer und extrinsischer Weg der Apoptose. Die Initiatorcaspasen 8 und 9 münden beide in die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 [110].

1.3.1 Intrinsischer Weg der Apoptose

Der intrinsische Weg der Apoptose wird auch als mitochondrialer oder Bcl-2-regulierter Weg der Apoptose bezeichnet [111]. Im intrinsischen Weg der Apoptose erhält p53, ein Tumorsuppressor [112], ein apoptotisches Signal z.B. durch DNA-Schäden [113]. Es kommt zur Aktivierung der pro-apoptischen Proteine Bid (*BH3 interacting domain death agonist*), Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) oder Noxa (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced-protein 1*) [114-116]. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung von pro-apoptischen Molekülen Bak (*Bcl-2 homologous antagonist / killer*), Bax (*Bcl-2-associated X protein*) und tBid (*truncated BH3 interacting domain death agonist*). Diese pro-apoptischen Mitglieder der Bcl-2-Familie inaktivieren die anti-apoptischen Bcl-2-Proteinen wie Bcl-2, Bcl-XL (*B-cell lymphoma XL*) und Mcl-1 (*induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) [113] [117]. Dies führt zur Freisetzung von CytochromC aus dem mitochondrialen Intermembranraum durch die Aktivierung von MAC (*mitochondrial apoptosis-induced channel*). Durch die Bindung von CytochromC an die C-terminale Region von Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und zur Bindung von dATP an Apaf-1 [118]. Durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungsdomäne) auf dem N-terminalen Ende von Apaf-1 zugänglich, so dass sie an die CARD-Domäne der Procaspase 9 binden kann [119]. Die Bildung dieses Heterodimers ist die Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase 9. Dieser Komplex heißt Apoptosom und stellt die aktive Form der Caspase 9 dar. Die aktive Caspase 9 initiiert die Caspase-Kaskade [120].

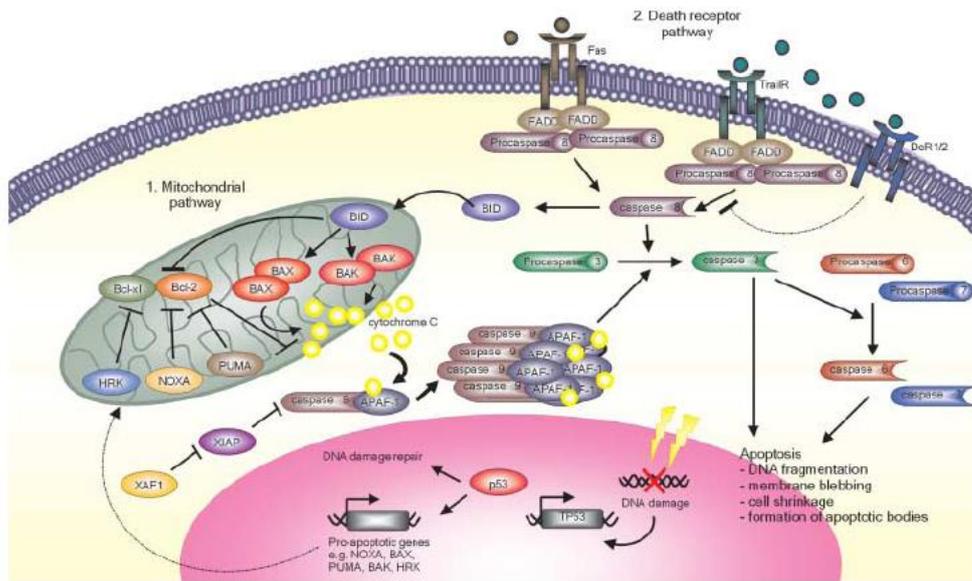


Abbildung 14: Der intrinsische Weg der Apoptose. Die pro-apoptischen Moleküle der BH3-only-Familie führen zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung von Apaf-1, was die Initiatorcaspase 9 aktiviert [120].

1.3.2 Extrinsischer Weg der Apoptose

Beim extrinsischen Weg der Apoptose bindet der Ligand an einen Rezeptor der TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptorfamilie. Diese Todesrezeptoren besitzen im zytosolischen Teil die Todesdomäne DD (*death domain*), welche aus 80 Aminosäuren besteht. Zu den Todesrezeptoren gehören die CD95 (APO/Fas)-Rezeptoren, der TNF-R1 (TNF-Rezeptor 1) und der TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*). Die Liganden sind der Tumornekrosefaktor TNF, CD95-Ligand (CD95/FasL), TNF- α , Lymphotoxin- α sowie andere Zytokine, die von T-Lymphozyten sezerniert werden [121].

Der Rezeptor Fas/FasR/CD95 enthält in seinem zytosomatischen Anteil die Todesdomäne DD. Der FasL/CD95-Ligand wird von T-Lymphozyten freigesetzt [122]. Wenn der CD95/Fas-Ligand an seinen Rezeptor bindet, kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors, auch DISC (*trimerized receptor-ligand complex*) genannt. Die Todesdomänen bilden eine Struktur, an die nur Adaptormoleküle mit der gleichen Struktur binden können.

Fas/FasR/CD95 und TRAIL-R1/-R2 binden direkt an FADD (*Fas associated death domain*). Der TNF-R1 bindet jedoch zuerst an TRADD (*TNF-receptor-associated death domain protein*). Dann bindet FADD an die Todesdomäne DD von TRADD. FADD besitzt neben DD auch eine Todes-

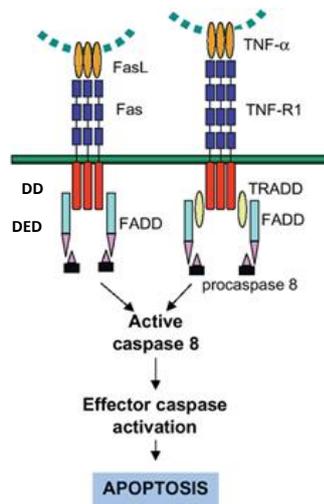


Abbildung 15: Der extrinsische Weg der Apoptose. Fas-L bindet an den Fas-Rezeptor. An die zytosolische Todesdomäne DD (death domain) bindet FADD (Fas associated death domain). FADD besitzt eine DED (death effector domain), über die die Procaspase 8 mit ihrer DED binden kann. TNF- α bindet an den TNF-R1-Rezeptor. An die zytosolische Todesdomäne DD (death domain) bindet erst TRADD (TNF-receptor-associated death domain protein), dann bindet FADD an TRADD. Wiederum kann über die DED von FADD die Procaspase 8 mit ihrer DED binden. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Procaspase und zur Bildung der aktiven Caspase 8 [121].

effektordomäne DED (*death effector domain*), über die die Procaspase 8 mit ihrer DED bindet [121]. Caspase 8 löst ihrerseits eine Caspaseaktivierung aus, was - im Sinne einer positiven Rückkopplung - zur weiteren Aktivierung von Caspase 8-Molekülen führt.

Ausführungsphase der Apoptose

Die Effektorcaspasen Caspase 3, 6 und 7 führen zum apoptotischen Tod der Zelle. Es kommt zum Abbau von Lamin in der Zellkernmembran und zum Abbau von Aktin als Teil des Zytoskeletts. Caspasen aktivieren DNasen durch Proteolyse. DNasen sind Enzyme, welche genomische DNA an internukleosomalen Regionen (*linker regions*) spalten und die „Apoptose-Leiter“ produzieren. Diese charakteristischen DNA-Fragmente haben eine Größe von 180 Basenpaaren. Die apoptotische Zelle schnürt sich in Vesikel ab, die durch Makrophagen phagozytiert werden.

Zellen, die auf Grund einer zu geringen intrazellulären Menge an Caspase 8 nicht den extrinsischen Weg der Apoptose aktivieren können, aktivieren den intrinsischen Weg der Apoptose als Signalverstärkung. Dazu spaltet Caspase 8 das zytosolische Protein Bid. Das entstehende C-terminale Spaltprodukt t-Bid (*truncated Bid*) vermittelt nach der Translokation

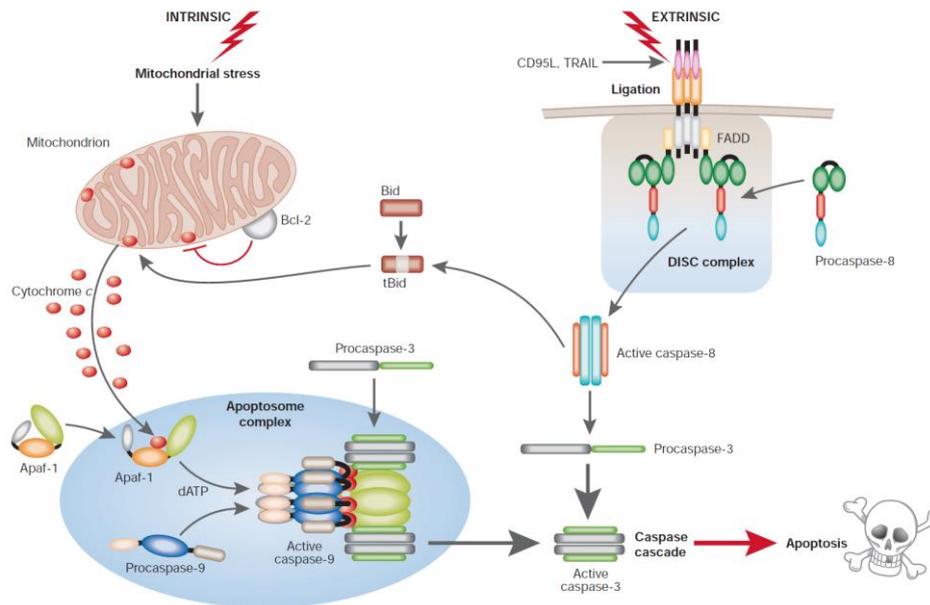


Abbildung 16: Rolle des BH3-only-Moleküls t-Bid (truncated-Bid). Über tBid können der extrinsische und der intrinsische Weg der Apoptose verbunden werden [123].

in die Mitochondrien die Freisetzung von apoptotischen Faktoren und führt zur Aktivierung von Caspase 9 [124].

1.3.3 Apoptose und Beta-Zellen

Die Balance und die Interaktionen der BH3-only-Proteine der Bcl-2-Familie bestimmen, ob die Beta-Zelle überlebt oder ob Apoptose induziert wird [125]. Die BH3-only-Proteine können in zwei Gruppen unterteilt werden: die Sensibilisatoren, DP5/Hrk (*Activator of apoptosis harakiri*), Bik (*Bcl2-interacting killer*), Bad, Noxa und die Aktivatoren, Bid, Bim (*Bcl-2-like protein 11*) und Puma, auch bekannt als BBC3 (*Bcl-2-binding component 3*) [126].

Die Sensibilisatoren inaktivieren die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine wie Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w (*Bcl-2-like protein 2*) und Bcl-A1 (*Bcl-2-related protein A1*). Die Aktivatoren Bid, Bim und Puma aktivieren die pro-apoptotischen Moleküle Bax (*Bcl-2-associated X protein*) und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*). Das aktivierte Bax transloziert vom Zytosol zum Mitochondrium und formt Poren in die Membranen, was zur Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma führt [127].

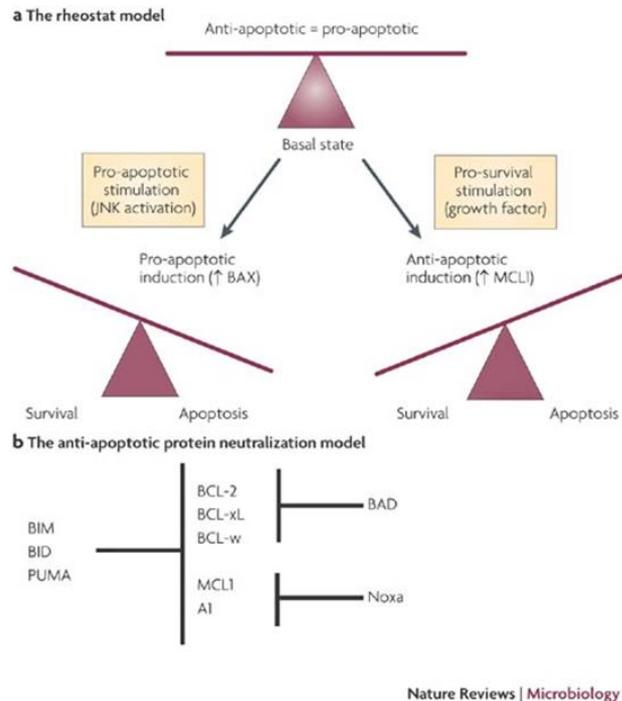


Abbildung 17: Die BH3-only-Proteine der Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)-Familie: Die Balance zwischen pro- und anti-apoptischen Molekülen stellt die physiologische Situation dar [128].

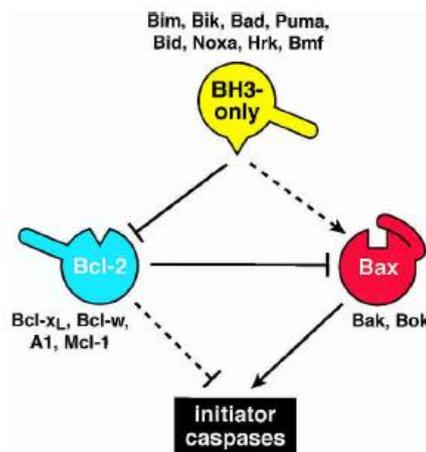


Abbildung 18: Interaktionen zwischen den Sensibilisatoren und den Aktivatoren der BH3-only-Familie: Bim, Bik, Bad, Puma, Bid, Noxa, Hrk, Bmf hemmen die anti-apoptischen Moleküle Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-A1 und Mcl-1 und aktivieren die pro-apoptischen Moleküle Bax, Bak und Bok (Bcl-2-related ovarian killer) [108].

Bim und Puma spielen in der Virus-induzierten Apoptose von Beta-Zellen des Pankreas eine Rolle [129]. Noxa wird durch Typ I-Interferone und poly(I:C) hochreguliert und aktiviert Bax und pro-apoptische Caspasen [130,131]. Noxa ist ein über p53 reguliertes Protein und spielt

in der DNA-induzierten Apoptose eine wichtige Rolle [116]. Die Expression von Noxa kann durch dsRNA in einer p53-unabhängigen, jedoch IRF3-abhängigen Weise aktiviert werden. DsRNA aktiviert Noxa über IRF3 und nicht über p53 [40]. Moleküle, welche die Caspase-Aktivität hemmen oder welche die pro-apoptischen Mitglieder der Bcl-2-Moleküle blockieren, könnten potentielle neue Therapiestrategien in der Hemmung der Apoptose von Beta-Zellen darstellen [123].

1.4 Charakterisierung der Insulin-produzierenden MIN6- und INS-1-Zellen

Miyazaki et al. produzierten 1990 transgene Mäuse, welche das Gen für den Insulin-Promotor und das SV40 T-Antigen enthielten [132,133]. SV40 T-Antigen (*Simian Vacuolating Virus 40 T-Antigen*) ist ein Hexamer-Protein, welches aus dem dsDNA-Virus Polyomavirus SV40 entstammt. SV40 T-Antigen hat die Fähigkeit Zellen verändern zu können. Die Zelllinien, die aus diesen Mäusen isoliert wurden, entwickelten pankreatische Beta-Zelltumore, sogenannte Insulinomas. Diese Insulinoma-Zelllinie wurde MIN6 genannt. Die MIN6-Zelllinie exprimiert Insulin-mRNA und SV40 T-Antigen-mRNA. Die Morphe der MIN6-Zellen ist ähnlich wie die der murinen Beta-Zellen des Pankreas. MIN6-Zellen sezernieren Insulin nach Glukose-Stimulation, ähnlich wie kultivierte primäre murine Inselzellen. MIN6-Zellen exprimieren keinen MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Komplex auf ihrer Zelloberfläche. Die Behandlung der MIN6-Zellen mit IFN- γ induziert jedoch die Expression von MHC-Klasse-I-Antigenen und eine Kombination von IFN- γ und TNF- α führt zur Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen auf der Zelloberfläche der MIN6-Zellen. Dies zeigt, dass MIN6-Zellen physiologisch zumindest teilweise ähnlich wie Beta-Zellen aus der Maus oder Ratte reagieren [132,133]. In Zellkultur wachsende MIN6-Zellen erscheinen im Mikroskop als runde, adhärente Zellen, die in Gruppen wachsen.

INS-1-Zellen werden aus durch Röntgenstrahlen induzierten Insulinomas in der Ratte isoliert. Um ein kontinuierliches Wachstum dieser Zellen zu gewährleisten, ist die Stimulation mit β -Mercaptoethanol notwendig. Auch INS-1-Zellen gleichen morphologisch und funktionell den Beta-Zellen aus der Ratte. INS-1-Zellen sind epithelialen Zellen ähnlich. Sie enthalten Insulin und sezernieren Insulin als Antwort auf Glukose. Die Insulin-Ausschüttung in INS-1-Zellen basiert auf einem ATP-abhängigen Kalium-Kanal [134] [135].

MIN6- und INS-1-Zellen sind Zelllinien. Der Vorteil von Zelllinien gegenüber primären Beta-Zellinseln aus Maus oder Ratte ist, dass die Vermischung von Beta-, Alpha- und Delta-Zellen, welche in den Inseln des Pankreas vorhanden sind, verhindert wird und dass es zu einer guten Proliferation der Zelllinien kommt.

1.5 Ziel und Hypothese

In der vorliegenden Arbeit wird der molekulare Mechanismus des durch Viren ausgelösten Typ 1 Diabetes untersucht. Umweltfaktoren wie virale Infektionen durch dsDNA-Viren wie Herpes-simplex-Viren und Zytomegalieviren sind epidemiologisch mit der Expression des Typ 1 Diabetes assoziiert [42-44]. Die zugrunde liegenden Mechanismen, wie Viren und virale Produkte, beispielsweise zytosolische dsDNA, die Funktion und das Überleben von Beta-Zellen beeinflussen, sind jedoch unklar. Die lokale Entzündung in den Beta-Zellen des Pankreas, die Insulitis, führt zum Verlust von Insulin-produzierenden Beta-Zellen. Man weiß heute, dass Typ I-Interferone bei der antiviralen Immunantwort eine wesentliche Rolle spielen. Es ist bekannt, dass poly(I:C) über Toll-like-Rezeptor 3 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und IRF3 und zu konsekutiver Ausschüttung von Zytokinen und Apoptose in primären Inselzellen der Ratte führt [50]. DsRNA kann über die Aktivierung des TLR3 mit folgender Ausschüttung von IFN- α in den Inselzellen des Pankreas Typ 1 Diabetes auslösen [136]. Dagegen ist unklar, ob das dsDNA-Analogon poly(dA:dT) zur Apoptose und Typ I-Interferon-Ausschüttung führt. Die meisten Zellen produzieren als antiviralen Mechanismus Typ I-Interferone, wenn sie durch Viren oder virale Produkte angegriffen werden.

Möglicherweise könnte die Transfektion mit zytosolischer dsDNA poly(dA:dT) zur antiviralen Immunantwort und zur Virus-induzierten Apoptose von Insulin-produzierenden Zellen führen. Ob poly(dA:dT) zur Expression von Typ I-Interferon, IFN- β oder zur Aktivierung von Typ I-Interferon-induzierten Molekülen wie OASL2, IFIT1, MX1 führt und über welche DNA-Rezeptoren oder zytosolischen RNA-Rezeptoren wie RIG-I und MDA-5 dsDNA erkannt wird, ist bisher unklar. Desweiteren ist ungewiss, ob poly(dA:dT) die gleichen Effekte wie poly(I:C) hat und zur Beta-Zell-Apoptose führt. Falls es zum programmierten Zelltod kommt, ist unbekannt, welche Moleküle dabei eine Rolle spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Weg der Apoptose genauer zu charakterisieren und herausfinden, ob der extrinsische oder der intrinsische Weg der Apoptose aktiviert wird und welche Moleküle die ausgelöste Apoptose regulieren. Es sollen die Effekte zytosolischer dsDNA in MIN6- und INS-1-Zellen untersucht werden.

Führt poly(dA:dT) zur Induktion der Insulitis und zum Beta-Zelltod? Wird der Beta-Zelltod direkt über dsDNA ausgelöst? Falls Apoptose ausgelöst wird, kommt es zur Aktivierung des extrinsischen oder des intrinsischen Weges der Apoptose? Welche pro- und anti-apoptotischen Moleküle spielen dabei eine Rolle? Kommt es zur Typ I-Interferon-Aktivierung? Welche Rezeptoren des innate Immunsystems werden durch das dsDNA-Analogon poly(dA:dT) aktiviert?

Kapitel 2: Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer

FACSCalibur™ BD Biosciences, Mannheim, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop

Leica DC 300 F Leica Microsystems, Cambridge, UK

Olympus BX50 Olympus Mikroskope, Hamburg, Deutschland

Spektrophotometer

Beckman DU 530 Beckman Coulter, Fullerton, CA, US

LightCycler Detection System

LightCycler 480 Roche, Mannheim, Deutschland

Western Blot

Hoefer mini VE vertical electrophoresis system Hoefer, Holliston, MA, USA

Sonicator Branson, Danbury, CT, USA

Entwickler Curix 60 AGFA, Köln, Deutschland

Immobilion PVDF Transfermembran Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland

Kodak BioMax XAR Film Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Zellinkubator

Typ B5060 EC-CO2 Heraeus Sepatech, München, Deutschland

Zentrifugen

Heraeus, Minifuge T VWR International, Darmstadt, Deutschland

Heraeus, Biofuge primo Kendro Laborprodukte, Hanau, Deutschland

Pipettierhilfe Pipetus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
4'-6'-Diamino-2-phenylindole (DAPI)	Vector lab, Burlingame, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	GIBCO/ Invitrogen, Paisley, UK
RPMI-1640-Medium	GIBCO/ Invitrogen, Paisley, UK
Opti-MEM-Medium	GIBCO/ Invitrogen, Paisley, UK
FBS (Fötale Kälberserum)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Glucose 20 %	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
PS (Penicillin/Streptomycin)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

2.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Zellart
NIH3T3	Fibroblasten
MIN6	Insulinoma-Zelllinie (Maus)
INS-1	Insulinoma-Zelllinie (Ratte)

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Inkubationsbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Stimulationsexperimente und Zellpassagen erfolgten stets unter der Sterilbank. Filter und laminarer Luftstrom sorgten für eine keimfreie Umgebung. Die Oberfläche der Sterilbank sowie alle Reagenzien und Pipetten wurden vor dem Einbringen in den sterilen Bereich der Werkbank mit 60 % Alkohol behandelt um Kontaminationen zu vermeiden. Zellzahl und Vitalität wurden mittels der Neubauerzählkammer bestimmt. Dabei wurden 50 µl Zellen in Zellsuspension und 50 µl Trypanblau in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und davon 10 µl in die Vertiefung der Neubauerzählkammer eingebracht. Zuvor wurde durch das Anbringen eines Glasplättchens und durch die Evaluation der Neubauerschen Ringe die Dichtigkeit der Neubauerzählkammer bestimmt. Das Trypanblau drang in tote Zellen ein, da deren Zellmembran beschädigt war. Tote Zellen stellten sich blau dar, im Gegensatz zu den lebenden Zellen, die im Mikroskop hell erschienen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe folgender Formel ermittelt: Der Mittelwert aus den 4 Großquadraten * dem Verdünnungsfaktor 2 * 10 000 = Zellzahl / ml.

MIN6-Zellen

Die MIN6-Zellen [132,133], Insulinoma-Zellen der Maus, wurden in D-MEM-Medium mit 20 % FBS, 1 % PS, 500 µl β-Mercaptoethanol und 10 ml 20 % Glukose kultiviert. Nach 7 Tagen waren die MIN6-Zellen konfluent. Das Medium wurde alle drei Tage ausgetauscht, um den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu ermöglichen.

INS-1-Zellen

Die INS-1-Zellen [134] [135], Insulinoma-Zellen der Ratte, wurden in D-MEM-Medium mit 20 % FBS, 1 % PS und 500 µl β-Mercaptoethanol kultiviert. Nach drei Tagen waren die Zellen konfluent und zur Vervielfältigung bereit. Das Medium wurde ebenfalls alle drei Tage gewechselt.

NIH3T3-Zellen

Zur Kultivierung der Fibroblasten wurde das RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS und 1 % PS verwendet.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zunächst wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nun wurden zu den Zellen 8 ml 1,5 molare Trypsin-EDTA-Lösung hinzugefügt. Daraufhin wurden die Zellen für einige Minuten in den Inkubator gestellt, um sich ablösen zu können. Dann wurden sie wieder aus dem Wärmeschrank herausgenommen und es wurde leicht gegen die Zellkulturschale geklopft. Nachdem sich die Zellen mittels Trypsin-EDTA gelöst hatten, wurde diese Lösung in Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen bei 900 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in Einfrierlösung resuspendiert. Diese Lösung bestand aus 9 ml FBS und 1 ml DMSO. Von dieser Zellsuspension wurde je 1 ml in 10 Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden nun in einer Einfrierbox aufbewahrt, die Isopropanol enthielt. Bevor die Zellen schließlich im Flüssigstickstoff eingefroren werden konnten, wurden sie zunächst für zwei bis drei Tage bei -80 °C gelagert. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen mit den Zellen zügig in ein 37 °C warmes Wasserbad gebracht. Nach dem Auftauen des Einfriermediums wurde die Zellsuspension mit 5 ml Wachstumsmedium vermischt. Die Zellsuspension wurde bei 900 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert, in einen 75 ml-Behälter mit 13 ml Medium pipettiert und bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

2.2.3 Stimulationsexperimente

Die Stimulation der TLRs (Toll-like-Rezeptoren) und der RLHs (RIG-I-like-Helikasen) sowie der Inflammasom-Komplexe und der noch unbekanntenen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erfolgte folgendermaßen: MIN6- und INS-1-Zellen wurden für die Stimulation in 12-well-Platten ausgesät. Die Stimulation wurde erst bei 80 % Konfluenz vorgenommen. Vor der Stimulation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen mit D-MEM-Medium im Inkubator bebrütet. Es wurden für die Stimulation der Zellen folgende Liganden verwendet: Poly(dA:dT), ein DNA-Analogon, welches Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9), Inflammasom AIM2, DAI-Rezeptor, die Polymerase III mit Umschreibung in RNA, LRRFIP 1-Rezeptor und IFI 16-Rezeptor aktivieren kann. Da RIG-I, MDA-5 und die Inflammasom-Rezeptoren wie AIM2 intrazelluläre Rezeptoren sind, müssen die Liganden, um die Transfektion mit poly(dA:dT) zu ermöglichen, mit Lipofectamin 2 000 inkubiert werden. Als Negativkontrolle wurden Medium und Lipofectamin, was als Vehikel bezeichnet wurde, benutzt.

Hierfür wurden für eine Stimulation je 25 µl OptiMem in je zwei Eppendorf-Gefäße pipettiert. In das eine 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß wurde 1 µg Ligand und in das andere Eppendorf-Gefäß wurde 1 µl Lipofectamin 2 000 pipettiert. Die Inhalte beider Eppendorf-Gefäße wurden gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf den 12-well-Platten aus dem Inkubator auf die Sterilbank überführt. Aus dem Gemisch wurden je 50 µl pro well auf die Zellen mit D-MEM-Medium ohne Zusatz von FBS und PS pipettiert. Nun wurden die Zellen mit poly(dA:dT) für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert. Nach 6, 12, 18, 24 oder 48 Stunden wurde das restliche Medium mittels einer Pasteur-Pipette abgesaugt und die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen. Die 12-well-Platte mit den stimulierten Zellen wurde zur weiteren Verarbeitung aus der *Hood* in das RNA-Labor mit Abzug gebracht. Dort wurden 60 µl β-Mercaptoethanol und 6 ml Lysepuffer zunächst vermischt und dann aus diesem Gemisch 180 µl auf je ein well der 12-well-Platte pipettiert. Daraufhin wurde die 12-well-Platte bis zur RNA-Isolation im Kühlschrank bei -20 °C aufbewahrt.

dsDNA poly(dA:dT)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
dsRNA poly(I:C)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Lipofectamin 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Staurosporin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Camptothecin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Für die durchgeführten Experimente wurden unterschiedliche Stimulationszeiträume verwendet. In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob und ab wann es zu einer signifikanten Hochregulation der mRNA-Expression von zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren, Typ I-Interferonen und Typ I-Interferon-induzierten Genen kommt. In Vorarbeiten zu dieser Dissertation kam es ab einer 24-stündigen Stimulation von MIN6-Zellen mit poly(dA:dT), komplexiert mit Lipofectamin, zu einem Plateau der mRNA-Expression der untersuchten Gene. Bei 48-stündiger Stimulation wurde ein geringfügiger Anstieg oder ein Rückgang der mRNA-Expression festgestellt [137]. Aus diesem Grund wurden in dieser Untersuchung meist niedrigere Stimulationszeiträume gewählt. Desweiteren wurden unterschiedliche Konzentrationen von poly(dA:dT) verwendet, um festzustellen, ob und ab welcher Konzentration es zu einer signifikanten Hochregulation der mRNA-Expression von zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren, Typ I-Interferonen und Typ I-Interferon-induzierten Genen kommt. Ausserdem sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Dosierung von poly(dA:dT) und der Anzahl apoptotischer Zellen vorliegt.

2.2.4 TUNEL-Färbung

Mittels TUNEL-Färbung (*terminal transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay*) können apoptotische Zellen dargestellt werden [138]. Die TUNEL-Färbung wurde von Y. Gavrieli 1992 zum ersten Mal beschrieben [139]. Während der Apoptose entstehen durch Endonukleasen Einzelstrangbrüche in der DNA der Zelle. Das Enzym *Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT)* bewirkt, dass sich biotinylierte Nukleotide meist dUTP an die freien 3'-OH-Enden der gebrochenen DNA-Moleküle anheften können. Streptavidin, ein Enzym, kann an die biotinylierten Oligonukleotide binden. Das Enzym Streptavidin führt zu einer Farbreaktion. Die grün fluoreszierenden apoptotischen Zellen können im Fluoreszenzmikroskop erkannt werden. Für die Detektion der apoptotischen Zellen wurde das *TUNEL Staining, In situ cell detection kit*, AP von Roche, Mannheim, D, benutzt. Das Kit beinhaltet drei Bestandteile: eine Enzymlösung, eine Markierungslösung und ein Konverterenzym.

Herstellung der Fixierlösung und der Permeabilitätslösung

Als erster Schritt erfolgte die Herstellung der Fixierlösung. Diese beinhaltete 100 ml PBS und 4 g Paraformaldehyd. Diese 4 %-Lösung wurde im Wasserbad bei 60 °C erhitzt. Es folgte die Herstellung der Permeabilitätslösung. Dabei wurden zu 50 ml ddH₂O 50 µl Triton X 100 und 50 mg Natriumzitat pipettiert. Die Permeabilitätslösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

Fixierung der Zellen

Die luftgetrockneten, stimulierten Zellen wurden mit 100 µl Fixierlösung pro ein well für eine Stunde inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Als nächster Schritt folgte die Inkubation in Permeabilitätslösung für zwei Minuten auf Eis (2-8 °C).

TUNEL-Färbung

Daraufhin wurde die TUNEL-Lösung hinzugegeben. Das Kit enthielt 50 µl Enzymlösung und 500 µl Markierungslösung. Aus der Markierungslösung wurden 50 µl für die Negativkontrolle bereitgestellt. Zu den verbleibenden 450 µl Markierungslösung wurden 50 µl Enzymlösung hinzu pipettiert, so dass insgesamt 500 µl TUNEL-Reaktionsgemisch vorlag. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit 50 µl Markierungslösung inkubiert. Als Positivkontrolle wurde DNase 1 benutzt. Die Fixierung der Zellen mit DNase 1 erfolgte für 10 Minuten bei 15-25 °C, um DNA-Strangbrüche zu induzieren.

Nun folgte ein Waschschrift der fixierten Zellen mit PBS. Nachdem die fixierten Zellen auf dem Glasplättchen getrocknet waren, wurden 50 µl TUNEL-Reaktionsgemisch hinzugegeben. 50 µl

Markierungslösung wurden zur Negativkontrolle hinzugefügt. Daraufhin sollten die auf dem Glasplättchen fixierten Zellen für 60 Minuten bei 37 °C in einer mit feuchten Tüchern ausgekleideten, geschlossenen Eisendose inkubiert werden, um ein dunkles, feuchtes Milieu zu erzeugen. Nach einer Stunde Inkubation wurde dreimal mit PBS gespült und die Proben konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 450 / 500 nm analysiert werden.

TUNEL-Methode in der Literatur

Die TUNEL-Methode wurde in der Literatur in Frage gestellt, da mit dieser Methode nicht eindeutig zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden kann [140]. Vor allem die Spezifität der TUNEL-Färbung wurde diskutiert. Die unspezifische Aktivierung von Endonukleasen während des nekrotischen Zelltodes könnte zu freien DNA-Enden führen, welche ebenfalls zu einem positiven Ergebnis in der TUNEL-Färbung führen könnten [141]. 2003 publizierten Kelly et al., dass mittels TUNEL-Färbung auch die freien Enden der DNA, wie sie im Rahmen der Nekrose vorkommen, detektiert werden könnten. Deshalb schlug die Arbeitsgruppe um Kelly vor, dass zusätzlich zu TUNEL auch eine Färbung mit Propidium Iodid erfolgen sollte, um die apoptotischen Zellen klar von den nekrotischen Zellen zu trennen [141]. Um unterscheiden zu können, ob der durch poly(dA:dT) induzierte Zelltod zur Apoptose oder zur Nekrose in Zellen führte, folgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Western Blot-Analysen, in denen festgestellt werden sollte, ob es zu einer Caspase-Aktivierung kommt oder nicht. Ersteres würde auf den programmierten Zelltod, die Apoptose, hindeuten.

TUNEL Staining

In situ cell detection kit, AP, Roche, Mannheim, D

Eine weitere Methode um Apoptose nachzuweisen, ist die Färbung mit Hoechst 33342 und Propidium Iodid (PI).

2.2.5 Western Blot

Der Western Blot ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. 1975 wurde von Edwin Southern das Blotting, die Übertragung von Proteinen von einem Gel auf eine Trägermembran, erstmals beschrieben [142]. Mittels Elektrophorese werden die Proteine auf dem Gel getrennt, daraufhin kommt es zur Übertragung der Proteine auf die Membran. Auf dieser Transfermembran können die gesuchten Proteine mittels Antikörper aufgespürt

werden. Schließlich erfolgt die Übertragung der Proteine von der Trägermembran auf einen Röntgenfilm.

Stimulation der Zellen

Zunächst wurden 500 000 Zellen auf je ein well der 12-well-Platte ausgesät. Nach zwei Tagen waren die Zellen 80 % konfluent. Für die Stimulation wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann in D-MEM Medium ohne Zusatz von FCS und PS inkubiert. Währenddessen wurden zwei Reihen von Eppendorf-Gefäßen vorbereitet, die getrennt mit Optimem und Lipofectamin bzw. mit Optimem und Stimulanz befüllt wurden. Als Stimulanz wurde poly(dA:dT) benutzt. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten wurde der Inhalt beider Eppendorf-Gefäße vermischt und auf das entsprechende well 50 µl Stimulanz pipettiert. Die stimulierten Zellen wurden 24 Stunden lang im Inkubationsbrutschrank aufbewahrt.

Lyse der Zellen zur Isolation der Proteine

Nach 24 Stunden Zellstimulation wurde das Stimulationsmedium entfernt und es folgte ein Waschschrift mit PBS. Nach dem Absaugen von PBS wurde Lysepuffer zur Lysierung der Zellen hinzugefügt. Der Lysepuffer enthielt folgende Bestandteile: 1 ml TRIS ph 8 + NaCl, 500 µl Glycerol, 500 µl NP40, 200 µl EDTA und 2 800 µl ddH₂O. Zu 1 ml Lysepuffer wurden 10 µl PMSF dazu pipettiert. Aus diesem Gemisch wurden 50 µl pro well der 12-well-Platte hinzu pipettiert. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Zellen auf Eis gekratzt, in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt und das Protein wurde bei -80 °C eingefroren. Daraufhin erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Zellen. Hierfür wurde der *Sonicator* verwendet, ein spezielles Gerät, welches mit Hilfe von Ultraschallwellen zur Freisetzung der Proteine aus der Zelle führt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Nun folgte der *Bradford Assay*. Dieser Assay wird durchgeführt um die Proteinkonzentration zu bestimmen. Es wurde in eine ELISA-Platte zunächst die Standardreihe pipettiert, bestehend aus 10 µl ddH₂O für den *Blank* und 9 µl ddH₂O mit 1 µl BSA, 8 µl ddH₂O mit 2 µl BSA usw. In der zweiten Spalte der ELISA-Platte wurden jeweils 9 µl ddH₂O und 1 µl Proteinprobe pipettiert. Die Analyse der Proteinkonzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung im *ELISA-Reader* (Absorption 620nm). Daraufhin wurde die Proteinkonzentration errechnet: Um einen aussagekräftigen Western Blot zu erhalten, sollten 30 µg / ml Protein geladen werden. Daher wurden alle errechneten Proteinkonzentrationen durch 30 geteilt und man erhielt dadurch die Menge an Protein, die für einen Western Blot verwendet wurde. Diese Zahl wurde wiederum

durch 4 geteilt, um die Menge des Ladepuffers zu erhalten, welcher zur Proteinmenge hinzugegeben werden mußte.

Gel

Um die Proteine im Polyacrylamid-Gel laufen zu lassen, wurden zunächst die Glasplatten der Western Blot-Kammer gereinigt. Daraufhin wurde zwischen den Glasplatten und den weißen Haltern eine Art von *Sandwich* gebildet, den man in die Kammer einbrachte. Nun wurde das Trenngel, das 2,4 ml ddH₂O, 5,0 ml Acrylamid, 2,5 ml Trennpuffer, 100 µl SDS, 50 µl APS, und 5 µl TEMED enthielt, pipettiert. Diese Angaben beziehen sich auf ein Gel. Das Trenngel wurde bis zur schwarzen Trennlinie in die Kammer einpipettiert. Um eine gerade Linie zu erzeugen, wurde darüber Isopropanol pipettiert. Es folgte das Sammelgel, welches 2,28 ml ddH₂O, 680 µl Acrylamid, 1 ml Sammelpuffer, 40 µl SDS, 30 µl APS, und 5 µl TEMED enthielt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde zunächst das Isopropanol entfernt und über das Trenngel wurde das Sammelgel pipettiert. In der Kammer befand sich nun im unteren Teil das bereits eingetrocknete Trenngel und im oberen Teil das noch flüssige Sammelgel. Daraufhin wurde ein Kamm in das Sammelgel eingebracht. Nach dem Erstarren des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und es blieben Laschen im Gel zurück.

Laden der Proben

Nun wurden die Eppendorf-Gefäße beschriftet und Protein sowie Ladepuffer in je ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 2 000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C zentrifugiert und bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Alle Proben wurden durchmischt und für 5 Minuten bei 65 °C im Thermomixer gewärmt. Die Proben sowie 1,3 µl je Magic und Pegold Marker wurden in die Laschen des Gels pipettiert und die gesamte Kammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt.

Laufen der Proteine

Die Stromspannung wurde auf 100 mV eingestellt und es wurde in die Kammer Laufpuffer eingefüllt. Der Laufpuffer enthielt TRIS 15 g, Glyzin 72 g, SDS 5 g, 1 000 ml ddH₂O. Der pH-Wert des Laufpuffers wurde auf 8,3 eingestellt. Zunächst ließ man die Proteine bei 100 mV laufen, bis sie die Trennlinie erreicht hatten. Daraufhin wurde die Stromspannung auf 150 mV eingestellt, bis die Proteine nach ca. zwei Stunden das Ende des Gels erreicht hatten. Durch Zugabe von Strom begannen die Proteine von der Kathode zur Anode zu laufen. Dabei waren kleine Proteine schneller als große Proteine. Als die Proteine das Ende des Gels erreicht hatten,

wurde das Laufen der Proteine gestoppt und man erhielt Banden von Proteinen unterschiedlicher kDa (KiloDalton)-Größe.

Transfer der Proteine

Nun folgte der Transfer der Proteine auf die PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran. Der obere Teil des Gels wurde entfernt und das Gel auf die PVDF-Membran gelegt. Über und unter dem *Sandwich* wurden noch je vier weiße *Whatman*-Papiere gelegt. Zuvor wurde das Gel in Transferpuffer (50 ml 10x Laufpuffer, 100 ml Methanol und 350 ml ddH₂O) eingeweicht und die PVDF-Membran zuerst in Methanol, dann ebenfalls in Transferpuffer eingelegt. Das Blotting-Gerät wurde auf 15 Volt / 400 mA für eine Stunde eingestellt. Der Strom lief von der Kathode zur Anode. Der Transfer der Proteine erfolgte vom Gel auf die PVDF-Membran. Auf Grund von hydrophoben Wechselwirkungen blieben die Proteine auf der PVDF-Membran haften.

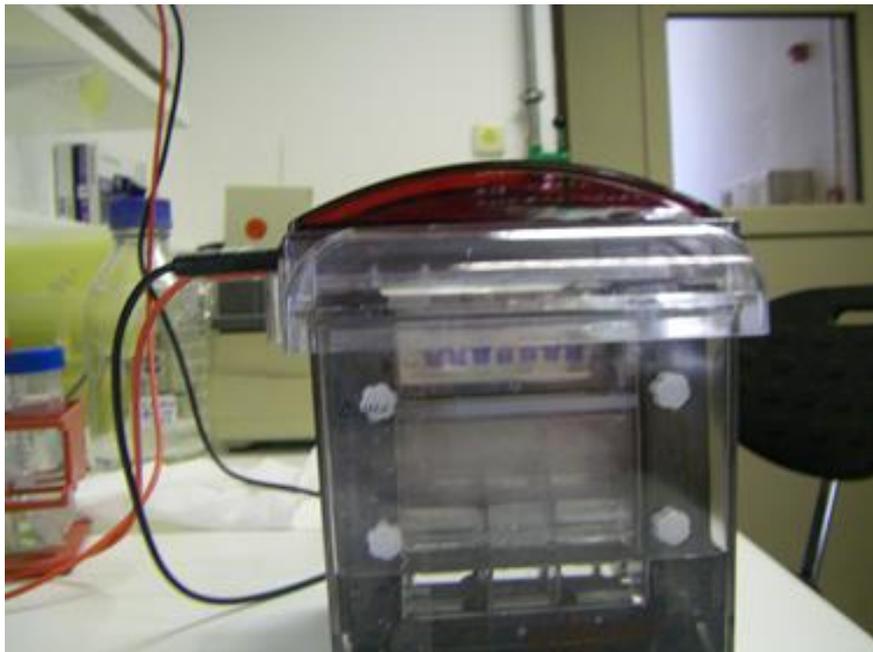




Abbildung 19: Laufen der Proteine. Die Proteine laufen in der Western Blot-Kammer von der Kathode zur Anode. Die Stromspannung betrug zunächst 100 mV.

Inkubation der Membran mit dem Primär- und dem Sekundärantikörper

Nun wurde das Gel verworfen und die PVDF-Membran benutzt. Zunächst wurde die PVDF-Membran mit TBS für 5 Minuten gewaschen. TBS enthielt 24,23 g TRIS, 80,06 g NaCl, 900 ml ddH₂O und der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt. Daraufhin wurde die Membran für drei Stunden in eine Blockierlösung inkubiert, bestehend aus 10 ml TBST (100 ml TBS, 1 ml Tween 20, 1 000 ml ddH₂O) und 500 mg BSA. Nun wurden 10 ml TBST oder Blockierlösung und 10 µl Primärantikörper (Verdünnung 1:1 000) verwendet und der Primärantikörper konnte über Nacht im Kühlraum einwirken. Der Primärantikörper bindet an das Protein auf der Membran. Am nächsten Tag wurde der Antikörper entfernt und die Membran zunächst viermal mit TBST für je 10 Minuten gewaschen. Dann wurden 10 ml Blockierlösung und 2 µl Sekundärantikörper (anti HRP-anti rabbit; Verdünnung 1:2 000 oder 1:5 000) hinzugefügt. Der Sekundärantikörper ist an Peroxidase gekoppelt und bindet an den Primärantikörper. Diese Lösung wirkte für eine Stunde ein. Daraufhin wurde die PVDF-Membran viermal 10 Minuten mit TBST und danach 10 Minuten lang mit TBS gewaschen.

Entwicklung des Western Blot

Die Entwicklung des Western Blot erfolgte im abgedunkelten Raum. Die Membran wurde in eine kleine Schale gelegt und es wurden 2 ml der Chemilumineszenz-Lösung 1 und 2 auf die

Membran pipettiert. Nach einigen Minuten wurde Chemilumineszenz hinzugegeben und zunächst der Verstärker aktiviert, was zur Belichtung des Röntgenfilms führte. Mit bloßem Auge waren grün fluoreszierende Banden schon vor der Entwicklung auf der Membran sichtbar. Der Röntgenfilm mit der in Folie verpackten Membran wurde für unterschiedliche Zeiträume belichtet. Nach der Entwicklung des Röntgenfilms zeigten sich die nach ihrer Größe getrennten Proteine auf dem Film.

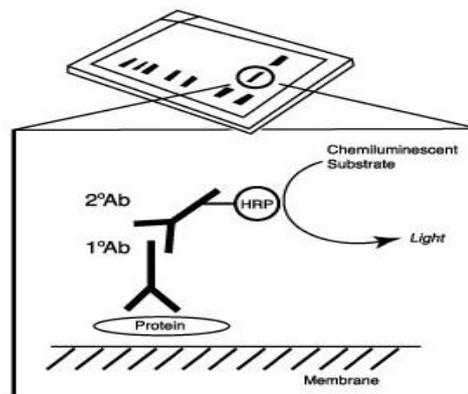


Abbildung 20: Western Blotting. Der Primärantikörper bindet an das Protein auf der Membran; der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist an die HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt; durch Zugabe von Chemolumineszenz kommt es zur Belichtung des Röntgenfilms. Die Proteine werden auf dem Röntgenfilm sichtbar [143].

Western Blotting:

Caspase 9 Antikörper	Cell Signaling 9504, Danvers, USA
Caspase 8 Antikörper	Cell Signaling 4927, Danvers, USA
Cleaved Caspase 9 Antikörper	Cell Signaling 9509, Danvers, USA
Cleaved Caspase 8 Antikörper	Cell Signaling 9429, Danvers, USA
Noxa Antikörper	Abcam ab 36833, Cambridge, USA
Noxa Antikörper	Biovision polyclonal antibody Milpitas, California, USA
Puma Antikörper	Abcam, ab 54288, Cambridge, US
Beta-Tubulin	Cell Signaling 2128, Danvers, USA

Beta-Actin Cell Signaling 4970, Danvers, USA

Weitere Reagenzien für das Western Blotting:

10 % Ammoniumpersulfat (APS) BioRad, München, Deutschland

10 % SDS BioRad, München, Deutschland

30 % Acrylamid Roth, Karlsruhe, Deutschland

β -Mercaptoethanol Roth, Karlsruhe, Deutschland

Bio-Rad Protein Assay BioRad, München, Deutschland

Bovines Serum-Albumin (BSA) Roche, Mannheim, Deutschland

ECL (Chemolumineszenz) NEN TM, Life Science Prod, Boston, USA

ECL Rabbit-IgG HRP-linked
(Sekundärantikörper) GE Healthcare, München, Deutschland

EDTA Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycerol Roth, Karlsruhe, Deutschland

HCL Merck, Darmstadt, Deutschland

Methanol Merck, Darmstadt, Deutschland

Ponceau S Roth, Karlsruhe, Deutschland

Standard peg GOLD Protein Marker PeqLab, Erlangen, Deutschland

TEMED BioRad, München, Deutschland

Tris Roth, Karlsruhe, Deutschland

Triton X-100 Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Tween 20 Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

2.2.6 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie (Zytometrie, Zellvermessung; FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) können Zellen und Mikropartikel anhand ihrer Größe, Struktur und ihres Energieniveaus unterschieden werden. Dabei werden bis zu 1 000 an ein Fluorochrom gekoppelte Zellen pro Sekunde einzeln an einem Laser vorbeigespült. Die markierten Zellen werden im Durchflusszytometer vom Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau angeregt. Die angeregten Zellen emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, das vom FACS-Gerät detektiert wird. Nach der Passage der Zellen im Laserlicht fallen die Zellen wieder auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück. Die emittierte Differenz der Photonenkonzentration wird vom FACS-Gerät detektiert und ist direkt proportional zur Menge der mit Fluorochrom gekoppelten Zellen. Somit können durch die an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper (Fluorochrome) sowohl die Anzahl der Zellen als auch deren Eigenschaften ermittelt werden. Zusätzlich können durch das Vorwärtstreuilight die Zellgröße und über das Seitwärtstreuilight die Granularität der Zellen beurteilt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um die Anzahl apoptotischer Zellen zu bestimmen. Hierbei wurden die Zellen mit Annexin V gefärbt. Phosphatidylserin befindet sich bei lebenden Zellen an der Innenmembran. Annexin V kann Phosphatidylserin, welches auf der Außenmembran apoptotischer Zelle exprimiert wird, binden. Lebende Zellen sind Annexin V negativ und Propidium Iodid negativ, frühapoptotische Zellen sind Annexin V positiv und Propidium Iodid negativ und Zellen in später Apoptose oder Nekrose sind Annexin V positiv und Propidium Iodid positiv. Propidium Iodid dringt nur in Zellen mit zerstörter Zellmembran ein [144].

Zunächst wurde für die FACS-Färbung der Bindepuffer vorbereitet. Dieser bestand aus 1 ml Bindepuffer und 9 ml PBS. Von den 6 bzw. 24 Stunden mit poly(dA:dT) sowie 24 Stunden mit poly(dA:dT) und Caspase 8-Inhibitor und mit poly(dA:dT) und Caspase 9-Inhibitor stimulierten Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig abgeschabt. Nun wurden die Zellen für 5 Minuten bei 2 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 125 µl Bindepuffer resuspendiert. Von diesem Gemisch wurden je 100 µl in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Nun wurden 5 µl Annexin V-FITC zu den Zellen hinzugegeben. Nach 15 Minuten wurden 400 µl Bindepuffer in das FACS-Röhrchen pipettiert.

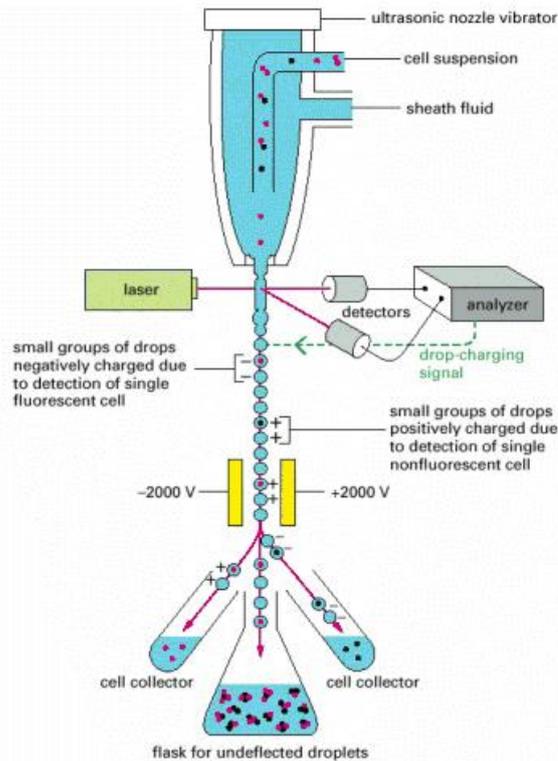


Abbildung 21: FACS-Gerät. Das Verfahren der Durchflusszytometrie wurde 1968 von Wolfgang Göhde an der Universität Münster entwickelt [145]. Die an ein Fluorochrom (Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff) gekoppelten Zellen werden an einem Laserstrahl vorbeigespült. Durch den Laser erhalten die Zellen ein höheres Energieniveau. Nachdem die Zellen den Laserstrahl passiert haben, fallen die Zellen wieder auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück. Diese energetische Differenz wird vom FACS-Gerät detektiert. Mittels Färbung mit Annexin V und Propidium Iodid können die Zellen auf Apoptose untersucht werden [146].

Kurz vor der Analyse wurden 2 µl Propidium Iodid hinzugefügt. Die FACS-Analyse wurde mittels FACSCalibur-Gerät und CellQuest Software von BD Biosciences durchgeführt.

Caspase Inhibitor 8 Z-IETD-FMK	Calbiochem, Gibbstown, The Netherlands
Caspase Inhibitor 9 Z-LEHD-FMK	Calbiochem, Gibbstown, The Netherlands
Annexin V Bindepuffer	BD, Heidelberg, Deutschland
Annexin V-FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
Propidium Iodide Staining Solution	BD, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's PBS 1x	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Annexin PI	Invitrogen FACS Leiden, The Netherlands

Umschreiben von mRNA in cDNA

Zunächst erfolgte das Umschreiben der RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA). RNA kann nicht als Vorlage in der Polymerase-Kettenreaktion benutzt werden und muss deshalb zunächst in cDNA umgeschrieben werden. David Baltimore und Howard Temin entdeckten 1970 das Enzym Reverse Transkriptase in RNA-Viren und wurden hierfür 1975 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet [147]. Primer binden dabei an die RNA und werden an ihrem 3'-OH-Ende komplementär zur Matrize verlängert. Es wurde ein RNase-Inhibitor hinzugefügt, um den Abbau der RNA durch RNasen zu verhindern. Die synthetisierte cDNA kann für die weitere Amplifikation im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden.

Für die Umschreibung von RNA in cDNA wurde zunächst die Menge an Wasser errechnet, die für die Verdünnung der RNA-Proben nötig war. Bei kleinen RNA-Werten wurde 1 000 / RNA-Wert, bei hohen RNA-Werten 2 000 / RNA-Wert berechnet. Zur Kontrolle einer Amplifizierung von genomischer DNA wurden auch RT- Proben hergestellt, die nicht das Enzym Reverse-Transkriptase enthielten. Der Master Mix wurde aus den folgenden Bestandteilen hergestellt: 4,5 µl Puffer, 1,0 µl DTT, 0,5 µl dNTP, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 0,5 µl Acrylamid und 0,5 µl Hexamer. Nur zu den RT+ Proben wurde das Reverse-Transkriptase-Enzym (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany) hinzugefügt. Zu den RT- Proben wurden 7 µl des RT- Mix, zu den RT+ Proben wurden 7,5 µl des RT+ Mix hinzugefügt. Die RT+ und die RT- Proben wurden für eine Stunde und 30 Minuten bei 42 °C auf einem Schüttler inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA Proben bei -20 °C aufbewahrt.

0,1 M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
15 µg / ml Linear Acrylamid	Ambion Darmstadt, Deutschland
25 nM dNTPS	dNTP-Set, GE Healthcare, München, Deutschland
40 U/µL rNasin	Promega, Mannheim, Deutschland
5*First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase Set	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Hexanukleotide	Roche, Mannheim, Deutschland
Mops	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
RNA Sample Loading Buffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.2.8 Quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1987 von Kary B. Mullis beschrieben [148]. Mittels der Polymerase-Kettenreaktion können Nukleotide millionenfach vervielfältigt werden. Die DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von einer DNA-Vorlage einer einzelsträngigen Nukleinsäure einen neuen DNA-Doppelstrang. Hierbei soll das Oligonukleotid-Primerpaar gegenläufig orientiert sein. Durch die fortwährende Wiederholung kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der Matrize zwischen den beiden Oligonukleotid-Primern. Damit die doppelsträngige DNA in eine Einzelstrang-DNA-Vorlage gespalten werden kann, sind während der Polymerase-Kettenreaktion sehr hohe Temperaturen notwendig. Deshalb wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase verwendet [149].

Während der qRT-PCR werden Oligonukleotide an Fluorochrome gekoppelt. Das gemessene Signal durch die Fluorochrome ist direkt proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Als Fluoreszenzdetektoren gibt es mehrere Alternativen: Die *TaqMan*-Sonde hat einen *Reporter*, welcher fluoresziert, und einen *Quencher*, welcher die Fluoreszenz des Reporters hemmt. Die *TaqMan*-Polymerase trennt den *Reporter* vom *Quencher*. Dadurch kann der *Reporter* fluoreszieren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Donor-Sonde an die Akzeptor-Sonde hybridisiert, was zum Fluoreszenz-Signal führt. Dieses Verfahren wird als FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) bezeichnet. Außerdem wird die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) auch mittels des Fluoreszenzmarkers *SYBR-Green-I* durchführt. *SYBR-Green-I* wird dabei in die Doppelhelix der DNA eingelagert. Die Analyse erfolgt mittels *LightCycler Detection-System*.

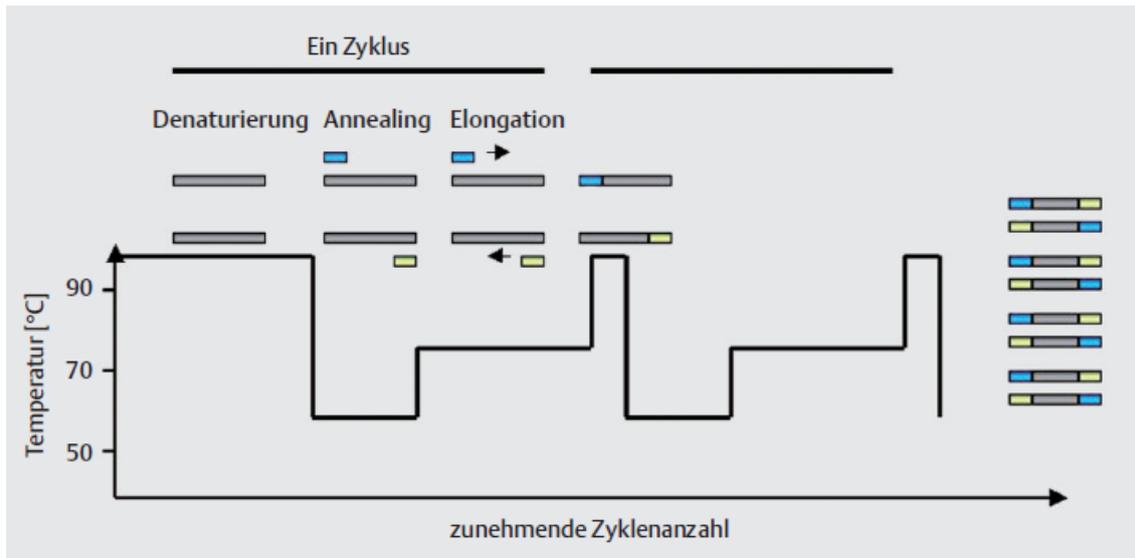


Abbildung 22: Die Polymerase-Kettenreaktion. Zunächst kommt es zur Denaturierung der Doppelstrang-DNA in zwei einzelsträngige DNA-Stränge. Daraufhin binden die synthetischen Oligonukleotid-Primer an die einzelsträngige DNA. Dieser Schritt wird als Annealing bezeichnet. Die zwischen den beiden synthetischen Oligonukleotiden liegende Matrize wird nun vervielfältigt. Dabei bindet die DNA-Polymerase an diejenige DNA, welche als Vorlage dient, und synthetisiert beginnend von einem Oligonukleotid bis zum nächsten Oligonukleotid die komplementäre Doppelstrang-DNA. Dieser Schritt wird als Elongation bezeichnet. Diese Zyklen werden wiederholt, so dass es zu einer millionenfachen Vervielfältigung kommt [150].

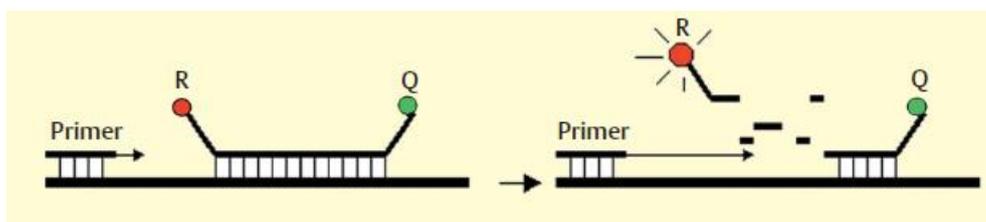


Abbildung 23: TaqMan. Die Fluoreszenz des Reporters (R) wird durch den Quencher (Q) gehemmt. Bei Elongation durch die TaqMan-Polymerase wird auf Grund ihrer Exonuklease-Aktivität der Reporter vom Quencher entfernt. Der Reporter kann nicht mehr durch den Quencher gehemmt werden und fluoresziert [150].

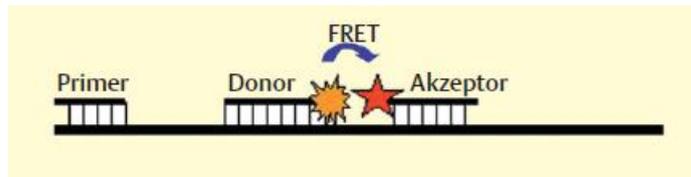


Abbildung 24: FRET. Zwei Sonden, Donor und Akzeptor hybridisieren zueinander. Dadurch kommt es zu einer Fluoreszenzübertragung des Donors auf den Akzeptor. Die Akzeptorfluoreszenz steigt proportional mit der Konzentration komplementärer DNA an [150].

SYBR-Green-I

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Quantifizierung der mRNA-Expression die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde das Gerät *SYBR-Green Dye Detection System*, LightCycler 480 (Roche, Mannheim Germany) verwendet. Der Vorteil der qRT-PCR besteht im Gegensatz zur konventionellen PCR darin, dass in Echtzeit eine Quantifizierung durchgeführt werden kann. Mithilfe von Fluoreszenzmolekülen wie *SYBR-Green-I* kann während der PCR die Quantifizierung erfolgen. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Anzahl der PCR-Produkte. Der *SYBR-Green*-Farbstoff lagert sich in die doppelsträngige DNA ein und reagiert mit der Zielsequenz. Unter ungünstigen Bedingungen reagiert das Fluorochrom jedoch auch mit *Primer-Dimern* und mit den PCR-Produkten. Die *SYBR-Green*-Technik hat eine hohe Sensitivität und eine geringe Spezifität. Die Spezifität kann durch eine Schmelzpunktanalyse am Ende des PCR-Zyklus überprüft werden.

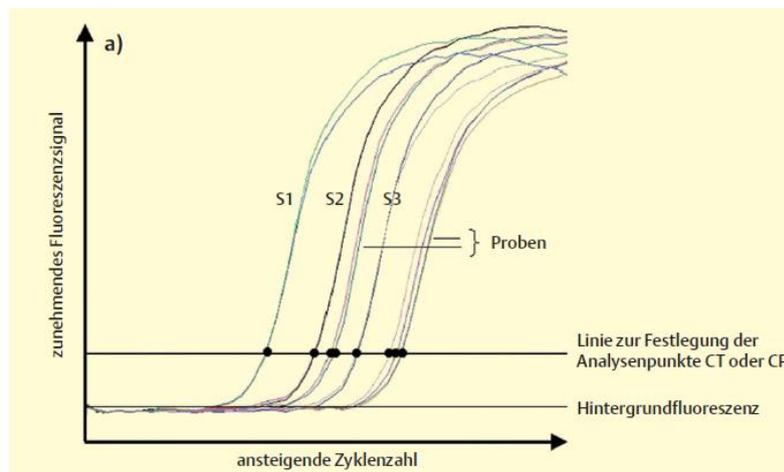


Abbildung 25: LightCycler. Beispiel von Fluoreszenzkurven von Standards S1, S2, S3 und von Proben mittels LightCycler, Roche, Mannheim, Deutschland. Die detektierbare Fluoreszenz kann dabei in Echtzeit aufgefasst werden. Die Software errechnet die Analysepunkte CT oder CP sowie die Standardkurven S1, S2, S3 [150].

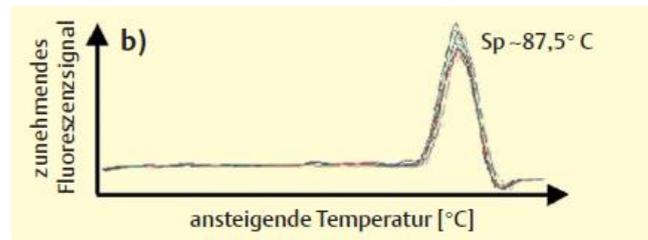


Abbildung 26: Schmelzpunktanalyse. Um Primer-Dimer-Bildung auszuschließen wird der Schmelzpunkt analysiert. In der Graphik erscheint der Anstieg des Schmelzpunktes nur im Zielgen. Wären Primer-Dimer vorhanden gewesen, hätte es bei niedrigeren Schmelzpunkten $< -87,5^{\circ}\text{C}$ einen weiteren Anstieg gegeben [150].

Zu Beginn der PCR existieren nur wenige Zielsequenzen. Am Ende der PCR ist die Anzahl der Zielsequenzen so hoch, dass es durch die Hybridisierung der Zielsequenzen zu einer Hemmung der PCR kommt. Ähnlich einer kompetitiven Hemmung wird eine Plateauphase erreicht. Zwischen Startphase und Plateau befindet sich die exponentielle Phase, in der die Zielsequenz exponentiell vervielfältigt wird. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundfrequenz ansteigt, wird als CP (*Crossing Point*) im Rahmen der *LightCycler*-Methode bezeichnet. Bei der *TaqMan*-Methode wird er hingegen als CT (*Threshold Cycle*) oder Schwellenwert bezeichnet [150]. Es wurde die relative Quantifizierung eingesetzt, welche das relative Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz bestimmt. Dazu wurde das *Housekeeping*-Gen 18s verwendet. Um die relative Genexpression zu erhalten, wurde die sogenannte $\Delta\text{-}\Delta\text{-CT}$ -Methode verwendet.

Zur Durchführung der quantitativen *real time* PCR wurden die cDNA-Proben 1:10 verdünnt. In die 96-well-Platte wurden je 18 μl Master Mix und je 2 μl cDNA pipettiert. Die Platte wurde mit Folie verschlossen und bei 1 000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Bei der darauffolgenden Analyse im *LightCycler 480* wurden folgende Temperatureinstellungen verwendet: zwei Minuten bei 50 $^{\circ}\text{C}$, 10 Minuten bei 95 $^{\circ}\text{C}$, 40 Zyklen je 15 Sekunden bei 95 $^{\circ}\text{C}$ gefolgt von einer Minute Inkubation bei 60 $^{\circ}\text{C}$. Die CP-Werte wurden mittels *Light-Cycler-Software* aufgezeichnet und im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen berechnet. Als interne Kontrolle, um die Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ebenfalls für die RT-Proben die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Um das Risiko eines falsch positiven CP-Wertes auszuschließen, wurde der Hochkonfidenz-Algorithmus benutzt. Die Schmelzkurven wurden für jede Probe analysiert, um unspezifische Produkte und *Primer Dimer* zu erkennen.

Die verwendeten Primer wurden von Metabion, Martinsried, Deutschland bezogen.

Referenzen:

18s rRNA Forward: 5'-GCAATTATTCCTCCATGAACG-3'

Reverse: 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

Primer für die Ratte:

MDA-5F- 5'-TTGCTGATGACACCAGAGAGAATCC -3'

MDA-5R- 5'-GTCGGTGTAGAACGTTTCCAGGTG -3'

MX1F- 5'-TGCCTACTACCAGGAGTGCGGA -3'

MX1R- 5'-GCTCAGTCAGGAACCAGTTGCAC -3'

OASL2F- 5'-CGAGGAGCGAGGGACGTTTCAG -3'

OASL2R- 5'-CGACAGGGTTTTCCGGCCAC -3'

RIG-IF- 5'-CCCACTACTGTGCTTGGAGATG -3'

RIG-IR- 5'-TGCCGGTTCTGAACTCCACTCTC -3'

IFIT1F- 5'-CTGGTGACCTGGGGCAACTGTG -3'

IFIT1R- 5'-GCGATAGGCCACAACACTGCATAGCC -3'

IFN-βF- 5' CCACCACTGCCCTCTCCATCG -3'

IFN-βR- 5'ACTCTTCTCCATCTGTGACGGGTGC -3'

CXCL10F- 5'- GAGCCCAGCCACATCCCGAG -3'

CXCL10R- 5'- TGCAGCGCACCGTTCTTGC -3'

IL-6F- 5'- AGGAACGAAAGTCAACTCCATCTGC -3'

IL-6R- 5'- AGTGCATCATCGCTGTTTCATACAATC -3'

INS-1F-5'-ACC CAA GTC CCG TCG TGA AGT G-3'

INS-1R-5'-TCC AGT GCC AAG GTC TGA AGA TCC-3'

Primer für die Maus:

CXCL10F-5'-GGCTGGTCACCTTTCAGAAG-3'

CXCL10R-5'-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3'

IFIT1F-5'-CAAGGCAGGTTTCTGAGGAG-3'

IFIT1R-5'-GACCTGGTCACCATCAGCAT-3'

IFN- β F-5'-CCCTATGGAGATGACGGAGA-3'

IFN- β R-5'-CCCAGTGCTGGAGAAATTGT-3'

MX1-F-5'-GACCATAGGGGTCTTGACCAA-3'

MX1-R-5'-AGACTTGCTCTTTCTGAAAAGCC-3'

OASL2-F-5'-TCTGTTGCACGACTGTAGGC-3'

OASL2-R-5'-GTGTCCAATCCACTGTTCCC-3'

IL6-F-5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'

IL6-R-5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'

RIG-IF-5'-CTGCCTCACTCTTCTCCAG-3'

RIG-IR-5'-TGGCTTCACAAAGTCCACAG-3'

MDA-5F-5'-GCCTGGAACGTAGACGACAT-3'

MDA-5R-5'-TCATCGAAGCAGCTGACACT-3'

2.2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte dargestellt. Als Fehlerindikator wird der Standardfehler (*standard error of the mean, SEM*) angegeben, welcher sich aus dem Quotienten der Standardabweichung (*standard deviation, SD*) und der Wurzel aus der Anzahl der Beobachtungen errechnet. Der Vergleich zwischen zwei unabhängigen Gruppen erfolgte mittels *Student's t-Test* und der Vergleich zwischen drei unabhängigen Gruppen mittels *one-way ANOVA (analysis of variance)*-Test. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Software (version 5.0, Graph Pad, San Diego, CA).

Kapitel 3: Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von poly(dA:dT) auf MIN6-Zellen

3.1.1 Poly(dA:dT) induziert die Expression von zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren in MIN6-Zellen

Die zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren des innaten Immunsystems können durch Interferone hochreguliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das virale dsDNA-Analogon poly(dA:dT) RIG-I und MDA-5 hochreguliert. Nach 12-, 18- und 24-stündiger Stimulation mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, wurden quantitative *real time* PCR-Experimente durchgeführt. Nach 24-stündiger Stimulation mit dem dsDNA-Analogon zeigte sich eine signifikante Hochregulation der zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren.

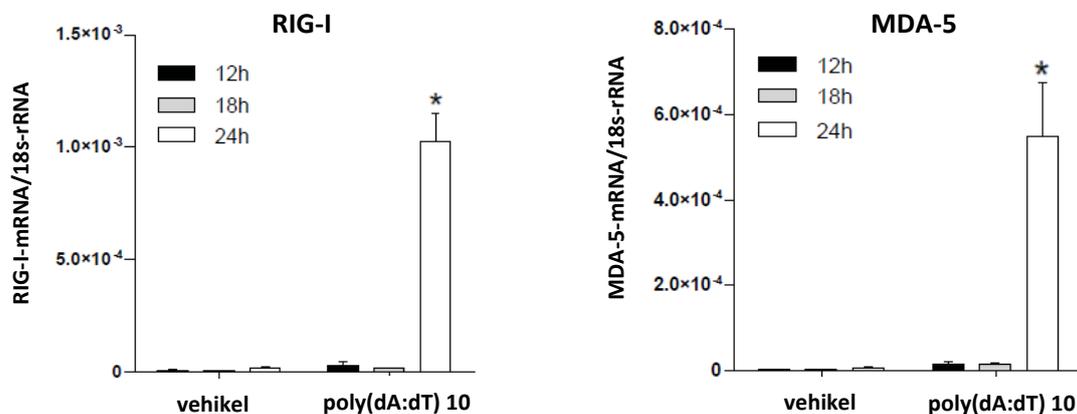


Abbildung 27: Hochregulation der zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren RIG-I und MDA-5 in MIN6-Zellen. MIN6-Zellen wurden für 12, 18 und 24 Stunden mit dem synthetischen Doppelstrang-DNA-Analogon poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Nach 12-, 18- und 24-stündiger Inkubation wurde die qRT-PCR für die zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren MDA-5 und RIG-I durchgeführt. Diejenigen Zellen, welche 24 Stunden mit poly(dA:dT) in Konzentration 10 µg/ml inkubiert worden sind, zeigten eine signifikante Hochregulation der zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren. Die Werte von RIG-I-mRNA und MDA-5-mRNA wurden zu 18s-rRNA ins Verhältnis gesetzt. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

3.1.2 Poly(dA:dT) induziert die Expression von Typ I-Interferon IFN- β und Typ I-Interferon-induzierten Genen in MIN6-Zellen

Typ I-Interferone hemmen die Virusreplikation in der Zelle und aktivieren das innate und das adaptive Immunsystem. Typ I-Interferone binden an den Interferon-Rezeptor und aktivieren den JAK-STAT-1-Signalweg, welcher zu Apoptose der Virus-infizierten Zelle führt. Die Apoptose der Virus-infizierten Zelle ist der letzte Ausweg, um eine weitere Virusvermehrung zu verhindern. Typ I-Interferone aktivieren dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, welche T- und B-Lymphozyten stimulieren [46]. IFN- β (Interferon- β) gehört zur Gruppe der Typ I-Interferone und wirkt antiviral. Um festzustellen, ob das dsDNA-Analogon poly(dA:dT) zur Hochregulation von IFN- β führt, wurden MIN6-Zellen für unterschiedliche Zeitspannen mit poly(dA:dT) stimuliert. Dabei wurde poly(dA:dT) mit kationischen Lipiden komplexiert, damit poly(dA:dT) in das Zytosol gelangen und die zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren aktivieren kann. MIN6-Zellen wurden für 12, 24 und 48 Stunden mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, inkubiert. Anschließend wurde die mRNA-Konzentration in qRT-PCR-Experimenten von IFN- β gemessen. Hierbei zeigte sich, dass es ab einer Stimulationsdauer von 12 Stunden mit poly(dA:dT) zu einem signifikanten Anstieg von IFN- β kam. Bei einer Stimulationsdauer von 24 Stunden kam es zu einer Plateauphase, bei 48-stündiger Stimulation war nur ein leichter Anstieg der mRNA-Expression von IFN- β zu verzeichnen.

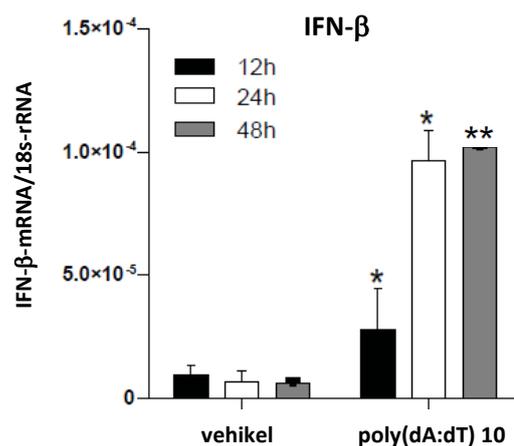


Abbildung 28: Hochregulation von IFN- β nach Stimulation mit poly(dA:dT). MIN6-Zellen wurden für 12, 24 und 48 Stunden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, inkubiert. Nach 12-, 24- und 48-stündiger Inkubation kam es zu einer signifikanten Hochregulation von IFN- β . Dargestellt wird das Verhältnis von IFN- β -mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel, ** $p < 0.01$ vs. vehikel.

Typ 1 Interferon-induzierte Gene

IFIT1 (*Interferon induced with tetratricopeptide repeats 1*) ist ein Interferon-induziertes Gen und wurde erstmals 1983 beschrieben. IFIT1 gehört zur ISG56/P56-Familie und liegt auf Chromosom 10. Die Funktion von IFIT1/P56 liegt in der Hemmung der viralen Replikation [100]. Um nachzuweisen, ob poly(dA:dT) IFIT1/P56 in MIN6-Zellen hochregulieren kann, wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt.

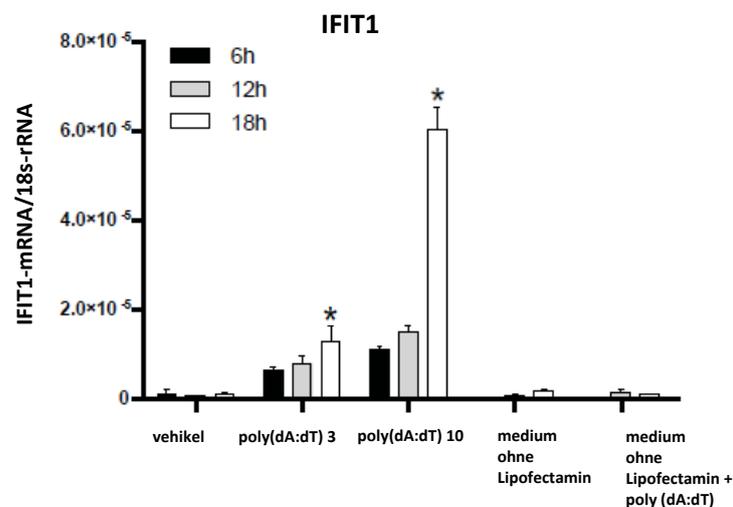


Abbildung 29: Poly(dA:dT) induziert die Hochregulation von IFIT1/P56 in MIN6-Zellen. MIN6-Zellen wurden 6, 12 und 18 Stunden mit poly(dA:dT), mit kationischen Lipiden komplexiert, in Konzentration 3 µg/ml und 10 µg/ml stimuliert. Nach 18-stündiger Stimulation zeigte sich in Konzentration 3 µg/ml und 10 µg/ml eine signifikante Hochregulation von IFIT1/P56. Als Negativkontrollen dienten zusätzlich medium und poly(dA:dT) ohne Transfektionsreagenz. Dargestellt wird das Verhältnis von IFIT1-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

MX-Proteine werden ebenfalls durch Interferone induziert und spielen in der antiviralen Immunantwort eine wichtige Rolle [93]. Um herauszufinden, ob das dsDNA-Analogon MX1 in MIN6-Zellen induziert, wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt. Dabei wurden MIN6-Zellen für 12, 18 und 24 Stunden mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Nach 24-stündiger Stimulation kam es zu einer signifikanten Expression von MX1.

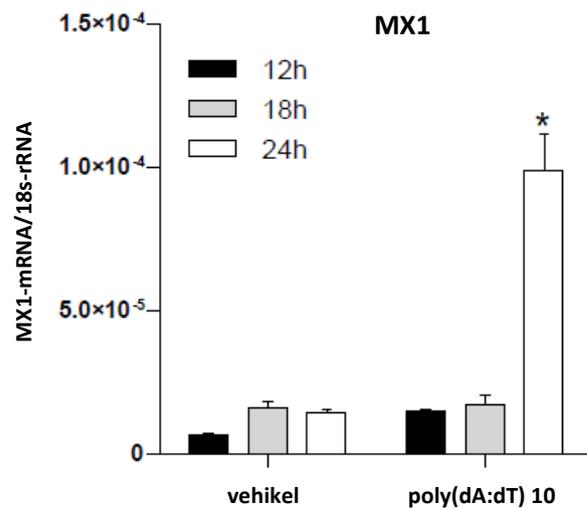


Abbildung 30: Hochregulation von MX1 nach Stimulation mit poly(dA:dT) in MIN6-Zellen. Das dsDNA-Analogon poly(dA:dT) in Konzentration 10 µg/ml, komplexiert mit kationischen Lipiden, induzierte nach 24-stündiger Stimulation eine signifikante Hochregulation von MX1. Dargestellt wird das Verhältnis von MX1-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

OASL2 (*2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2 protein*) ist ebenfalls ein Interferon-induziertes Protein. Die durch Interferone induzierten *2'-5'-oligoadenylate synthetases* (OAS) enthalten vier Gene: OAS1, OAS2, OAS3, und OASL [97]. OASL2 aktiviert die antivirale Endoribonuklease RNaseL, welche virale Nukleotide spaltet um die Virus-Replikation zu hemmen [151]. Die kleinen RNA-Produkte verstärken die Produktion von Typ I-Interferonen über RIG-I und MDA-5 im Sinne einer positiven Rückkopplung [98]. OASL2 aktiviert Apoptose in Virus-infizierten Zellen.

Um herauszufinden, ob poly(dA:dT) OASL2 in MIN6-Zellen aktiviert, wurden MIN6-Zellen für 12, 18 und 24 Stunden mit poly(dA:dT) in Konzentration 10 µg/ml stimuliert. Nach 24-stündiger Stimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von OASL2.

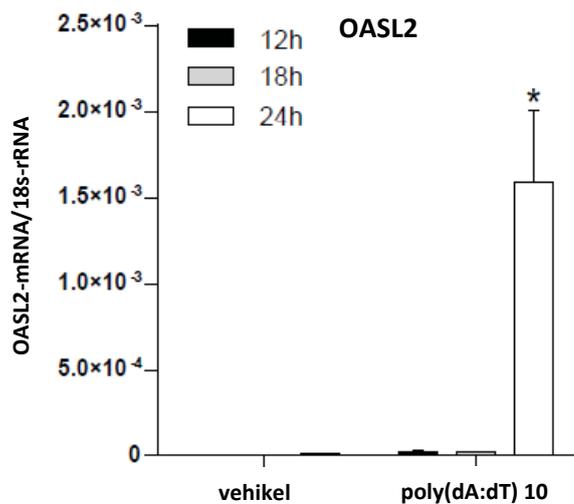


Abbildung 31: Hochregulation von OASL2 nach Stimulation mit poly(dA:dT) in MIN6-Zellen. MIN6-Zellen wurden für 12, 18 und 24 Stunden mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, inkubiert. Nach 24-stündiger Stimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von OASL2. Dargestellt wird das Verhältnis von OASL2-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

3.1.3 Poly(dA:dT) induziert die Expression von Chemokin CXCL10 in MIN6-Zellen

CXCL10 (CXC-Chemokine ligand 10) wird auch als IP-10 (Interferon- γ induced protein 10kDa) oder *small-inducible cytokine B10* bezeichnet. CXCL10 gehört zur CXC-Chemokin-Familie. CXCL10 bindet an seinen Rezeptor CXCR3 und induziert Chemotaxis, das Heranlocken von Makrophagen an die Beta-Zelle, und Apoptose [152]. CXCL10 ist das dominante Chemokin, welches im Virus-induzierten Typ 1 Diabetes-Maus-Modell und bei Typ 1 Diabetikern im Menschen eine Rolle spielt [153].

MIN6-Zellen wurden 6, 12 und 18 Stunden mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. CXCL10-mRNA wurde in qRT-PCR-Experimenten nachgewiesen. Nach 18-stündiger Stimulation kam es zum signifikanten Anstieg der Expression von CXCL10. Als Negativkontrollen dienten zusätzlich Medium und poly(dA:dT) ohne Transfektionsreagenz.

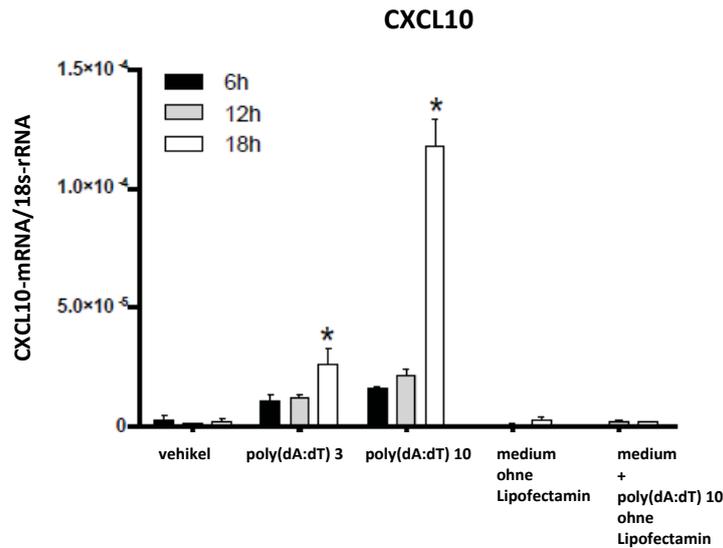


Abbildung 32: Hochregulation von CXCL10 nach Stimulation mit poly(dA:dT) in MIN6-Zellen. MIN6-Zellen wurden mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, in zwei verschiedenen Konzentrationen 3 µg/ml und 10 µg/ml für 6, 12 und 18 Stunden stimuliert. Nach 18-stündiger Stimulation zeigte sich eine signifikante Hochregulation von CXCL10. 10 µg/ml poly(dA:dT) erzeugte im Vergleich zu 3 µg/ml einen deutlichen Anstieg der Expression von CXCL10 nach 18-stündiger Stimulation. Die Hochregulation des Chemokins erfolgte zeit- und konzentrationsabhängig. Ohne Zugabe von kationischen Lipiden kam es dagegen nicht zur Hochregulation von CXCL10. Dargestellt wird das Verhältnis von CXCL10-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

3.2 Effekte von poly(dA:dT) auf INS-1-Zellen

3.2.1 Poly(dA:dT) induziert die Expression des zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptors RIG-I in INS-1-Zellen

In den vorausgegangenen Versuchen wurden MIN6-Zellen mit poly(dA:dT) stimuliert. Nun sollte die Aussagekraft der Ergebnisse noch in einer anderen Zelllinie überprüft werden. Deshalb wurden die aus der Ratte gewonnenen INS-1-Zellen mit poly(dA:dT) und kationischen Lipiden stimuliert. Wie schon erwähnt können zytosolische Erkennungsrezeptoren des innate Immunsystems durch Interferone und PAMPs, wie virale Bestandteile, hochreguliert werden. Kann das virale Analogon poly(dA:dT) RIG-I hochregulieren? Nach 6-, 12- und 18-stündiger Stimulation mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, wurden qRT-PCRs durchgeführt. Nach 12- und 18-stündiger Stimulation mit dem dsDNA-Analogon zeigte sich eine signifikante Hochregulation des zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptors RIG-I in INS-1-Zellen.

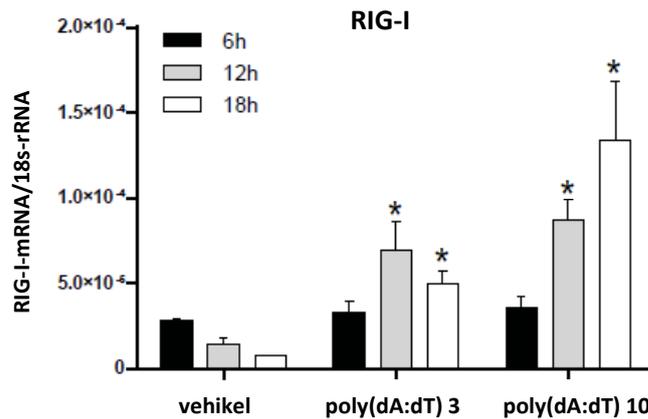


Abbildung 33: Hochregulation von RIG-I in INS-1-Zellen. INS-1-Zellen wurden für 6, 12 und 18 Stunden mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, in Konzentration 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Dabei kam es nach 12- und 18-stündiger Inkubation mit dem dsDNA-Analogon zu einer signifikanten Hochregulation von RIG-I. Dargestellt wird das Verhältnis von RIG-I-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

Es zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige Hochregulation des zytosolischen Pathogenrezeptors RIG-I. Demnach könnte RIG-I in der Erkennung von poly(dA:dT) in INS-1-Zellen eine Rolle spielen.

3.2.2 Poly(dA:dT) induziert die Expression von Typ I-Interferon IFN- β und Typ I-Interferon-induzierten Genen in INS-1-Zellen

Poly(dA:dT) führte in murinen MIN6-Zellen zur IFN- β -Expression. Um herauszufinden, ob ein ähnliches Ergebnis in Ratten-Zellen erzielt wird, wurden INS-1-Zellen mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, in Konzentrationen 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ für 6, 12 und 18 Stunden stimuliert.

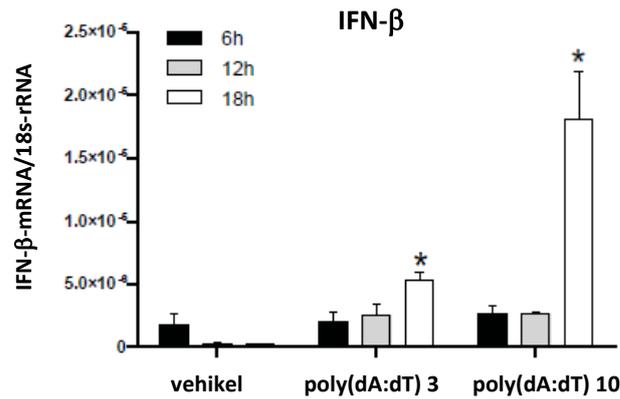


Abbildung 34: Hochregulation von IFN- β in INS-1-Zellen. Die Stimulation der INS-1-Zellen mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, führte nach 18-stündiger Inkubation zu einer signifikanten Hochregulation des Typ I-Interferons IFN- β . Dargestellt wird das Verhältnis von IFN- β -mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

Typ I-Interferon-induzierte Gene

Poly(dA:dT) führte in MIN6-Zellen zur Hochregulation von IFIT1/ISG56/P56. Nun wurden INS-1-Zellen für 6, 12 und 18 Stunden stimuliert und qRT-PCR-Experimente durchgeführt. Bei den Stimulationsexperimenten wurden zwei verschiedene Konzentrationen, poly(dA:dT) 3 $\mu\text{g/ml}$ und poly(dA:dT) 10 $\mu\text{g/ml}$ benutzt. Nach 12- und 18-stündiger Stimulation in Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$ kam es zu einer signifikanten mRNA-Expression von IFIT1.

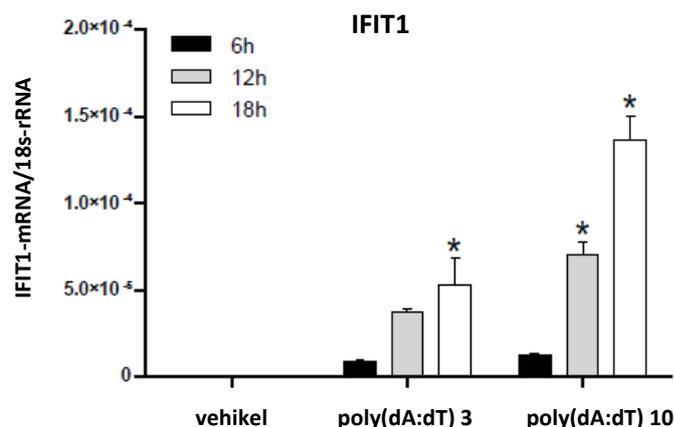


Abbildung 35: Hochregulation von IFIT1 in INS-1 Zellen. Die 12- und 18-stündige Inkubation mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, führte zu einer signifikanten Hochregulation von IFIT1. Dargestellt wird das Verhältnis von IFIT1-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

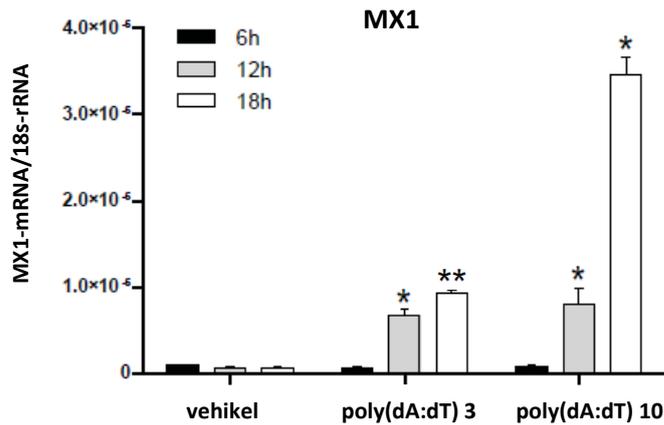


Abbildung 36: Hochregulation von MX1 in INS-1-Zellen. Poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, induzierte eine signifikante Expression von MX1 nach 12- und 18-stündiger Stimulation in INS-1-Zellen. Dargestellt wird das Verhältnis von MX1-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel, ** $p < 0.01$ vs. vehikel.

Um herauszufinden, ob poly(dA:dT) MX1 in INS-1-Zellen induziert, wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt. Dabei wurden INS-1-Zellen für 6, 12 und 18 Stunden mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Nach 12- und 18-stündiger Stimulation kam es zu einer signifikanten Expression von MX1.

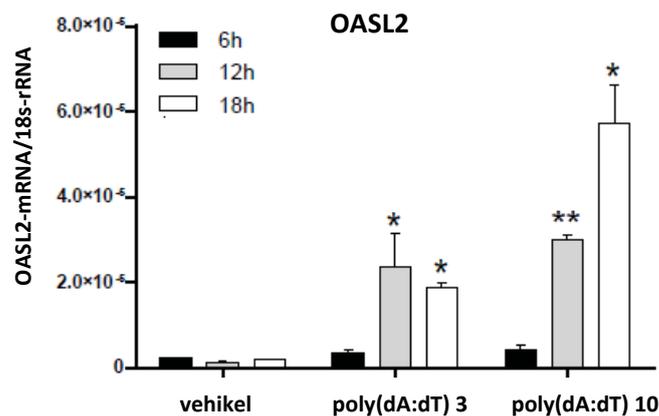


Abbildung 37: Hochregulation von OASL2 in INS-1-Zellen. Bei der Stimulation von INS-1-Zellen mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, in Konzentration 3 $\mu\text{g/ml}$ kam es bei 12-stündiger Stimulation zu einem starken Anstieg von OASL2. Bei Stimulation mit der höheren Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) kam es nach 12- und 18-stündiger Stimulation zu einem signifikanten Anstieg von OASL2. Dargestellt wird das Verhältnis von OASL2-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel, ** $p < 0.01$ vs. vehikel.

Um nachzuweisen, dass poly(dA:dT) OASL2 in INS-1-Zellen aktiviert, wurden INS-1-Zellen für 6, 12 und 18 Stunden mit poly(dA:dT) in Konzentration 3 µg/ml und 10 µg/ml stimuliert. Nach 12- und 18-stündiger Stimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von OASL2.

3.2.3 Poly(dA:dT) induziert die Expression von Chemokin CXCL10 in INS-1-Zellen

Poly(dA:dT) führte bereits in MIN6-Zellen zur Hochregulation von CXCL10. Nun wurden INS-1-Zellen mit poly(dA:dT) stimuliert und qRT-PCR-Experimente für die Stimulationszeiträume 6, 12 und 18 Stunden durchgeführt. Nach 6-, 12- und 18-stündiger Stimulation mit dem dsDNA-Analogon kam es zu einer signifikanten Hochregulation von CXCL10. In vivo könnte CXCL10 zur Rekrutierung von Makrophagen an die Beta-Zellen führen.

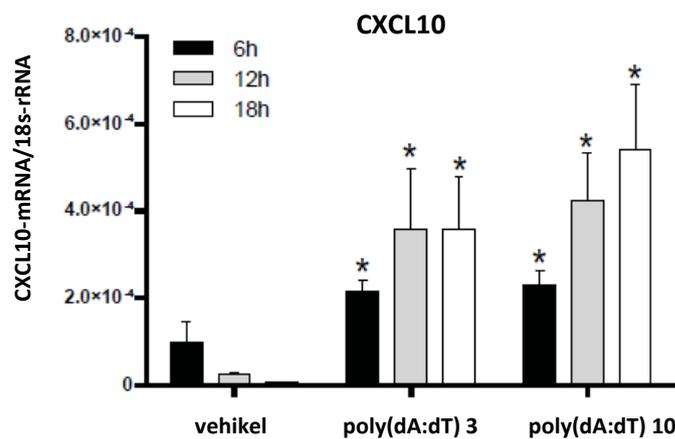


Abbildung 38: Hochregulation von CXCL10 in INS-1-Zellen. Nach 6-, 12-, und 18-stündiger Inkubation mit poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es zu einer signifikanten Hochregulation von CXCL10. Es zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige Hochregulation von CXCL10. Dargestellt wird das Verhältnis von CXCL10-mRNA zu 18s-rRNA. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

Diese Ergebnisse zeigten, dass poly(dA:dT), ein Doppelstrang-DNA-Analogon, in murinen MIN6-Zellen und in INS-1-Zellen aus der Ratte sowohl zur Hochregulation von Typ I-Interferon IFN-β, als auch zur Expression von Typ I-Interferon-assoziierten Genen wie IFIT1, MX1 und OASL2 führte. Außerdem bewirkte poly(dA:dT) die Hochregulation von Pathogenerkennungsrezeptoren. In MIN6-Zellen kam es durch poly(dA:dT) zur Hochregulation von RIG-I und MDA-5 und in INS-1-Zellen kam es nur zur Hochregulation von RIG-I.

Poly(dA:dT) könnte demnach in der Beta-Zelle des Pankreas zur Aktivierung von Pathogenerkennungsrezeptoren und zur Hochregulation von Typ I-Interferonen führen, was in Apoptose der Beta-Zellen münden könnte. Deshalb wurde in den nachfolgenden Experimenten untersucht, ob poly(dA:dT) Apoptose in MIN6-Zellen auslöst.

3.3 Poly(dA:dT) führt zu Apoptose in MIN6-Zellen

Um die möglichen Auswirkungen des Beta-Zelltodes mikroskopisch betrachten zu können, wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Mittels dieser Methode kann fragmentierte DNA, wie sie während des programmierten Zelltodes entsteht, nachgewiesen werden. Das Enzym *Terminal deoxy-nucleotidyl Transferase* (TdT) bindet dabei Nukleotide an die 3'-Enden der DNA-Fragmente. Normalerweise werden die Nukleotide an Biotin gekoppelt. Die biotinylierte DNA kann dann mittels Streptavidin, einem Enzym, dargestellt werden. Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen die apoptotischen Zellen grün leuchtend. MIN6-Zellen wuchsen auf Glasplättchen, sogenannten *chamberslides*, und wurden 24 Stunden lang mit 3 µg/ml und 10 µg/ml poly(dA:dT) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträgern fixiert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Als Positivkontrolle wurde das Enzym DNase 1 benutzt. DNase 1 ist eine Endonuklease, welche während der Apoptose DNA spaltet und degradiert [154]. Diese DNA-Strangbrüche führen zu einem positiven TUNEL-Signal [140] [141]. Im Vergleich zur Mediumkontrolle konnten in den mit poly(dA:dT) stimulierten Zellen deutlich grüne apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich zur TUNEL-Färbung wurden die MIN6-Zellen noch mit DAPI, einem Farbstoff, der den Zellkern sichtbar macht, blau angefärbt. Nach Stimulation mit poly(dA:dT) kam es zu Apoptose in MIN6-Zellen. Apoptose stellt zusammen mit der Hochregulation der zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren, der Typ I-Interferon-Expression und der Expression von Typ I-Interferon-assoziierten Genen eine wichtige Effektorfunktion der antiviralen angeborenen Immunität dar.

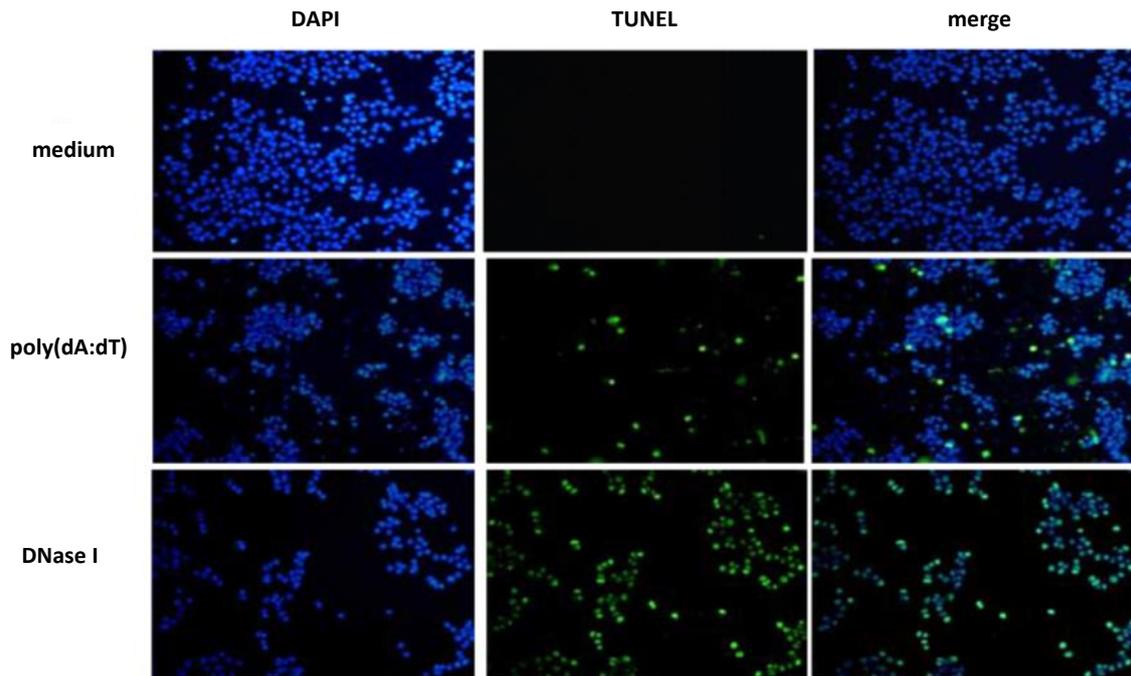


Abbildung 39: TUNEL-Färbung von Beta-Zellen. MIN6-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. In der Abbildung dargestellt sind die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimulierten Zellen. Daraufhin wurde die TUNEL-Färbung durchgeführt. Die blauen Zellen repräsentieren die mit DAPI angefärbten Zellkerne. Die grünen Zellen sind die apoptotischen TUNEL-positiven Zellen. Um die Apoptose zu quantifizieren wurden die apoptotischen Zellen mit der Zählsoftware Image J. ausgezählt. Vergrößerung 400x, Leica Fluoreszenzmikroskop.

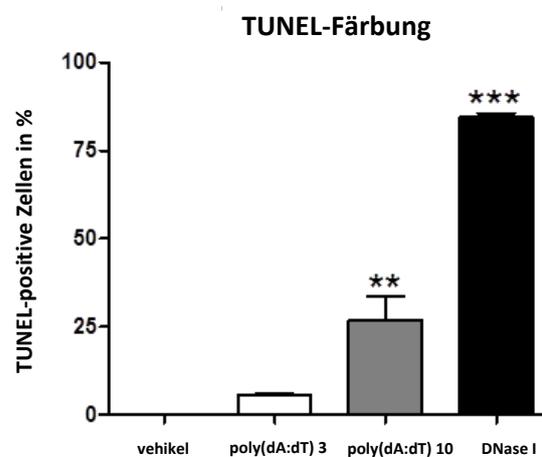


Abbildung 40: Prozentsatz der TUNEL-positiven Zellen. MIN6-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Poly(dA:dT) in Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$ führte zu einem signifikanten Anstieg der TUNEL-positiven Zellen. Zur

Quantifizierung der apoptotischen Zellen wurde die Zählsoftware Image J. verwendet. Dargestellt ist der Prozentsatz zwischen apoptotischen und lebenden Zellen. ** $p < 0.01$ vs. vehikel, *** $p < 0.001$ vs. vehikel.

3.4 Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 8 in MIN6-Zellen

In Vorarbeiten zur vorliegenden Studie konnte eine Aktivierung der Effektorcaspase 3 nachgewiesen werden [137]. Um herauszufinden, ob der extrinsische oder der intrinsische Weg der Apoptose eine Rolle in der poly(dA:dT)-induzierten Apoptose spielt, folgte in der vorliegenden Arbeit als weiterer Versuch ein Caspase 8-Western Blot. Caspase 8 ist die Initiatorcaspase des extrinsischen Weges der Apoptose. Die Initiator-Procaspase 8 liegt in ihrer inaktiven Form in MIN6-Zellen vor. Nach Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) kam es zu einer vermehrten Bildung von aktiven Effektor-Procaspasen. Bei Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) kam es zu einer Abnahme der aktiven Effektor-Procaspase 8, da durch autokatalytische Spaltung Initiatorcaspase 8 freigesetzt wurde [155] [156].

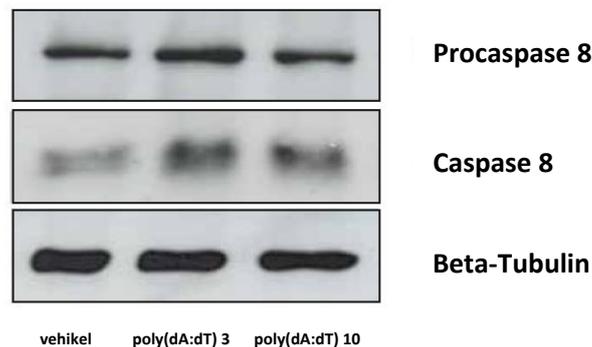


Abbildung 41: Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 8 in MIN6-Zellen. MIN6-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Daraufhin folgte die Proteinisolation und die Western Blot-Analyse. Die Procaspase 8 liegt in ihrer inaktiven Proform in MIN6-Zellen vor.

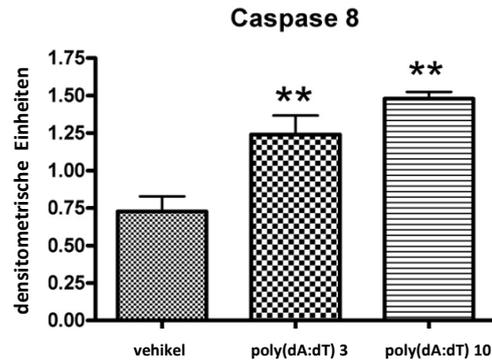


Abbildung 42: Densitometrische Analyse der Caspase 8. Nach Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es in MIN6-Zellen konzentrationsabhängig zur Hochregulation von Caspase 8. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mittels Adobe Photoshop Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. ** $p < 0.01$ vs. vehikel.

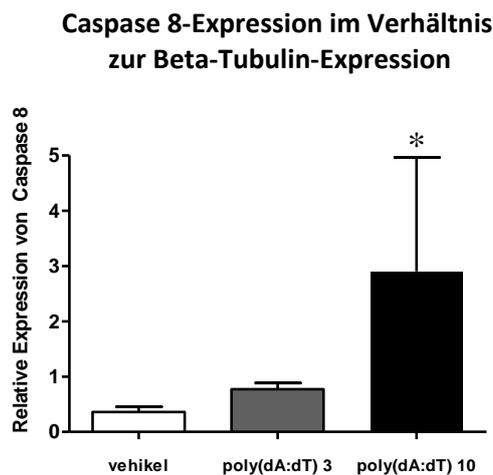


Abbildung 43: Densitometrische Analyse der Caspase 8-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression. Nach Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es in MIN6-Zellen konzentrationsabhängig zur Hochregulation von Caspase 8. Die Quantifizierung der Bandenintensität von Caspase 8 im Verhältnis zu Beta-Tubulin erfolgte mittels Image J Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

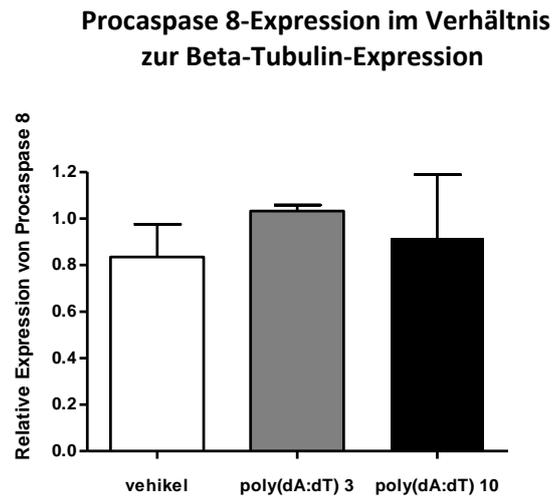


Abbildung 44: Densitometrische Analyse der Procaspase 8-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression. MIN6-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Bei Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) kam es in MIN6-Zellen zu einer Hochregulation der Procaspase 8. 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) führte dagegen zu einer leichten Abnahme der Procaspase 8, da bereits durch autokatalytische Spaltung aktive Caspase 8 gebildet wurde. Die Quantifizierung der Bandenintensität von Procaspase 8 im Verhältnis zu Beta-Tubulin erfolgte mittels Image J Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten.

3.5 Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 9 in MIN6-Zellen

Im vorhergehenden Experiment konnte die Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose nachgewiesen werden. Um herauszufinden, ob auch der intrinsische, mitochondriale Weg der Apoptose durch Stimulation mit poly(dA:dT) aktiviert wird, wurden Western Blot-Analysen für Caspase 9 durchgeführt. Poly(dA:dT) führte zur Aktivierung der Caspase 9. Die Initiator-Procaspase 9 liegt in ihrer inaktiven Form in MIN6-Zellen vor. Nach Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) kam es zu einer vermehrten Bildung von aktiven Effektor-Procaspasen. Bei einer höheren Konzentration von poly(dA:dT) kam es zu einer Abnahme der aktiven Effektor-Procaspase 9, da durch Dimer-Bildung bereits aktive Initiator-Caspase 9 freigesetzt wurde [156,157].

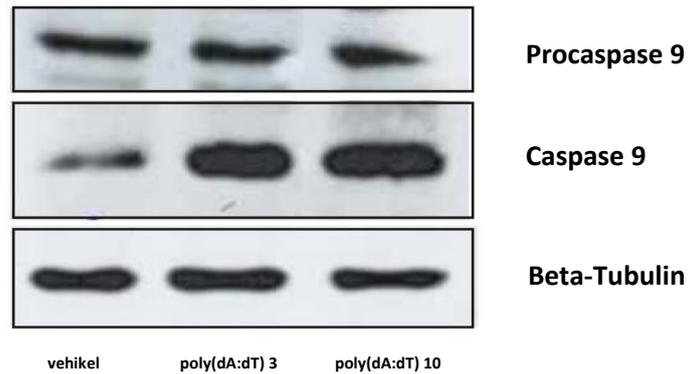


Abbildung 45: Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 9 in MIN6-Zellen. Poly(dA:dT) in Konzentration 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ aktivierte Caspase 9 nach 24-stündiger Stimulation in MIN6-Zellen. Die Procaspase 9 liegt in ihrer inaktiven Proform in MIN6-Zellen vor.

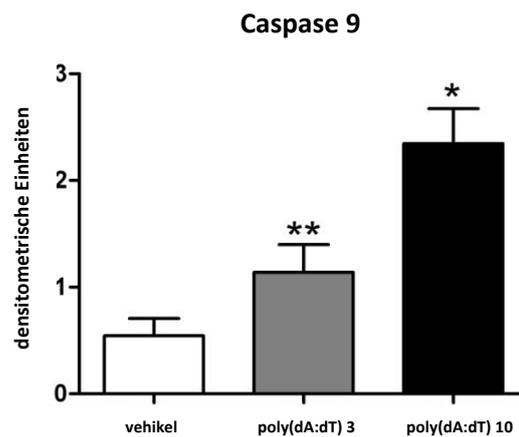


Abbildung 46: Densitometrische Analyse der Caspase 9-Aktivierung. Konzentrationsabhängig führte die 24-stündige Stimulation von MIN6-Zellen mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, zur Hochregulation von Caspase 9. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mittels Adobe Photoshop Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. * $p < 0.05$ vs. vehikel, ** $p < 0.01$ vs. vehikel.

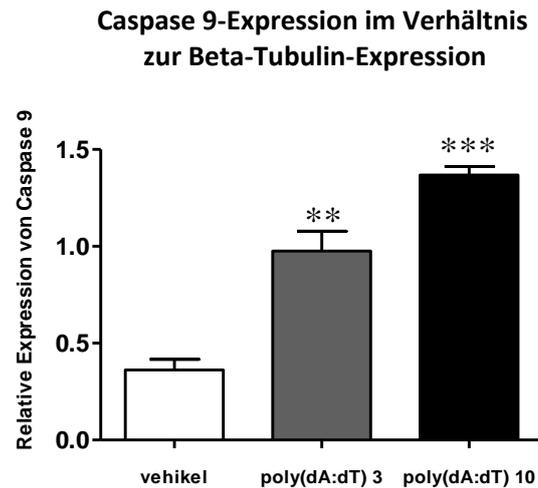


Abbildung 47: Densitometrische Analyse der Caspase 9-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression. Nach Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es in MIN6-Zellen konzentrationsabhängig zur Hochregulation von Caspase 9. Die Quantifizierung der Bandenintensität von Caspase 9 im Verhältnis zu Beta-Tubulin erfolgte mittels Image J Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. ** $p < 0.01$ vs. vehikel, *** $p < 0.001$ vs. vehikel.

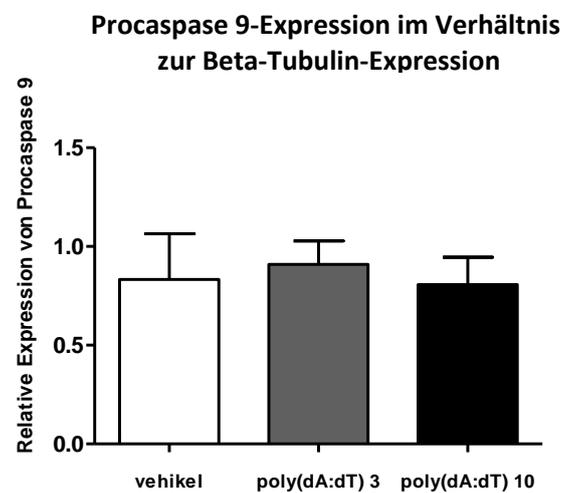


Abbildung 48: Densitometrische Analyse der Procaspase 9-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression. MIN6-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Bei Stimulation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) kam es in MIN6-Zellen zu einer leichten Zunahme der Procaspase 9. 10 $\mu\text{g/ml}$ poly(dA:dT) führte wiederum zur Abnahme der Procaspase 9, da durch Dimer-Bildung bereits aktive Caspase 9 gebildet wurde. Die Quantifizierung der Bandenintensität von Procaspase 9 im Verhältnis zu Beta-Tubulin erfolgte mittels Image J Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten.

3.6 Poly(dA:dT) führt in MIN6-Zellen zu früher und später Apoptose

Um die Apoptose von MIN6-Zellen, ausgelöst durch poly(dA:dT), noch in einer weiteren Methode darzustellen und um zwischen früher und später Apoptose bzw. Nekrose zu differenzieren, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurden MIN6-Zellen mit 10 µg/ml und 50 µg/ml poly(dA:dT) stimuliert und für 6 und 24 Stunden inkubiert. Poly(dA:dT) wurde dabei in hoher Konzentration verwendet, um möglichst viele apoptotische Zellen zu erhalten. Daraufhin wurden Durchflusszytometrieanalysen für Annexin V und Propidium Iodid (PI) durchgeführt. Annexin V bindet dabei an Phosphatidylserin (PS), das von apoptotischen Zellen an der äußeren Zellmembran exponiert wird. Annexin V kann mit dem Fluorochrom FITC konjugiert werden. Wenn die Zellmembran im späten Stadium der Apoptose oder im Stadium der beginnenden Nekrose nicht mehr intakt ist, kann PI in die Zelle eindringen. Frühapoptotische Zellen sind PI negativ und Annexin V positiv. Zellen in später Apoptose oder in Nekrose sind Annexin V positiv und PI positiv [144].

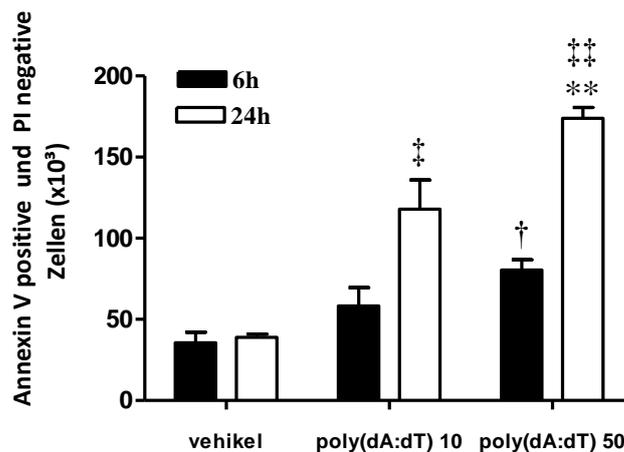


Abbildung 49: Poly(dA:dT) führt im FACS-Experiment zu frühapoptotischen, Annexin V positiven und PI negativen Zellen. MIN6-Zellen wurden 6 Stunden lang mit 10 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Es zeigten sich 60 000 Annexin V positive und PI negative Zellen. Bei 6-stündiger Inkubation mit 50 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, zeigten sich 80 000 frühapoptotische Zellen. Bei 24-stündiger Stimulation mit 10 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es zu 120 000 Annexin V positiven und PI negativen Zellen und bei Stimulation mit 50 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, zu 170 000 frühapoptotischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. ** $p < 0.01$ 6h poly(dA:dT) 50 vs. 24h poly(dA:dT) 50. † $p < 0.05$ vehikel vs. 6 h poly(dA:dT) 50. ‡ $p < 0.05$ vehikel vs. 24 h poly(dA:dT) 10. †† $p < 0.01$ vehikel vs. 24 h poly(dA:dT) 50.

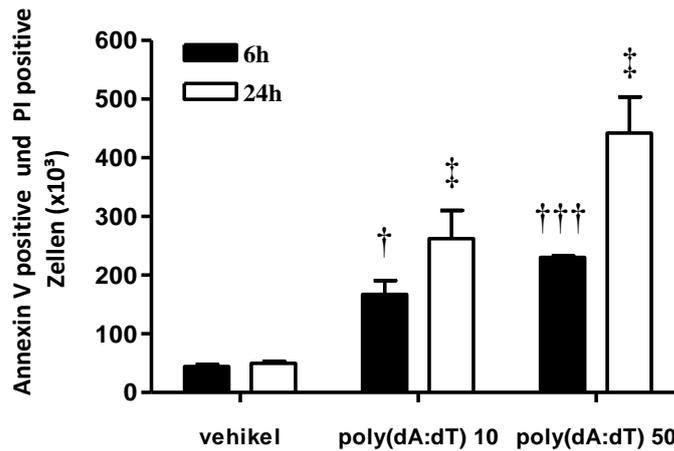


Abbildung 50: Poly(dA:dT) führt im FACS-Experiment zu spätapoptotischen, Annexin V positiven und PI positiven Zellen. MIN6-Zellen wurden 6 Stunden lang mit 10 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Es zeigten sich 160 000 Annexin V positive und PI positive Zellen. Bei einer Inkubation von 6 Stunden mit 50 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, zeigten sich 230 000 spätapoptotische Zellen. Bei 24-stündiger Stimulation mit 10 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es zu 250 000 Annexin V positiven und PI positiven Zellen und bei Stimulation mit 50 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, zu 440 000 spätapoptotischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. † $p < 0.05$ vehikel vs. 6 h poly(dA:dT) 10. ††† $p < 0.001$ vehikel vs. 6 h poly(dA:dT) 50. † $p < 0.05$ vehikel vs. 24 h poly(dA:dT) 10. † $p < 0.05$ vehikel vs. 24 h poly(dA:dT) 50.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass bei 6-stündiger Inkubation mit poly(dA:dT) auch in höherer Konzentration eine geringe Zunahme an frühapoptotischen Zellen zu verzeichnen war. Erst bei 24-stündiger Inkubation in hohen Konzentrationen von poly(dA:dT) kam es zu einem signifikanten Anstieg der frühapoptotischen Zellen. Bei den spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse, wobei sich insgesamt bereits mehr Zellen in der späten Phase der Apoptose oder in Nekrose befanden.

3.7 Caspase 8-Inhibitor und Caspase 9-Inhibitor hemmen die durch poly(dA:dT) ausgelöste Apoptose in MIN6-Zellen

In den oben dargestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass poly(dA:dT) sowohl Caspase 8 als auch Caspase 9 aktivierte. Nun sollte untersucht werden, ob die Blockade von Caspase 8 und Caspase 9 die Beta-Zell-Apoptose hemmt. Daher wurden FACS-Analysen durchgeführt. MIN6-Zellen wurden mit poly(dA:dT) 50 µg/ml stimuliert und für 24 Stunden

inkubiert. Kurz vor der Stimulation wurden die Zellen zusätzlich mit Caspase 8-Inhibitor bzw. mit Caspase 9-Inhibitor inkubiert. Nun wurden Durchflusszytometrieanalysen für Annexin V und PI durchgeführt. Durch die Blockade des Caspasesweges könnte es zu einer partiellen Hemmung der Apoptose kommen. Tatsächlich reduzierte sich die Anzahl der spätapoptotischen Zellen nach poly(dA:dT)-Stimulation mit Caspase-Inhibitor im Vergleich zur Gruppe ohne Caspase-Inhibitor signifikant.

Es wurden Annexin V positive und PI positive Zellen mit Caspase 8-Inhibitor bzw. mit Caspase 9-Inhibitor untersucht, da sich in den vorherigen FACS-Analysen gezeigt hatte, dass sich bereits mehr Zellen in später Apoptose bzw. in Nekrose befanden. Poly(dA:dT) wurde in hoher Konzentration verwendet, um möglichst viele spätapoptotische Zellen zu erhalten. In den schon gezeigten Durchflusszytometrieanalysen für Annexin V und PI zeigte sich ein konzentrations- und zeitabhängiger Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen.

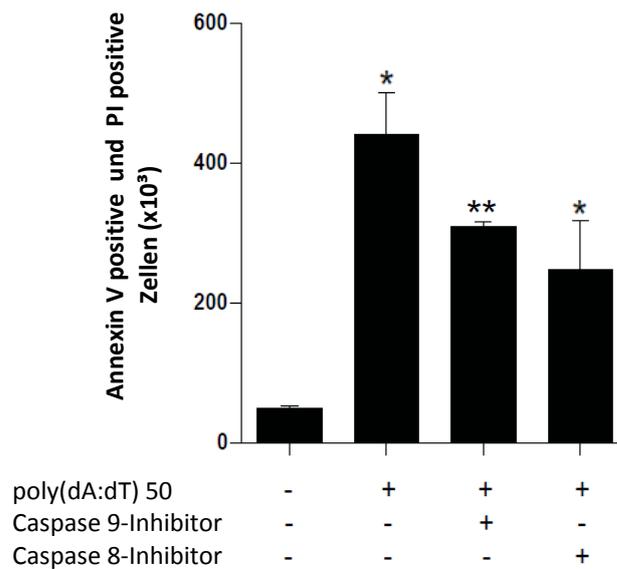


Abbildung 51: Poly(dA:dT) führt im FACS-Experiment zu spätapoptotischen Zellen. Caspase 9- und Caspase 8-Inhibitor hemmen die Apoptose partiell. Dargestellt sind Annexin V positive und PI positive Zellen. MIN6-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 50 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, führte zu mehr als 400 000 spätapoptotischen Zellen. Bei Zugabe von Caspase 9-Inhibitor waren nur noch 300 000 Annexin V positive und PI positive Zellen detektierbar. Nach Zugabe von Caspase 8-Inhibitor konnten nur noch etwas mehr als 200 000 spätapoptotische Zellen nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$ vs. vehikel, ** $p < 0.01$ vs. vehikel.

3.8 Poly(dA:dT) aktiviert die pro-apoptotischen Gene Puma und Noxa in MIN6-Zellen

Um den intrinsischen Weg der Apoptose noch weiter zu untersuchen, wurden Western Blot-Experimente für die BH3-only-Proteine der Bcl-2-Familie durchgeführt. Dabei konnte Noxa und Puma nachgewiesen werden.

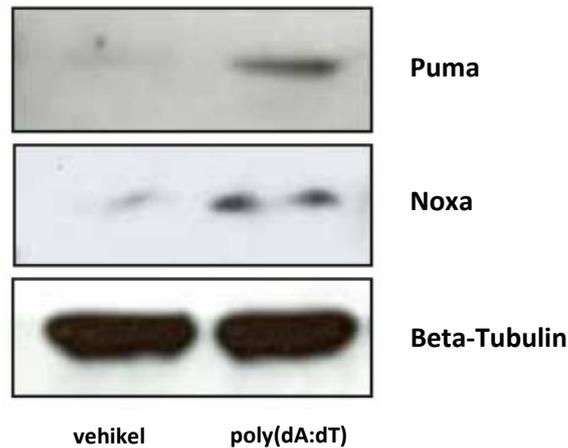


Abbildung 52: Poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, führt zur Proteinexpression der BH3-only-Mitglieder Puma und Noxa. MIN6-Zellen wurden 24 Stunden lang mit 10 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Daraufhin wurde das Protein isoliert und eine Western Blot-Analyse für Noxa und Puma durchgeführt. Poly(dA:dT) führte dabei zur Hochregulation der pro-apoptotischen Mitglieder der BH3-only-Familie Noxa und Puma.

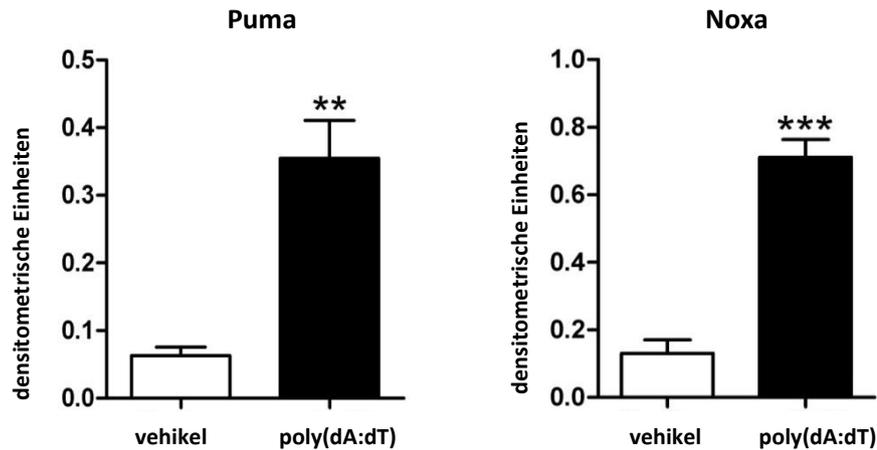


Abbildung 53: Densitometrische Auswertung der Puma- und Noxa-Expression im Western Blot nach Stimulation mit poly(dA:dT). Noxa und Puma wurden nach 24-stündiger Stimulation mit 10 µg/ml poly(dA:dT) in Western Blot-Analysen hochreguliert. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mittels Adobe Photoshop Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte +/- SEM aus jeweils drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. ** $p < 0.01$ vs. vehikel, *** $p < 0.001$ vs. vehikel

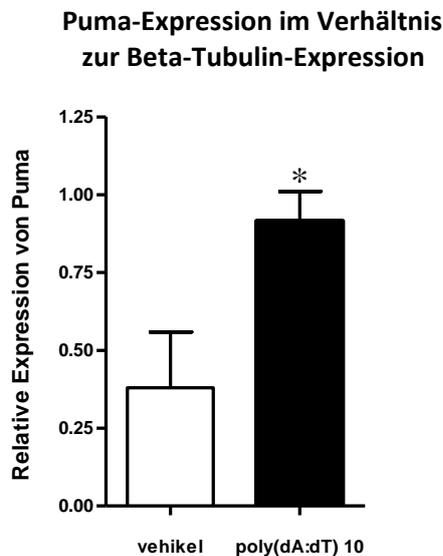


Abbildung 54: Densitometrische Auswertung der Puma-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression. Nach 24-stündiger Stimulation mit 10 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es in MIN6-Zellen zur Hochregulation von Puma. Die Quantifizierung der Bandenintensität von Puma im Verhältnis zu Beta-Tubulin erfolgte mittels Image J Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. * $p < 0.05$ vs. vehikel.

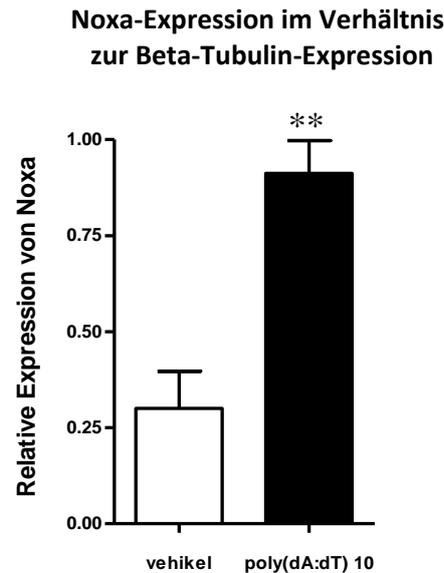


Abbildung 55: Densitometrische Auswertung der Noxa-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression. Nach 24-stündiger Stimulation mit 10 µg/ml poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, kam es in MIN6-Zellen zur Hochregulation von Noxa. Die Quantifizierung der Bandenintensität von Noxa im Verhältnis zu Beta Tubulin erfolgte mittels Image J Software. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte +/- SEM aus drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. ** $p < 0.01$ vs. vehikel.

In den dargestellten Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass poly(dA:dT) in MIN6-Zellen zur Beta-Zell-Apoptose führt. Sowohl in MIN6-Zellen als auch in INS-1-Zellen kam es zur Hochregulation von Typ I-Interferonen, Typ I-Interferon-assoziierten Genen sowie zur Hochregulation von Rezeptoren des innate Immunsystems. In Apoptoseassays wurde sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg der Apoptose aktiviert. Caspase-Inhibitoren führten zur partiellen Hemmung der Apoptose. In vivo könnte es zu einem Übergang des innate in das adaptive Immunsystem kommen. Der Zelltod könnte in vitro direkt durch das Virus und in vivo indirekt durch die Präsentation viraler Antigene über MHC-Klasse-I-Komplexe erfolgen. Dadurch könnte eine adaptive Immunantwort gegen die Beta-Zelle ausgelöst werden.

Kapitel 4: Diskussion

4 Diskussion

Der initiale Mechanismus, der zur Apoptose und zur Immunantwort gegen die körpereigene Beta-Zelle im Pankreas führt, ist immer noch unbekannt. Als Auslöser der Immunantwort spielen sowohl RNA-Viren, wie Enteroviren, als auch dsDNA-Viren, wie Alphaherpesviren und Betaherpesviren, eine Rolle. Zu den Alphaherpesviren zählen Herpes-simplex-Viren und zu den Betaherpesviren, Zytomegalieviren [41] [42-45]. Typ I-Interferone, Typ I-Interferon-induzierte Gene, Zytokine und die Induktion der Apoptose sind wichtige antivirale Mechanismen des innate Immunsystems. Möglicherweise führt poly(dA:dT), ein dsDNA-Analogon, über dsDNA-Rezeptoren zur Expression von Typ I-Interferonen, Typ I-Interferon-induzierten Genen, Zytokinen und zu Virus-induzierter Apoptose. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass poly(dA:dT) zum einen zu einer starken Expression von Typ I-Interferon-induzierten Genen führt und zum anderen sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg der Apoptose aktiviert. Poly(dA:dT) führt zur Virus-induzierten Apoptose und zur antiviralen Immunantwort gegen die Beta-Zellen des Pankreas.

4.1 Bedeutung des innate Immunsystems in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Zytotoxische CD8+T-Zellen, CD4+T-Helferzellen, B-Zellen und Makrophagen können im Pankreas von Typ 1 Diabetikern isoliert werden. Somit sind sowohl das innate als auch das adaptive Immunsystem an der Krankheitsentstehung des Typ 1 Diabetes beteiligt [158,159].

Die fortwährende hämatogene Versorgung der Beta-Zellen führt zum Zusammentreffen von viralen Partikeln, wie PAMPs, und körpereigenem Zellmaterial, wie DAMPs, mit Insulinproduzierenden Zellen. Endogene DNA kann - wie exogene DNA-Viren - einen Entzündungsprozess auslösen [160]. DNA kann, wenn sie mit Immunglobulinen komplexiert wird, vom Abbau durch DNase geschützt werden. Schon zu Beginn des Autoimmunprozesses können Autoantikörper gegen Inselzellantigene im Blut von Patienten nachgewiesen werden [159]. Diese Antikörper sind gegen Tyrosinphosphatase IA2 [161], gegen Insulin [162], gegen Glutamatdecarboxylase GAD [163] und gegen den Zink-Transporter ZnT8 [164] gerichtet und werden zum diagnostischen Nachweis des Typ 1 Diabetes benutzt [165] [166].

Studien mit BBDR-Ratten und NOD-Mäusen zeigten, dass neben den B-Zellen auch T-Zellen, die sich spezifisch gegen Inselzellantigene wie GAD, IA2 und Insulin richten, an der Entstehung des Typ 1 Diabetes beteiligt sind [167]. Vor der Aktivierung des adaptiven Immunsystems in Form von T- und B-Lymphozyten steht zunächst die Aktivierung des innate Immunsystems.

Im innatem Immunsystem spielen zahlreiche Rezeptoren eine Rolle. Lokale Infektionen induzieren die antivirale Interferon-Produktion über RIG-I-like-Helikasen. Systemische Infektionen hingegen aktivieren Toll-like-Rezeptoren [168]. Zusätzlich spielen die NOD-like-Rezeptoren und die Inflammasom-Rezeptoren eine Rolle. All diese Rezeptoren sind miteinander vernetzt und erzielen eine antivirale Immunantwort als Reaktion auf eine virale Infektion [169]. Die Aktivierung der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems führt andererseits auch zu Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel dem systemischen Lupus erythematoses, der rheumatoiden Arthritis und der autoimmunen Hepatitis [151].

Murine und humane pankreatische Inselzellen exprimieren TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9, wobei TLR3 und TLR4 die signifikanteste Expression aufweisen [170]. 2005 zeigten Rasschaert et al., dass TLR3 und der Transkriptionsfaktor STAT-1 in dsRNA- und Interferon- γ -induzierter Apoptose in primären Beta-Zellen aus Maus und Ratte involviert sind. In INS-1-Zellen führt jedoch dsRNA, poly(I:C), nicht zur Apoptose [171]. 2008 konnten Dogusan et al. nachweisen, dass poly(I:C) über die Aktivierung von TLR3 und Transkriptionsfaktor IRF3 zur Apoptose von murinen Beta-Zellen führt [50]. Über die Aktivierung von TLR3 kommt es zur Rekrutierung von Antigen-präsentierenden Zellen und inselspezifischen T-Zellen [170]. Transgene Mäuse, welche das lymphozytische Choriomeningitis-Virus-Peptid und einen spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren, entwickeln Typ 1 Diabetes. Dabei erfolgt die Krankheitsentstehung über die Aktivierung von TLR3- und TLR7-Signalwegen mit nachfolgender Expression von Typ I-Interferonen und Hochregulation von MHC-Klasse-I-Rezeptoren [136].

Über den TLR2-Weg kann in NOD-Mäusen spontan Typ 1 Diabetes entstehen [172]. Kim et al. publizierten 2011, dass TLR2 maßgeblich bei der Induktion des Typ 1 Diabetes beteiligt ist. Der TLR2-Agonist Pam3CSK unterdrückt die Zytokinausschüttung. TLR2-defiziente NOD-Mäuse entwickeln keinen Diabetes Typ 1 [173]. TLR2 kann auch endogene Liganden, welche von der zerstörten Beta-Zelle freigesetzt werden, binden und den Entzündungsprozess verstärken sowie zu einer Hochregulation von autoreaktiven T-Zellen führen [172]. Auf der anderen Seite wurde jedoch auch beschrieben, dass TLR2 die Progression des Typ 1 Diabetes über die vermehrte Expression der regulatorischen Zellen hemmen kann [174].

Palmitat führt in INS-1-Zellen über TLR4 zum Zelltod [175]. Im BBDR-Ratten-Modell induziert KVR (*Kilham Rat Virus*) über den TLR9-Weg Typ 1 Diabetes [63]. 25 % der mit KVR infizierten BBDR-Ratten entwickeln Typ 1 Diabetes. KVR ist ein ssDNA-Virus, Mitglied der Parvoviren, der auch Menschen infizieren kann [176]. Typ 1 Diabetes entsteht in BBDR-Ratten 2-6 Wochen nach der Infektion; dieser Prozess wird über T-Zellen vermittelt [52]. KVR reduziert die in der Milz befindliche Menge an regulatorischen CD4+CD25+FoxP3+T-Zellen. Diese Zellen regulieren

die Krankheitsentstehung und haben eine präventive Wirkung. KVR führt über TLR9 zur Hochregulation der dendritischen Zellen und der B-Lymphozyten. KVR löst außerdem die Produktion von Zytokinen und Chemokinen aus [63]. Die Hemmung des TLR9-Weges in mit KVR-infizierten BBDR-Ratten unterdrückt die Entstehung des Typ 1 Diabetes [63]. Die Stimulation der BBDR-Ratten zusätzlich zu KVR mit TLR-Agonisten wie Peptidoglykan (TLR2), poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4), R484 (TLR 7/8) und CpG-DNA (TLR9) erhöht die Inzidenz des Typ 1 Diabetes in BBDR-Ratten - im Gegensatz zu denjenigen BBDR-Ratten, welche nur mit KVR infiziert wurden. Die alleinige Stimulation mit TLR-Agonisten führt jedoch nicht zur Entstehung eines Typ 1 Diabetes in BBDR-Ratten [15]. KVR induziert in BBDR (*biobreeding diabetes prone*) Ratten jedoch keinen Typ 1 Diabetes. Die lymphopenischen BBDR-Ratten können im Gegensatz zu den BBDR-Ratten spontan Typ 1 Diabetes entwickeln. Vaccinia-Virus, ein dsDNA-Virus, Mitglied der Poxviren, induziert im BBDR-Ratten-Modell keinen Typ 1 Diabetes. CMV (Zytomegalievirus) führt im BBDR-Ratten-Modell, nicht jedoch im BBDR-Ratten-Modell, zu Typ 1 Diabetes. Man geht davon aus, dass CMV einen bereits begonnenen Krankheitsprozess verstärken kann [15]. Die Toll-like-Rezeptoren haben damit sowohl Typ 1 Diabetes-induzierende als auch Typ 1 Diabetes-hemmende Eigenschaften. Neben den Toll-like-Rezeptoren spielen im innatem Immunsystem jedoch auch TLR-unabhängige Rezeptorwege eine Rolle.

Humane Inseln, die mit Coxsackie-Virus, IFN- α , IFN- γ und IL-1 β stimuliert wurden, zeigen eine Hochregulation von TLR3, RIG-I und MDA-5 [177]. Intrazelluläre dsRNA, welche von toten Zellen stammt, kann über TLR3 und die Transkriptionsfaktoren NF κ B und IRF3 zur Apoptose von primären Maus- und Ratten-Beta-Zellen führen. Extrazelluläres poly(I:C) führt über TLR3 zur Apoptose von Beta-Zellen. Intrazelluläres poly(I:C) führt über RIG-I und MDA-5 zur Apoptose und zur Typ I-Interferon-Hochregulation von primären Maus- und Ratten-Beta-Zellen [178].

In der vorliegenden Studie wurden die Effekte des dsDNA-Analogons poly(dA:dT) untersucht. Lippmann et al. zeigten 2008, dass poly(dA:dT) in verschiedenen humanen Zellen wie A549- und HEK 293-Zellen zur IFN- β -Ausschüttung führt. Die Freisetzung von IFN- β erfolgt unabhängig von DNA-Rezeptor DAI. Die Blockade von DAI hemmt nicht die IFN- β -Ausschüttung. Die Blockade des Transkriptionsfaktors IRF3 führt hingegen zur Hemmung der IFN- β -Ausschüttung [179]. Der DNA-Rezeptor DAI spielt womöglich in der Erkennung von poly(dA:dT) in MIN6-Zellen ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Der Transkriptionsfaktor IRF3 scheint hingegen eine wichtige Rolle in der Typ I-Interferon-Hochregulation zu haben.

Das AIM2-Inflammasom stellt einen weiteren Rezeptorkandidaten in MIN6-Zellen dar. Veeranki et al. fanden 2011 heraus, dass IFI 16 das AIM2-Inflammasom negativ regulieren kann [180]. Beide Moleküle könnten im durch poly(dA:dT)-induzierten Zelltod eine Rolle spielen.

Wie wird poly(dA:dT) in MIN6-Zellen erkannt? Über welche Rezeptoren läuft der Signalweg? In Vorarbeiten zu dieser Untersuchung zeigte sich in murinen Pankreasinseln eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression von RIG-I, MDA-5 und DAI. IFN- β führt in MIN6-Zellen zur Aktivierung der zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5, nicht jedoch von DAI. IFN- γ und TNF- α führt zur Hochregulation von RIG-I, MDA-5 und DAI. Auf Proteinebene zeigt sich eine Bestätigung der qRT-PCR-Ergebnisse: IFN- β aktiviert RIG-I und MDA-5 [137]. Im Rahmen einer lokalen Entzündung durch dsDNA kommt es in murinen MIN6-Zellen zur Hochregulation von MDA-5 und RIG-I. Poly(dA:dT) wird über RIG-I und Polymerase III in RNA umgeschrieben und erkannt. MDA-5 und PTPN22 werden als Prädispositionsloki in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes beschrieben [102,103,181]. Diejenigen Gene, welche für die RIG-I-Helikasen kodieren, sind mit der Expression von Typ I-Interferonen assoziiert [77]. IL-1 β , ein Interleukin, das auf die Aktivierung des AIM2-Inflammasoms hindeutet, kann in MIN6-Zellen nach Stimulation mit poly(dA:dT) hingegen nicht nachgewiesen werden. Da es in den letzten Jahren zur Identifizierung einer Reihe weiterer dsDNA-Rezeptoren kam, fokussiert sich die vorliegende Arbeit auf die Expression der Typ I-Interferon-induzierten Gene und auf die Darstellung der durch poly(dA:dT) ausgelösten Apoptose.

4.2 Effekte der dsDNA-Erkennung in MIN6- und INS-1-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von poly(dA:dT) auf MIN6- und INS-1-Zellen untersucht. In humanen Endothelzellen des Glomerulus konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulation mit poly(dA:dT) als auch mit poly(I:C) zur Interferoninduktion und zum Zelltod führt [182,183]. Poly(I:C) führt in primären Mesangial-Zellen zur Ausschüttung von Typ I-Interferonen und zu Apoptose, welche sowohl mittels Caspase 8-Inhibitor als auch mittels Caspase 9-Inhibitor partiell gehemmt werden kann [184].

In der vorliegenden Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit poly(dA:dT) in MIN6-Zellen der Maus und in INS-1-Zellen der Ratte zur Expression von Typ I-Interferon, IFN- β sowie von zahlreichen Typ I-Interferon-induzierten Genen, wie MX1, OASL2, IFIT1, und von Chemokin CXCL10, auch bekannt als IP10, führt.

Virale DNA kann durch TLR9 sowie über zytosolische Rezeptoren, wie RIG-I, AIM2, IFI 16, und über weitere unbekanntete zytosolische DNA-Rezeptoren erkannt werden. Die Bindung an diese Rezeptoren führt zur Hochregulation von Typ I-Interferonen, Typ I-Interferon-induzierten Genen und Chemokinen. Interferone hemmen die virale Replikation. Typ I-Interferone haben zahlreiche immunmodulatorische Effekte [85].

Es zeigte sich, dass sowohl MIN6-Zellen aus der Maus als auch INS-1-Zellen aus der Ratte zur Expression von IFN- β , IFIT1, MX1, OASL2 und dem zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptor RIG-I angeregt werden. RIG-I könnte in MIN6-Zellen über die Umwandlung von dsDNA in dsRNA mittels Polymerase III poly(dA:dT) erkennen.

In Vorarbeiten wurden MIN6-Zellen 15, 18, 24 und 48 Stunden mit poly(dA:dT) stimuliert und qRT-PCR-Experimente durchgeführt, um die mRNA-Expression von IFIT1, OASL2 und CXCL10 nachzuweisen. Hierbei zeigte sich, dass es ab einer Stimulationsdauer von 24 Stunden zu einem Plateau der Expression der untersuchten Gene kommt, welche bei 48-stündiger Stimulation entweder wieder abfällt oder nur geringfügig zunimmt [137].

Auch bei primären Mesangial-Zellen, welche 3, 6 und 9 Stunden mit non-CPG-(B)-DNA stimuliert wurden, zeigte sich in qRT-PCR-Experimenten ein zeitabhängiger Anstieg der mRNA-Expression von IFN- β , IFIT1, MX1, OASL2 und CXCL10 mit einer maximalen Aktivierung bei 9-stündiger Stimulation [185].

In murinen L929 Fibroblasten zeigte sich im Vergleich zu einer 6-stündigen Stimulation mit poly(dA:dT) bei 9-stündiger Stimulation ein Anstieg der mRNA-Expression von IFN- β [179].

Fibroblasten aus Mausembryonen wurden mit West-Nile-Virus, einem ssRNA-Virus, Mitglied der Flaviviren, stimuliert. Dabei kam es in qRT-PCR-Experimenten bei 24-stündiger Stimulation zu einem Plateau von IFN- β und Typ I-Interferon-assoziierten Genen wie OAS1a, OAS1b [186].

Humane Pankreasinseln, welche mit Coxsackie-Virus-Serotyp B3 stimuliert wurden, exprimierten Typ III-Interferone, wie IFN- λ 1 und IFN- λ 2. In qRT-PCR-Experimenten zeigte sich ab einer 24-stündigen Stimulation mit Coxsackie-Virus-Serotyp B 3 eine Hochregulation der mRNA-Expression von IFN- λ 1 und IFN- λ 2, welche bei 48-stündiger Stimulation signifikant anstieg [187].

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Anstieg der Expression von Typ I-Interferonen, Typ I-Interferon-induzierten Genen und von Typ III-Interferonen zelltypspezifisch ist und sowohl zeit- als auch dosisabhängig erfolgt.

Interferone und Interferon-induzierte Gene haben zahlreiche Wirkungen auf ihre Effektorzellen. Zum einen wirken sie antiviral, wie zum Beispiel MX1, in der Abwehr der Influenzaviren [96]. IFN- β gehört zu den Typ I-Interferonen und wird durch den Transkriptionsfaktor IRF3 reguliert [188]. IFN- β hat einen starken antiviralen Effekt in bronchialen epithelialen Zellen, welche mit den Influenzaviren H3N2 und H5N1 infiziert wurden [189]. OASL2 wird als *Checkpoint* in Apoptose und Entzündungsprozess beschrieben [190]. IFIT1 ist das Endprodukt der Aktivierung der zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 mit konsekutiver Aktivierung von IRF3, was zur Degradierung viraler Proteine führt [99]. Andererseits wirken Interferone auch antibakteriell, wie beispielsweise bei der Abwehr von Bakterien in der septischen Peritonitis [191]. Interferone können aber auch pro-inflammatorisch wirken und Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel die Lupusnephritis, verstärken [192]. Außerdem können Interferone das Zellwachstum von Tumorzellen beeinflussen. In Brustkrebszellen führt das Chemotherapeutikum Topotecan zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I-Rezeptoren über die Freisetzung von IFN- β [193]. Interferone hemmen die Progression der Multiplen Sklerose [194], so dass diese Patienten von einer Therapie mit IFN- β profitieren [195].

Im kutanen Lupus erythematoses kann in Hautproben vermehrt MxA nachgewiesen werden, was auf ein Typ I-Interferon-Signal hindeutet. MxA gehört zur MX1-Protein-Familie und ist ein Typ I-Interferon-induziertes Gen. Diese Interferone führen zur Induktion von Chemokinen wie CXCL10, welche zytotoxische T-Zellen an die betroffenen Gebiete heranlocken [196]. CXCL10 wurde von Berg et al. in den Inseln des Pankreas nach einer Enterovirus-Infektion nachgewiesen [197]. Im Blutserum von neu diagnostizierten Typ 1 Diabetikern und von Menschen mit einem erhöhten Risiko Typ 1 Diabetes zu entwickeln, konnten erhöhte Spiegel des Chemokins CXCL10 festgestellt werden [198] [199]. Während des Prädiabetes-Stadium wurden in NOD-Mäusen erhöhte Spiegel von CXCL10-mRNA und CXCL10-Protein nachgewiesen. CXCL10 rekrutiert Makrophagen an die Beta-Zelle [200]. In NOD-Mäusen, welche mit LCV (Lymphozytischem-Choriomenigitis-Virus) infiziert wurden, induziert die Blockade von CXCL10 eine Hemmung des Typ 1 Diabetes. Die Überexpression von CXCL10 erhöht hingegen die Expression des Typ 1 Diabetes [201]. In der vorliegenden Arbeit konnte in murinen MIN6-Zellen und in den INS-1-Zellen der Ratte, nach Transfektion mit dsDNA, ebenfalls eine Aktivierung von CXCL10 bzw. IP10 aufgezeigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation stimmen mit den bisher publizierten Daten überein und implizieren, dass das Chemokin CXCL10 während des Anfangsstadiums des Typ 1 Diabetes eine Hauptrolle spielt.

Die Quelle der Chemokinproduktion während der Insulitis ist die Beta-Zelle selbst. Isolierte Ratten-Beta-Zellen, welche mit dsRNA oder IL-1 β und IFN- γ stimuliert wurden, zeigen eine

erhöhte Expression von Zytokinen und Chemokinen wie CXCL10 [202]. Humane Inselzellen, welche mit IL-1 β und IFN- γ stimuliert wurden, zeigen eine erhöhte Expression von CXCL10 und sezernieren CXCL10 in das Kulturmedium [200].

Virale RNA, wie poly(I:C), aber auch dsRNA-Viren, wie Coxsackie-Viren, führen zur IFN- α -Produktion in Beta-Zellen. IFN- α führt zur Hochregulation von MHC-Komplexen auf den Beta-Zellen des Pankreas [136]. Mit Hilfe von Interferonrezeptor-defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass Typ I-Interferone für die Entstehung des Typ 1 Diabetes notwendig sind [136]. 1987 wiesen Foulis et al. IFN- α in humanen Beta-Zellen des Pankreas nach [47]. Zytosolische Rezeptoren des innate Immunsystems sind möglicherweise bei der viralen Erkennung beteiligt und führen zu einer Typ I-Interferon-Produktion. Bei Patienten mit Psoriasis kann in den Keratinozyten, ähnlich wie in den Beta-Zellen, IFN- α nachgewiesen werden. Zusätzlich kann eine erhöhte Expression der Pathogenerkennungsrezeptoren MDA-5 und RIG-I festgestellt werden. Bei Psoriasis führt die Induktion der Typ I-Interferone zur chronischen Entzündung [203].

Neben dsRNA-Viren oder einem dsRNA-Analogon spielen auch dsDNA-Viren in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine Rolle. Neben poly(I:C) könnte poly(dA:dT) zur Typ I-Interferon-Expression in humanen Beta-Zellen führen und zur Progression des autoimmunen Diabetes beitragen. Lokal gebildete Interferone führen zur Rekrutierung von Makrophagen an die Hepatozyten [204]. Ähnlich könnten die lokal gebildeten Interferone und Interferon-induzierten Gene und das Chemokin CXCL10 Makrophagen und andere Entzündungszellen des innate und adaptiven Immunsystems an die Beta-Zelle rekrutieren. Dieser Entzündungsprozess führt zur Induktion, Amplifikation und Aufrechterhaltung der Insulitis. Die Entzündung unterdrückt die Beta-Zell-Funktion und führt zur Apoptose. Entzündung stellt die biologische Antwort auf Infektion und Zell-Zerstörung dar [205]. Dieses Modell der Aktivierung des innate Immunsystems und anschließender Aktivierung des adaptiven Immunsystems, was zur progressiven Insulitis der Beta-Zellen führt, wurde 2009 von Eizirik et al. beschrieben [81].

4.3 Bedeutung der Apoptose in MIN6-Zellen

Neben den Interferonen hat die Apoptose eine wichtige Funktion im innate Immunsystem. Sie hemmt die Virusvermehrung [206] und stellt die Hauptursache für den Verlust der Beta-Zellen dar [38,207]. In dieser Studie wurden die mit poly(dA:dT) stimulierten MIN6-Zellen in Western Blot- und FACS-Analysen untersucht. Die Durchflusszytometrie zeigte vor allem Annexin positive und Propidium Iodid positive Zellen, was darauf hindeutet, dass sich bei den

mit poly(dA:dT) stimulierten Zellen bereits eine größere Anzahl von Zellen nicht in der frühen Phase, sondern in der späten Phase der Apoptose oder in Nekrose befand. In Western Blot-Analysen konnte in Vorarbeiten zu dieser Untersuchung die Effektorcaspase 3 nachgewiesen werden [137]. Um noch genauer den Weg der Apoptose zu charakterisieren, folgten in der vorliegenden Arbeit Caspase 8- und Caspase 9-Western Blot-Analysen. Beide Caspasen waren nach Stimulation mit poly(dA:dT) aktiviert, was darauf hindeutet, dass sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Weg der Apoptose in MIN6-Zellen aktiviert wurde. Außerdem führte die Hemmung der beiden Caspasen zu einer partiellen Hemmung des Zelltodes.

Knockout-Mäuse, die keine Caspase 3 besitzen, sind gegen einen durch multiple Dosen Streptozotocin ausgelösten Typ 1 Diabetes geschützt. Dies bedeutet, dass für die T-Zell-Aktivierung die Beta-Zell-Apoptose benötigt wird [208]. Choi et al. zeigten, dass im Beta-Zell-Tod vor allem Caspase 8 und Caspase 3 eine Rolle spielen. Inhibitoren beider Caspasen hemmen den Beta-Zell-Tod, wonach vor allem der extrinsische Weg der Apoptose im Beta-Zelltod eine Rolle spielt [209]. Moriwaki et al. konnten in den Inseln von neu diagnostizierten Typ 1 Diabetikern die Expression von Fas-Rezeptor und Fas-Ligand nachweisen, was ebenfalls auf den extrinsischen Weg der Apoptose hindeutet [210]. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Stimulation von MIN6-Zellen mit poly(dA:dT) sowohl die Aktivierung von Caspase 8 als auch die Aktivierung der Caspase 9 festgestellt werden. Im Gegensatz zu Choi et al. und Moriwaki et al. wurde in der vorliegenden Studie neben dem extrinsischen Weg der Apoptose auch die Relevanz des mitochondrialen Weges der Apoptose im durch poly(dA:dT) induzierten Beta-Zell-Tod festgestellt.

Im intrinsischen Weg der Apoptose haben die BH3-only-Moleküle eine wichtige Regulationsfunktion. Puma ist ein BH3-only-Protein, das durch den Transkriptionsfaktor p53 hochreguliert wird. Die Aktivierung von Puma spielt im durch Zytokine ausgelösten Beta-Zell-Tod eine wichtige Rolle [129]. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie kontrollieren den mitochondrialen Weg der Apoptose und regulieren den Glukose-Metabolismus der Beta-Zellen sowie deren Funktion [211]. Die Hemmung der pro-apoptotischen Moleküle Puma oder Bim inhibiert die durch hohe Konzentrationen von Glukose und Ribose induzierte Apoptose; die Hemmung von Noxa und Bid führen jedoch zu Apoptose. Laut McKenzie et al. spielen bei der Hemmung der durch Glucose induzierten Apoptose von primären murinen Beta-Zellen die pro-apoptotischen Proteine Puma und Bim eine Rolle [212]. Puma wurde von Gurzov et al. als wichtiges BH3-only-Protein charakterisiert, welches in der Pathogenese des durch Zytokine induzierten und des durch endoplasmatischen Stress induzierten Typ 1 Diabetes eine entscheidende Bedeutung hat [129,211]. Eitz Ferrer et al. zeigten in dendritischen Zellen, dass

die Stimulation mit dem dsDNA-Virus MVA (*Modified Vaccinia Virus*) über IRF3 zur Aktivierung von Noxa führt [213]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Ergebnissen von Gurzov et al. und Eitz Ferrer et al. überein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass poly(dA:dT) zur Aktivierung von Puma und Noxa in MIN6-Zellen führt. Noxa ist ein BH3-only-Mitglied der Bcl-2-Familie und wird über p53 reguliert [116]. SsRNA-Viren, Echoviren und Coxsackie-Viren induzieren über die Aktivierung von Noxa Apoptose. Hierbei werden die Transkriptionsfaktoren IRF1, IRF3 und CREB (*cAMP response element-binding protein*) aktiviert [214]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass der Knockdown von Noxa durch siRNA den Zelltod und die Caspase 3-Aktivierung nach Stimulation mit Enzephalomyokarditis-Virus hemmt [215]. Noxa wird durch poly(I:C) und dsRNA-Viren hochreguliert [216]. Die Hochregulation von Noxa bezieht die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 mit ein [214]. Rosebeck et al. zeigten 2011 in murinen Nierenzellen, dass der Knockdown von Noxa die durch Varizella-Simplex-Virus ausgelöste Apoptose hemmt [217]. In humanen malignen Melanomzellen wurde gezeigt, dass der Knockdown von Noxa durch siRNA signifikant zur Reduktion der Apoptose in Melanomzellen führt [218]. Diese Studien zeigen, dass in der durch Viren ausgelösten Apoptose Noxa ein wichtiges pro-apoptotisches Molekül ist. Die Inhibierung von Noxa hemmt in verschiedenen Studien Apoptose. Möglicherweise könnte dieses Molekül auch im viral induzierten Typ 1 Diabetes ein therapeutisches Zielmolekül darstellen.

Brunelle et al. beschrieben 2009, dass der extrinsische und der intrinsische Weg der Apoptose über das Protein tBid, ein sogenanntes *truncated* Bid, miteinander verbunden werden können [130]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im durch poly(dA:dT) induzierten Zelltod der MIN6-Zellen sowohl der intrinsische, mitochondriale Weg der Apoptose als auch der extrinsische Weg der Apoptose involviert sind. Womöglich sind beide Wege der Apoptose über *truncated* Bid, tBid, miteinander verbunden.

Neben den pro-apoptotischen Proteinen der BH3-only-Familie spielen auch die Transkriptionsfaktoren im durch Zytokine und durch Viren ausgelösten Zelltod eine Rolle. STAT-1 ist der Haupttranskriptionsfaktor im pankreatischen Beta-Zelltod und im Entzündungsprozess der Inselzellen. Moore et al. veröffentlichten 2011 eine Studie, die zeigt, dass die durch IFN- γ -regulierten Transkriptionsfaktoren STAT-1 und IRF1 verschiedene Effekte auf die Beta-Zelle haben. STAT-1 fördert die Apoptose und den Entzündungsprozess in der Beta-Zelle, während IRF-1 die inflammatorischen Mediatoren herunterreguliert. In INS-1-Zellen und in primären Zellen der Ratte reguliert STAT-1 die Zytokin-induzierte Apoptose. STAT-1 hat in den Beta-Zellen der Ratte zu IRF-1 entgegengesetzte Effekte [82]. Streptozotizin führt in C57BL/6-

und in NOD-Mäusen zur Induktion des Typ 1 Diabetes. Die Blockade des Transkriptionsfaktors STAT-1 schützt dabei vor der Entstehung des Typ 1 Diabetes [219].

Mcl-1, *Myeloid cell leukemia sequence 1*, ist ein anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie und hemmt die Apoptose in Beta-Zellen. Allagnat et al. untersuchten 2011 Mcl-1 in INS-1-Zellen. Als Stimulanzien wurden Zytokine, Palmitat und Thapsigarnin verwendet. Nach dem Knockdown von Mcl-1 mit siRNA kam es zu einer starken Zunahme der Apoptose und zur Caspase 3-Aktivierung in INS-1-Zellen. Mcl-1 hemmt die Apoptose in INS-1-Zellen. In weiteren Versuchen wurde Mcl-1 überexprimiert. Die Überexpression von Mcl-1 hemmt die Translokation von Bax zum Mitochondrium, die CytochromC-Freisetzung und die Caspase-3-Aktivierung [220].

Man nimmt heutzutage an, dass der Beta-Zelltod durch verschiedene Gene reguliert wird, welche durch die Transkriptionsfaktoren NF κ B und STAT-1 kontrolliert werden. Apoptose ist ein aktiver, genetisch festgelegter Prozess [83]. Der Zytokin-induzierte Zelltod wurde intensiv untersucht. Die Gruppe um Ortis publizierte 2008, dass IL-1 β und TNF- α zum Zelltod von INS-1-Zellen führen. Beide Zytokine aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Die Blockade von NF- κ B schützt die Beta-Zelle gegen die durch IL-1 β und IFN- γ sowie die durch TNF- α und IFN- γ ausgelöste Apoptose [221]. Neben den Bcl-2-Molekülen scheinen auch die Transkriptionsfaktoren NF κ B und STAT-1 Zielmoleküle neuer Therapien darzustellen. Umweltfaktoren, wie Viren, führen in genetisch determinierten Patienten zur Zerstörung der Beta-Zelle durch das Immunsystem. Die Immunzellen wandern in die Beta-Zelle und führen zur Aktivierung von FasL, Perforin, ROS (*Reactive oxygen species*), NO (*nitric oxide*) und pro-inflammatorischen Zytokinen. Die freigesetzten Zytokine binden an ihre Rezeptoren und aktivieren MAP (*mitogen activated protein*)-Kinasen sowie Transkriptionsfaktoren NF κ B und STAT-1, welche zur Aktivierung von Typ 1-Interferon-induzierten Genen führen und Apoptose in der Beta-Zelle auslösen [222].

4.4 Limitationen der experimentellen Strategie

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit sind jedoch limitiert, da der Effekt von zytosolischer dsDNA nur in Insulinomazellen untersucht wurde. Es bleibt ungewiss, ob poly(dA:dT) ähnliche Effekte in primären Zellen hat. In Vorarbeiten zur vorliegenden Studie wurde poly(dA:dT) in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen intraperitoneal injiziert. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine diabetogene Wirkung und es kam nicht zu einer Bestätigung der in vitro-

Ergebnisse. Das Resultat der durchgeführten in vivo-Studie könnte jedoch durch Störfaktoren verzerrt sein [137].

Eine weitere Limitation der vorliegenden Studie besteht darin, dass als Versuchsreagenz nur poly(dA:dT) benutzt wurde, ein dsDNA-Analogon. Es wurden keine dsDNA-Viren, wie MVA (*Modified Vaccinia Virus*), Herpes-simplex-Viren oder Zytomegalieviren, verwendet. Es ist unbekannt, ob dsDNA-Viren ähnliche Effekte wie poly(dA:dT) aufweisen.

Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin benutzt. In der Annahme, dass es in der Maus oder im Menschen einen ähnlichen Mechanismus geben muss, wurden sowohl MIN6-Zellen als auch INS-1-Zellen mit Lipofectamin transfiziert, um einen Transport von dsDNA in die Zelle zu ermöglichen.

Desweiteren wurden in der vorliegenden Arbeit nur bestimmte Stimulationszeitpunkte wie 6, 12, 18 und 24 Stunden untersucht. In Vorarbeiten kam es bei 24-stündiger Stimulation zu einer Plateauphase und bei längerer Stimulationsdauer zeigte sich ein geringfügiger Anstieg oder eine geringfügige Abnahme der Expression der untersuchten Gene [137].

Außerdem wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, ob sich in den mit poly(dA:dT) transfizierten Zellen die Insulinproduktion verändert. Es ist anzunehmen, dass die apoptotischen MIN6-Zellen kein Insulin mehr produzieren können. In Folgestudien sollte die Insulin-Sekretion in mit dsDNA-Viren infizierten Zellen oder in Maus- bzw. Ratten-Modellen überprüft werden.

4.5 Klinische Bedeutung für den Typ 1 Diabetes

In den letzten Jahren wurden zahlreiche kausale Therapieansätze für den Typ 1 Diabetes erforscht. Man nimmt heutzutage an, dass Typ 1 Diabetes ein durch CD4+T-Helferzellen ausgelöstes Immungeschehen ist, welches zytotoxische CD8+T-Zellen und das angeborene Immunsystem involviert. 1985 fanden Sibley et al. heraus, dass im Pankreas von Typ 1 Diabetikern zytotoxische CD8+T-Zellen die Ursache für die Beta-Zell-Destruktion darstellen [223]. Ein CD3 (*cluster of differentiation*)-Antikörper, welcher gezielt gegen die zytotoxischen CD8+T-Zellen gerichtet ist, kann den Typ 1 Diabetes stark unterdrücken [224]. Regulatorische T-Zellen können den Ausbruch des Typ 1 Diabetes hemmen. In Studien mit NOD-Mäusen wurde herausgefunden, dass Mäuse ohne CD28-Expression, welche keine regulatorischen T-Zellen besitzen, einen verstärkten Typ 1 Diabetes entwickeln [225].

Neben den T-Zellen spielen auch B-Zellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine wichtige Rolle. Die Aktivierung der B-Lymphozyten führt zur Antikörperproduktion. Lange vor dem absoluten Insulinmangel können im Serum von Typ 1 Diabetikern Glutamat-Decarboxylase-Antikörper (GADA), Insulinantikörper (IAA) und Tyrosinphosphataseantikörper (IA-2A), welche gegen die Insulin-produzierenden Beta-Zellen gerichtet sind, nachgewiesen werden [165] [166]. In NOD-Mäusen bewirkt die Hemmung der B-Lymphozyten durch Antikörper oder Genausschaltung eine verbesserte Beta-Zellfunktion [226]. Auch im Menschen bewirkt die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab, der gegen B-Lymphozyten gerichtet ist, eine verbesserte Beta-Zellfunktion [227].

Der Transfer von Knochenmark von einem Patienten mit Typ 1 Diabetes in einen gesunden Menschen führt zur Initiierung des Entzündungsprozesses im Empfänger. In einer Fallstudie aus dem Jahr 1993 erkrankte eine 29-jährige Frau, die vier Jahre zuvor Knochenmarkstammzellen ihres HLA-identischen und an Typ 1 Diabetes erkrankten Bruders erhalten hatte, an Typ 1 Diabetes [228]. Womöglich könnte eine Knochenmarktransplantation eine Progression des Typ 1 Diabetes hemmen.

Weitere Studien fanden heraus, dass eine Blockade der Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und CXCL10 das Auftreten eines Typ 1 Diabetes reduziert [229]. Kleine Moleküle, die gegen die Zytokine gerichtet sind, blockieren die Apoptose in INS-1-Zellen [230].

Organproben, welche vom *Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes* gesammelt werden, könnten Aufschluss über weitere Therapieansätze geben. Sollten bei den meisten Organproben Enteroviren oder andere dsRNA-Viren, dsDNA-Viren, IFN- α , IFN- β und MHC-Klasse-I-Moleküle nachgewiesen werden können, sollte versucht werden eine Impfung zu entwickeln [102,103]. Um den Zelltod zu verhindern, muss der initiale Auslöser der Insulitis und des Immunprozesses erforscht werden. Die Hemmung der Caspasen und der proapoptischen BH3-only-Proteine ist ebenfalls zu erwägen. Eine nur in Beta-Zellen des Pankreas wirkende Blockade von Noxa und Puma könnte die Apoptose von Insulin-produzierenden Beta-Zellen verhindern.

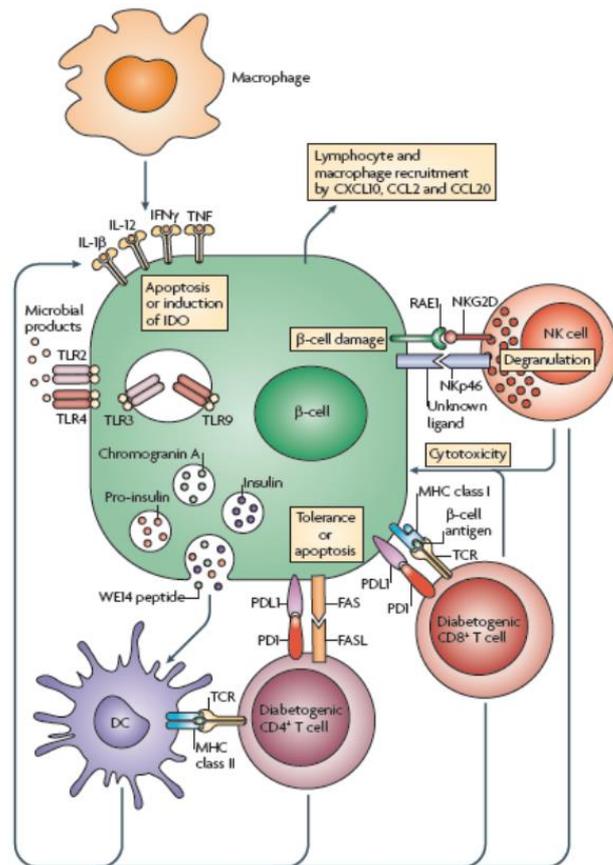


Abbildung 56: Pathogenese des Typ 1 Diabetes. Moleküle, welche in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes eine Rolle spielen und welche als Zielmoleküle für neue kausale Therapien benutzt werden könnten [29].

Eine weitere Möglichkeit wäre, Typ I-Interferone, welche den Teufelskreis von Insulitis und Apoptose aufrechterhalten, zu hemmen. In anderen Autoimmunerkrankungen, wie dem SLE und der viral-getriggerten Glomerulonephritis, wurde die Blockade der Typ I-Interferone bereits beschrieben [192].

Poly(dA:dT) führt zur Hochregulation von zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren, zur Expression von Typ I-Interferon IFN- β und zur Expression von Typ I-Interferon-induzierten Genen wie IFIT1, MX1 und OASL2. Desweiteren löst dsDNA in Insulin-produzierenden MIN6-Zellen und INS-1-Zellen Apoptose aus. Womöglich könnten dsDNA-Viren im Menschen eine ähnliche Wirkung haben. Mittels primärer Beta-Zellen aus Maus und Ratte sowie mit Hilfe von Tiermodellen, wie NOD-Mäusen, BBDR-Ratten oder BBDP-Ratten, sowie mittels humanen Beta-Zellen oder humanen Organproben sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit überprüft werden.

Kapitel 5: Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Virale Infektionen sind mit der Pathogenese des Typ 1 Diabetes assoziiert. Vor allem spielen ssRNA-Viren, wie Coxsackie-Viren, hierbei eine Rolle. Experimentelle und epidemiologische Daten weisen jedoch auch darauf hin, dass DNA-Viren bei der Auslösung des Typ 1 Diabetes beteiligt sind. Es ist bekannt, dass poly(I:C), ein dsRNA-Analogon, über die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 3 und des Transkriptionsfaktors IRF3 zur Apoptose von murinen Beta-Zellen führt [50]. Bisher war unklar, ob das dsDNA-Analogon poly(dA:dT) ebenfalls zur Apoptose von Insulin-produzierenden Zellen führt. Desweiteren war unbekannt, ob es zur Expression von Typ I-Interferonen kommt und welche Rezeptorwege dabei eine Rolle spielen.

Poly(dA:dT) könnte in MIN6-Zellen über die Rezeptoren des innate Immunsystems zur Expression von Typ I-Interferonen und zu Apoptose von Beta-Zellen des Pankreas führen.

Poly(dA:dT) führt zur Hochregulation der RNA-Erkennungsrezeptoren MDA-5 und RIG-I in MIN6-Zellen, in INS-1-Zellen nur zur Hochregulation von RIG-I. Über Polymerase III könnte poly(dA:dT) in RNA umgeschrieben und so durch RIG-I erkannt werden. Virale DNA induziert, wenn sie mit kationischen Lipiden komplexiert ist, die Expression von Typ I-Interferonen, Chemokinen und Zytokinen. Poly(dA:dT) induziert die Aktivierung des Typ I-Interferons IFN- β . Außerdem führt poly(dA:dT) zur Hochregulation von Typ I-Interferon-induzierten Genen wie OASL2, IFIT1 und MX1, welche eine Vielzahl von antiviralen Effekten haben und Apoptose induzieren. Poly(dA:dT) reguliert das Chemokin CXCL10 hoch, das in vivo zur Rekrutierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen an die Beta-Zelle führt.

Poly(dA:dT) führt zur Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 9. Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Weg der Apoptose wird aktiviert. Im mitochondrialen Weg der Apoptose induziert poly(dA:dT) die Aktivierung von BH3-only-Molekülen Noxa und Puma.

Poly(dA:dT) aktiviert, wenn es in das Zytosol gelangt, dsDNA-Rezeptoren und führt über Transkriptionsfaktoren zur Induktion von Genen, welche Typ I-Interferone, Typ I-Interferon-induzierte Gene und Chemokine aktivieren. Diese Typ I-Interferon-Produktion aktiviert Beta-Zell-Apoptose. Poly(dA:dT) führt in MIN6- und in INS-1-Zellen zur Aktivierung der antiviralen Immunantwort und zu Apoptose. Der Entzündungsprozess mit nachfolgender Apoptose ist ein wesentliches Element des viral ausgelösten Typ 1 Diabetes.

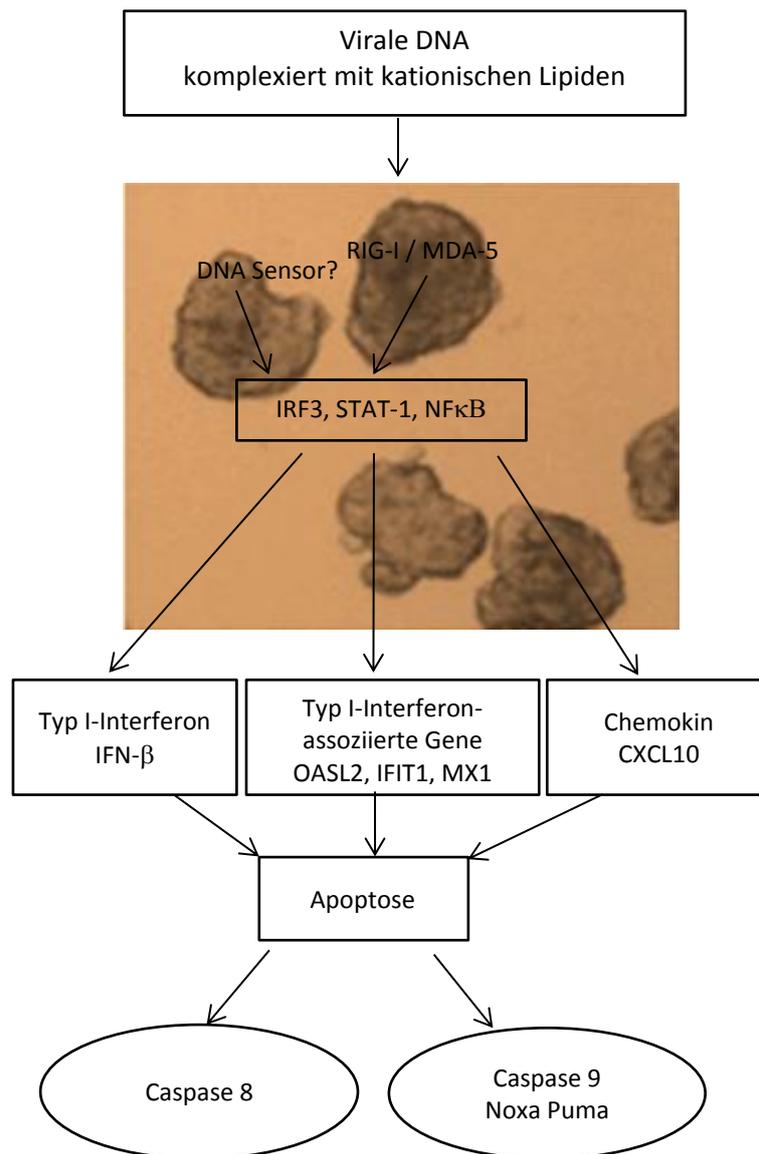


Abbildung 57: Antivirale Immunantwort und Virus-induzierte Apoptose von Insulin-produzierenden Zellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes. MIN6-Zellen können das dsDNA-Analogon poly(dA:dT) im Zytosol über RIG-I bzw. MDA-5 sowie über weitere unbekannte DNA-Rezeptoren erkennen. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zur Hochregulation von Transkriptionsfaktoren wie IRF-3, NFκB und STAT-1. Es kommt zur Expression von Typ I-Interferon IFN-β, Typ I-Interferon-induzierten Genen, wie IFIT1, OASL2 und MX1, sowie zur Hochregulation des Chemokins CXCL10. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Apoptose. Der intrinsische Weg der Apoptose mit Aktivierung der Caspase 9 und der extrinsische Weg der Apoptose mit Aktivierung der Caspase 8 werden induziert. Desweiteren werden die pro-apoptischen Proteine Noxa und Puma aktiviert.

6 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen wie folgt publiziert werden:

Stephanie Käser, Christian Schweninger, Khader Valli Rupanagudi, Ramanjaneyulu Allam, Jochen Seißler, Hans-Joachim Anders, Julia Lichtnekert, Cytosolic double stranded DNA induces apoptosis and upregulation of inflammatory genes in pancreatic beta cells, Manuskript in Vorbereitung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

Käser S., et al., Antivirale Immunantwort und Virus-induzierte Apoptose von Insulin-produzierenden Zellen durch zytosolische DNA, 117. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Rhein-Main Hallen, Wiesbaden, 30. April - 3. Mai 2011

Käser S., et al., DsDNA (polydA:dT) leads to apoptosis of insulin producing β -cells, TOLL2011, Decoding Innate Immunity, Riva del Garda, Italy, May 4th -7th, 2011

7 Literaturverzeichnis

1. Meier JJ, Meier M (2002) [Description of diabetes by Aretaios von Kappadokien. A miserable, difficult life]. *MMW Fortschr Med* 144: 68-69.
2. Schadewaldt H (1977) [Paracelsus and diabetes mellitus]. *Med Klin* 72: 875-878.
3. Adlersberg D (1955) Adolf Kussmaul. *Diabetes* 4: 76-78.
4. Barach JH (1952) Paul Langerhans, 1847-1888. *Diabetes* 1: 411-413.
5. Dittrich HM, Hahn von Dorsche H (1978) [The anatomical and histological investigation of the pancreas in the 19th century and till the discovery of insulin (1921) 3. The discovery of the pancreas-diabetes by von Mering and Minkowski (1889) (author's transl)]. *Anat Anz* 143: 509-517.
6. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA (1922) Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 12: 141-146.
7. Kenez J (1978) [Who invented insulin? (Charles H. Best, Frederick Grant Banting)]. *Orv Hetil* 119: 2693-2699.
8. Banting FG, Best CH (2007) The internal secretion of the pancreas. 1922. *Indian J Med Res* 125: 251-266.
9. Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553.
10. Statistisches Bundesamt W (2012) Bevölkerung nach Altergruppen, Familienstand und Religionszugehörigkeit. www.destatis.de.
11. Statistisches Bundesamt W (2012) Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Diabetes Kapitel 1.2.1 [Gesundheit in Deutschland, 2006]. www.gbe-bund.de.
12. Kyvik KO, Nystrom L, Gorus F, Songini M, Oestman J, et al. (2004) The epidemiology of Type 1 diabetes mellitus is not the same in young adults as in children. *Diabetologia* 47: 377-384.
13. Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA, Gleason RE, Kaldany A, et al. (1983) Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Ann Intern Med* 99: 320-326.
14. Muntau A (2011) Intensivkurs Pädiatrie. München: Elsevier, Urban & Fischer. XVII, 574 S. p.
15. Zipris D (2009) Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms. *Clin Immunol* 131: 11-23.
16. Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J (2008) Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 371: 1777-1782.
17. DIAMOND Project Group (2006) Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med* 23: 857-866.
18. Marcovecchio ML, Chiarelli F (2011) Microvascular disease in children and adolescents with type 1 diabetes and obesity. *Pediatr Nephrol* 26: 365-375.
19. QUASINiere (2005/2006) Qualitätssicherung in der chronischen Nierenersatztherapie (Dialyse und Nierentransplantation). Bericht.
20. Cheung N, Mitchell P, Wong TY (2010) Diabetic retinopathy. *Lancet* 376: 124-136.
21. Trotta D, Verrotti A, Salladini C, Chiarelli F (2004) Diabetic neuropathy in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 5: 44-57.
22. Dahl-Jorgensen K, Larsen JR, Hanssen KF (2005) Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia* 48: 1445-1453.
23. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Botha JL, Burden AC, et al. (1999) The British Diabetic Association Cohort Study, I: all-cause mortality in patients with insulin-treated diabetes mellitus. *Diabet Med* 16: 459-465.

24. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, et al. (2003) Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 46: 760-765.
25. Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Molarius A, Forsen T, Rastenyte D, et al. (1998) Incidence of cardiovascular disease in Type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects with and without diabetic nephropathy in Finland. *Diabetologia* 41: 784-790.
26. Jahromi MM, Eisenbarth GS (2006) Genetic determinants of type 1 diabetes across populations. *Ann N Y Acad Sci* 1079: 289-299.
27. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, et al. (2006) Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14074-14079.
28. Sanjeevi CB, DeWeese C, Landin-Olsson M, Kockum I, Dahlquist G, et al. (1997) Analysis of critical residues of HLA-DQ6 molecules in insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 50: 61-65.
29. Lehuen A, Diana J, Zacccone P, Cooke A (2010) Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* 10: 501-513.
30. Sadeharju K, Knip M, Virtanen SM, Savilahti E, Tauriainen S, et al. (2007) Maternal antibodies in breast milk protect the child from enterovirus infections. *Pediatrics* 119: 941-946.
31. Akerblom HK, Vaarala O, Hyoty H, Ilonen J, Knip M (2002) Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 115: 18-29.
32. Wagener DK, LaPorte RE, Orchard TJ, Cavender D, Kuller LH, et al. (1983) The Pittsburgh diabetes mellitus study. 3: An increased prevalence with older maternal age. *Diabetologia* 25: 82-85.
33. Myers MA, Mackay IR, Rowley MJ, Zimmet PZ (2001) Dietary microbial toxins and type 1 diabetes--a new meaning for seed and soil. *Diabetologia* 44: 1199-1200.
34. Strachan DP (2000) Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55 Suppl 1: S2-10.
35. Kolb H, Elliott RB (1994) Increasing incidence of IDDM a consequence of improved hygiene? *Diabetologia* 37: 729.
36. Kilkinen A, Virtanen SM, Klaukka T, Kenward MG, Salkinoja-Salonen M, et al. (2006) Use of antimicrobials and risk of type 1 diabetes in a population-based mother-child cohort. *Diabetologia* 49: 66-70.
37. Bach JF (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347: 911-920.
38. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, et al. (2005) Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2: S97-107.
39. Böcker W (2004) *Pathologie mit 164 Tabellen. 3., völlig überarb. Aufl. ed. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. pp. XXXII, 1290 S. : Ill., graph. Darst.*
40. Goubau D, Romieu-Mourez R, Solis M, Hernandez E, Mesplede T, et al. (2009) Transcriptional re-programming of primary macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7. *Eur J Immunol* 39: 527-540.
41. Jaidane H, Sane F, Gharbi J, Aouni M, Romond MB, et al. (2009) Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. *Diabetes Metab Res Rev* 25: 591-603.
42. Hiltunen M, Hyoty H, Karjalainen J, Leinikki P, Knip M, et al. (1995) Serological evaluation of the role of cytomegalovirus in the pathogenesis of IDDM: a prospective study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 38: 705-710.
43. Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW (1988) Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2: 1-4.
44. Jali MV, Shankar PS (1990) Transient diabetes following chicken pox. *J Assoc Physicians India* 38: 663-664.

45. van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL (2007) Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 169-183.
46. McCartney SA, Colonna M (2009) Viral sensors: diversity in pathogen recognition. *Immunol Rev* 227: 87-94.
47. Foulis AK, Farquharson MA, Meager A (1987) Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 2: 1423-1427.
48. Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, et al. (2007) 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* 104: 5115-5120.
49. Hober D, Sane F (2010) Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov Med* 10: 151-160.
50. Dogusan Z, Garcia M, Flamez D, Alexopoulou L, Goldman M, et al. (2008) Double-stranded RNA induces pancreatic beta-cell apoptosis by activation of the toll-like receptor 3 and interferon regulatory factor 3 pathways. *Diabetes* 57: 1236-1245.
51. Yoon JW, Jun HS (2004) Viruses in type 1 diabetes: brief review. *ILAR J* 45: 343-348.
52. Ellerman KE, Richards CA, Guberski DL, Shek WR, Like AA (1996) Kilham rat triggers T-cell-dependent autoimmune diabetes in multiple strains of rat. *Diabetes* 45: 557-562.
53. Zipris D, Lien E, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP, et al. (2005) TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol* 174: 131-142.
54. Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305.
55. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
56. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42: 779-789.
57. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S (2007) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261: 511-528.
58. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, et al. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
59. Akira S (2011) Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366: 2748-2755.
60. Creagh EM, O'Neill LA (2006) TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol* 27: 352-357.
61. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, et al. (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23: 19-28.
62. Hornung V, Latz E (2010) Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 10: 123-130.
63. Zipris D, Lien E, Nair A, Xie JX, Greiner DL, et al. (2007) TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat. *J Immunol* 178: 693-701.
64. Vilaysane A, Muruve DA (2009) The innate immune response to DNA. *Semin Immunol* 21: 208-214.
65. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, et al. (2004) Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11416-11421.
66. Stetson DB, Medzhitov R (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24: 93-103.
67. Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, et al. (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7: 40-48.
68. Yoshida H, Okabe Y, Kawane K, Fukuyama H, Nagata S (2005) Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat Immunol* 6: 49-56.

69. Okabe Y, Kawane K, Akira S, Taniguchi T, Nagata S (2005) Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med* 202: 1333-1339.
70. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, et al. (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501-505.
71. Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, et al. (2008) TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451: 725-729.
72. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, et al. (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458: 514-518.
73. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458: 509-513.
74. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, et al. (2009) An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 10: 266-272.
75. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138: 576-591.
76. Ishikawa H, Barber GN (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455: 674-678.
77. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
78. Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, et al. (2010) The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol* 11: 487-494.
79. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, et al. (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 11: 997-1004.
80. Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420: 1-16.
81. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F (2009) The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 5: 219-226.
82. Moore F, Naamane N, Colli ML, Bouckennooghe T, Ortis F, et al. (2011) STAT1 is a master regulator of pancreatic β -cell apoptosis and islet inflammation. *J Biol Chem* 286: 929-941.
83. Eizirik DL, Moore F, Flamez D, Ortis F (2008) Use of a systems biology approach to understand pancreatic beta-cell death in Type 1 diabetes. *Biochem Soc Trans* 36: 321-327.
84. Hsieh MF, Lai SL, Chen JP, Sung JM, Lin YL, et al. (2006) Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus. *J Immunol* 177: 1855-1863.
85. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.
86. Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202: 8-32.
87. Pestka S (1986) Interferon from 1981 to 1986. *Methods Enzymol* 119: 3-14.
88. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, et al. (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4: 69-77.
89. Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147: 258-267.
90. Hengel H, Koszinowski UH, Conzelmann KK (2005) Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol* 26: 396-401.

91. Devendra D, Jasinski J, Melanitou E, Nakayama M, Li M, et al. (2005) Interferon-alpha as a mediator of polyinosinic:polycytidylic acid-induced type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 2549-2556.
92. Pestka S (1997) The interferon receptors. *Semin Oncol* 24: S9-18-S19-40.
93. Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8: 559-568.
94. Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X (2013) Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol Mol Biol Rev* 77: 551-566.
95. Arnharter H, Meier E (1990) Mx proteins: antiviral proteins by chance or by necessity? *New Biol* 2: 851-857.
96. Haller O, Staeheli P, Kochs G (2007) Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89: 812-818.
97. Eskildsen S, Justesen J, Schierup MH, Hartmann R (2003) Characterization of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. *Nucleic Acids Res* 31: 3166-3173.
98. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH (2007) Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 448: 816-819.
99. Fensterl V, Sen GC (2011) The ISG56/IFIT1 gene family. *J Interferon Cytokine Res* 31: 71-78.
100. Terenzi F, Saikia P, Sen GC (2008) Interferon-inducible protein, P56, inhibits HPV DNA replication by binding to the viral protein E1. *EMBO J* 27: 3311-3321.
101. Chastain EM, Miller SD (2012) Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev* 245: 227-238.
102. von Herrath M (2009) Diabetes: A virus-gene collaboration. *Nature* 459: 518-519.
103. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA (2009) Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324: 387-389.
104. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
105. Kuranaga E (2012) Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes Cells*.
106. Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22: 8543-8567.
107. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
108. Adams JM (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17: 2481-2495.
109. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
110. Riedl SJ, Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 405-413.
111. Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
112. Talos F, Petrenko O, Mena P, Moll UM (2005) Mitochondrially targeted p53 has tumor suppressor activities in vivo. *Cancer Res* 65: 9971-9981.
113. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W (2005) Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17: 631-636.
114. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7: 673-682.
115. Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, et al. (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4: 842-849.
116. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, et al. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-1058.
117. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, et al. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-590.

118. Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, et al. (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275: 6067-6070.
119. Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ (1999) Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 274: 20855-20860.
120. Murphy TM, Perry AS, Lawler M (2008) The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 15: 11-25.
121. Walczak H, Krammer PH (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256: 58-66.
122. Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.
123. MacFarlane M, Williams AC (2004) Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5: 674-678.
124. Li K, Tong WH, Hughes RM, Rouault TA (2006) Roles of the mammalian cytosolic cysteine desulfurase, ISCS, and scaffold protein, ISCU, in iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* 281: 12344-12351.
125. Jabbour AM, Heraud JE, Daunt CP, Kaufmann T, Sandow J, et al. (2009) Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death Differ* 16: 555-563.
126. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17: 3878-3885.
127. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, et al. (2009) Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 36: 487-499.
128. Clarke P, Tyler KL (2009) Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol* 7: 144-155.
129. Gurzov EN, Germano CM, Cunha DA, Ortis F, Vanderwinden JM, et al. (2010) p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 285: 19910-19920.
130. Brunelle JK, Letai A (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 122: 437-441.
131. Sun Y, Leaman DW (2005) Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection. *J Biol Chem* 280: 15561-15568.
132. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, et al. (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127: 126-132.
133. Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, et al. (1993) Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36: 1139-1145.
134. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, et al. (1992) Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-178.
135. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, et al. (2000) Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49: 424-430.
136. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, et al. (2005) Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 11: 138-145.
137. Schweninger C (2012) Die Rolle von zytosolischer DNA in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
138. Whiteside G, Coughon N, Hunt SP, Munglani R (1998) An improved method for detection of apoptosis in tissue sections and cell culture, using the TUNEL technique combined with Hoechst stain. *Brain Res Brain Res Protoc* 2: 160-164.

139. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501.
140. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, et al. (1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21: 1465-1468.
141. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC (2003) A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1309-1318.
142. Harding A (2005) Sir Edwin Southern: scientist as problem solver. *Lancet* 366: 1919.
143. Signaling C (1999-2012) www.cellsignal.com.
144. Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z (2011) Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol* 103: 55-98.
145. Mauro F, Teodori L, Schumann J, Gohde W (1986) Flow cytometry as a tool for the prognostic assessment of human neoplasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 625-636.
146. Universität Hamburg FC (2010) www.chemie.uni-hamburg.de.
147. Baltimore D (1995) Discovery of the reverse transcriptase. *FASEB J* 9: 1660-1663.
148. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
149. Jansohn M (2007) *Gentechnische Methoden eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl. XXII, 618 S. p.
150. Holzapfel B (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 37: 120-126.
151. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN (2007) TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 13: 543-551.
152. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, et al. (2011) CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 121-130.
153. Sarkar SA, Lee CE, Victorino F, Nguyen TT, Walters JA, et al. (2012) Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. *Diabetes* 61: 436-446.
154. Samejima K, Earnshaw WC (2005) Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 677-688.
155. Zhao Y, Sui X, Ren H (2010) From procaspase-8 to caspase-8: revisiting structural functions of caspase-8. *J Cell Physiol* 225: 316-320.
156. Rassow J (2012) *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag.
157. Yuan S, Akey CW (2013) Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 21: 501-515.
158. Atkinson MA, Eisenbarth GS (2001) Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358: 221-229.
159. Gianani R, Eisenbarth GS (2005) The stages of type 1A diabetes: 2005. *Immunol Rev* 204: 232-249.
160. Nagata S, Kawane K (2011) Autoinflammation by endogenous DNA. *Adv Immunol* 110: 139-161.
161. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E (1995) Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol* 155: 5419-5426.
162. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, et al. (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222: 1337-1339.

163. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, et al. (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-156.
164. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, et al. (2007) The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17040-17045.
165. Hampe CS (2012) Protective role of anti-idiotypic antibodies in autoimmunity - Lessons for type 1 diabetes. *Autoimmunity*.
166. Nokoff NJ, Rewers M, Cree Green M (2012) The interplay of autoimmunity and insulin resistance in type 1 diabetes. *Discov Med* 13: 115-122.
167. Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, et al. (2005) Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18425-18430.
168. Takeuchi O, Akira S (2007) Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* 220: 214-224.
169. Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ (2011) Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol* 1: 226-232.
170. Wen L, Peng J, Li Z, Wong FS (2004) The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets. *J Immunol* 172: 3173-3180.
171. Rasschaert J, Ladriere L, Urbain M, Dogusan Z, Katabua B, et al. (2005) Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 280: 33984-33991.
172. Kim HS, Han MS, Chung KW, Kim S, Kim E, et al. (2007) Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes. *Immunity* 27: 321-333.
173. Kim DH, Lee JC, Kim S, Oh SH, Lee MK, et al. (2011) Inhibition of autoimmune diabetes by TLR2 tolerance. *J Immunol* 187: 5211-5220.
174. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, et al. (2006) Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest* 116: 2022-2032.
175. Lee SM, Choi SE, Lee JH, Lee JJ, Jung IR, et al. (2011) Involvement of the TLR4 (Toll-like receptor4) signaling pathway in palmitate-induced INS-1 beta cell death. *Mol Cell Biochem* 354: 207-217.
176. Takasawa N, Munakata Y, Ishii KK, Takahashi Y, Takahashi M, et al. (2004) Human parvovirus B19 transgenic mice become susceptible to polyarthritis. *J Immunol* 173: 4675-4683.
177. Hultcrantz M, Huhn MH, Wolf M, Olsson A, Jacobson S, et al. (2007) Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cells. *Virology* 367: 92-101.
178. Garcia M, Dogusan Z, Moore F, Sato S, Hartmann G, et al. (2009) Regulation and function of the cytosolic viral RNA sensor RIG-I in pancreatic beta cells. *Biochim Biophys Acta* 1793: 1768-1775.
179. Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, Eitel J, Meixenberger K, et al. (2008) IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol* 10: 2579-2588.
180. Veeranki S, Duan X, Panchanathan R, Liu H, Choubey D (2011) IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes. *PLoS One* 6: e27040.
181. Colli ML, Moore F, Gurzov EN, Ortis F, Eizirik DL (2010) MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA. *Hum Mol Genet* 19: 135-146.

182. Hagele H, Allam R, Pawar RD, Anders HJ (2009) Double-stranded RNA activates type I interferon secretion in glomerular endothelial cells via retinoic acid-inducible gene (RIG)-1. *Nephrol Dial Transplant* 24: 3312-3318.
183. Hagele H, Allam R, Pawar RD, Reichel CA, Krombach F, et al. (2009) Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and enhances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway. *Am J Pathol* 175: 1896-1904.
184. Flur K, Allam R, Zecher D, Kulkarni OP, Lichtnekert J, et al. (2009) Viral RNA induces type I interferon-dependent cytokine release and cell death in mesangial cells via melanoma-differentiation-associated gene-5: Implications for viral infection-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol* 175: 2014-2022.
185. Allam R, Lichtnekert J, Moll AG, Taubitz A, Vielhauer V, et al. (2009) Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 20: 1986-1996.
186. Pulit-Penalosa JA, Scherbik SV, Brinton MA (2012) Type 1 IFN-independent activation of a subset of interferon stimulated genes in West Nile virus Eg101-infected mouse cells. *Virology* 425: 82-94.
187. Lind K, Richardson SJ, Leete P, Morgan NG, Korsgren O, et al. (2013) Induction of an antiviral state and attenuated coxsackievirus replication in type III interferon-treated primary human pancreatic islets. *J Virol* 87: 7646-7654.
188. Sin WX, Li P, Yeong JP, Chin KC (2012) Activation and regulation of interferon-beta in immune responses. *Immunol Res*.
189. Hsu AC, Parsons K, Barr I, Lowther S, Middleton D, et al. (2012) Critical role of constitutive type I interferon response in bronchial epithelial cell to influenza infection. *PLoS One* 7: e32947.
190. McDermott JE, Archuleta M, Thrall BD, Adkins JN, Waters KM (2011) Controlling the response: predictive modeling of a highly central, pathogen-targeted core response module in macrophage activation. *PLoS One* 6: e14673.
191. Weighardt H, Kaiser-Moore S, Schlautkotter S, Rossmann-Bloek T, Schleicher U, et al. (2006) Type I IFN modulates host defense and late hyperinflammation in septic peritonitis. *J Immunol* 177: 5623-5630.
192. Anders HJ (2009) Pseudoviral immunity - a novel concept for lupus. *Trends Mol Med* 15: 553-561.
193. Wan S, Pestka S, Jubin RG, Lyu YL, Tsai YC, et al. (2012) Chemotherapeutics and Radiation Stimulate MHC Class I Expression through Elevated Interferon-beta Signaling in Breast Cancer Cells. *PLoS One* 7: e32542.
194. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, et al. (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6: 975-990.
195. Loma I, Heyman R (2011) Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuropharmacol* 9: 409-416.
196. Wenzel J, Worenkamper E, Freutel S, Henze S, Haller O, et al. (2005) Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol* 205: 435-442.
197. Berg AK, Korsgren O, Frisk G (2006) Induction of the chemokine interferon-gamma-inducible protein-10 in human pancreatic islets during enterovirus infection. *Diabetologia* 49: 2697-2703.
198. Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, et al. (2001) Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24: 510-515.
199. Nicoletti F, Conget I, Di Mauro M, Di Marco R, Mazarino MC, et al. (2002) Serum concentrations of the interferon-gamma-inducible chemokine IP-10/CXCL10 are augmented in both newly diagnosed Type I diabetes mellitus patients and subjects at risk of developing the disease. *Diabetologia* 45: 1107-1110.

200. Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, Chen MC, Mathieu C, et al. (2003) 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* 46: 255-266.
201. Christen U, McGavern DB, Luster AD, von Herrath MG, Oldstone MB (2003) Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *J Immunol* 171: 6838-6845.
202. Liu D, Cardozo AK, Darville MI, Eizirik DL (2002) 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* 143: 1225-1234.
203. Prens EP, Kant M, van Dijk G, van der Wel LI, Mourits S, et al. (2008) IFN-alpha enhances poly-IC responses in human keratinocytes by inducing expression of cytosolic innate RNA receptors: relevance for psoriasis. *J Invest Dermatol* 128: 932-938.
204. Salazar-Mather TP, Lewis CA, Biron CA (2002) Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1alpha delivery to the liver. *J Clin Invest* 110: 321-330.
205. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
206. Rock KL, Kono H (2008) The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 3: 99-126.
207. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T (2001) A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44: 2115-2133.
208. Liadis N, Murakami K, Eweida M, Elford AR, Sheu L, et al. (2005) Caspase-3-dependent beta-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus. *Mol Cell Biol* 25: 3620-3629.
209. Choi D, Woo M (2010) Executioners of apoptosis in pancreatic {beta}-cells: not just for cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E735-741.
210. Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, et al. (1999) Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 1332-1340.
211. Gurzov EN, Eizirik DL (2011) Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of beta-cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol* 21: 424-431.
212. McKenzie MD, Jamieson E, Jansen ES, Scott CL, Huang DC, et al. (2010) Glucose induces pancreatic islet cell apoptosis that requires the BH3-only proteins Bim and Puma and multi-BH domain protein Bax. *Diabetes* 59: 644-652.
213. Eitz Ferrer P, Potthoff S, Kirschnek S, Gasteiger G, Kastenmuller W, et al. (2011) Induction of Noxa-mediated apoptosis by modified vaccinia virus Ankara depends on viral recognition by cytosolic helicases, leading to IRF-3/IFN-beta-dependent induction of pro-apoptotic Noxa. *PLoS Pathog* 7: e1002083.
214. Lallemand C, Blanchard B, Palmieri M, Lebon P, May E, et al. (2007) Single-stranded RNA viruses inactivate the transcriptional activity of p53 but induce NOXA-dependent apoptosis via post-translational modifications of IRF-1, IRF-3 and CREB. *Oncogene* 26: 328-338.
215. Lee YS, Li N, Shin S, Jun HS (2009) Role of nitric oxide in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice. *J Virol* 83: 8004-8011.
216. Barber GN (2001) Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 8: 113-126.
217. Rosebeck S, Sudini K, Chen T, Leaman DW (2011) Involvement of Noxa in mediating cellular ER stress responses to lytic virus infection. *Virology* 417: 293-303.
218. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, et al. (2009) Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* 119: 2399-2411.

219. Callewaert HI, Gysemans CA, Ladriere L, D'Hertog W, Hagenbrock J, et al. (2007) Deletion of STAT-1 pancreatic islets protects against streptozotocin-induced diabetes and early graft failure but not against late rejection. *Diabetes* 56: 2169-2173.
220. Allagnat F, Cunha D, Moore F, Vanderwinden JM, Eizirik DL, et al. (2011) Mcl-1 downregulation by pro-inflammatory cytokines and palmitate is an early event contributing to beta-cell apoptosis. *Cell Death Differ* 18: 328-337.
221. Ortis F, Pirot P, Naamane N, Kreins AY, Rasschaert J, et al. (2008) Induction of nuclear factor-kappaB and its downstream genes by TNF-alpha and IL-1beta has a pro-apoptotic role in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 51: 1213-1225.
222. Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL (2008) Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52: 156-165.
223. Sibley RK, Sutherland DE, Goetz F, Michael AF (1985) Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab Invest* 53: 132-144.
224. Chatenoud L (2010) Immune therapy for type 1 diabetes mellitus-what is unique about anti-CD3 antibodies? *Nat Rev Endocrinol* 6: 149-157.
225. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, et al. (2000) B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12: 431-440.
226. Hu CY, Rodriguez-Pinto D, Du W, Ahuja A, Henegariu O, et al. (2007) Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest* 117: 3857-3867.
227. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, et al. (2009) Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 361: 2143-2152.
228. Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, Schaefer UW, Wernet P, et al. (1993) Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 341: 1243-1244.
229. Seewaldt S, Thomas HE, Ejrnaes M, Christen U, Wolfe T, et al. (2000) Virus-induced autoimmune diabetes: most beta-cells die through inflammatory cytokines and not perforin from autoreactive (anti-viral) cytotoxic T-lymphocytes. *Diabetes* 49: 1801-1809.
230. Faloon PW, Chou DHC, Forbeck EM, Walpita D, Morgan B, et al. (2010) Identification of Small Molecule Inhibitors that Suppress Cytokine-Induced Apoptosis in Human Pancreatic Islet Cells. *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda (MD).

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1: Inzidenz des Typ 1 Diabetes bei Kindern unter 14 Jahre (pro 100 000 Einwohner pro Jahr)
- Abbildung 2: Trend der Inzidenzraten in Europa bei Kindern von 0-14 Jahren
- Abbildung 3: Diagnosen bei Beginn der Nierenersatztherapie
- Abbildung 4: Lymphozytäre Infiltration in die Beta-Zelle
- Abbildung 5: TLR-Liganden und ihre Signalwege
- Abbildung 6: RIG- I like Rezeptoren (RLR)
- Abbildung 7: RIG-I als DNA-Sensor
- Abbildung 8: Die Erkennung von DNA durch DNA-Rezeptoren
- Abbildung 9: Interaktion zwischen der Beta-Zelle und den Immunzellen führt zur Induktion und Amplifikation der Insulitis
- Abbildung 10: DsRNA aktiviert TLR3
- Abbildung 11: Aktivierung der ISG56/IFIT1-Gene
- Abbildung 12: Viren infizieren die Beta-Zelle und aktivieren zytosolische Rezeptoren wie IFIH1, auch als MDA-5 bekannt
- Abbildung 13: Intrinsischer und extrinsischer Weg der Apoptose
- Abbildung 14: Der intrinsische Weg der Apoptose
- Abbildung 15: Der extrinsische Weg der Apoptose
- Abbildung 16: Rolle des BH3-only-Moleküls t-Bid (truncated-Bid)
- Abbildung 17: Die BH3-only-Proteine der Bcl-2 (B-cell-lymphoma 2)-Familie
- Abbildung 18: Interaktionen zwischen den Sensibilisatoren und den Aktivatoren der BH3-only-Familie
- Abbildung 19: Laufen der Proteine
- Abbildung 20: Western Blotting

Abbildung 21: FACS-Gerät

Abbildung 22: Die Polymerase-Kettenreaktion

Abbildung 23: TaqMan

Abbildung 24: FRET

Abbildung 25: LightCycler

Abbildung 26: Schmelzpunktanalyse

Abbildung 27: Hochregulation der zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren RIG-I und MDA-5 in MIN6-Zellen

Abbildung 28: Hochregulation von IFN- β nach Stimulation mit poly(dA:dT)

Abbildung 29: Poly(dA:dT) induziert die Hochregulation von IFIT1/P56 in MIN6-Zellen

Abbildung 30: Hochregulation von MX1 nach Stimulation mit poly(dA:dT) in MIN6-Zellen

Abbildung 31: Hochregulation von OASL2 nach Stimulation mit poly(dA:dT) in MIN6-Zellen

Abbildung 32: Hochregulation von CXCL10 nach Stimulation mit poly(dA:dT) in MIN6-Zellen

Abbildung 33: Hochregulation von RIG-I in INS-1-Zellen

Abbildung 34: Hochregulation von IFN- β in INS-1-Zellen

Abbildung 35: Hochregulation von IFIT1 in INS-1-Zellen

Abbildung 36: Hochregulation von MX1 in INS-1-Zellen

Abbildung 37: Hochregulation von OASL2 in INS-1-Zellen

Abbildung 38: Hochregulation von CXCL10 in INS-1-Zellen

Abbildung 39: TUNEL-Färbung von Beta-Zellen

Abbildung 40: Prozentsatz der TUNEL-positiven Zellen

Abbildung 41: Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 8 in MIN6-Zellen

Abbildung 42: Densitometrische Analyse der Caspase 8

Abbildung 43: Densitometrische Analyse der Caspase 8-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression

Abbildung 44: Densitometrische Analyse der Procaspase 8-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression

Abbildung 45: Poly(dA:dT) aktiviert Caspase 9 in MIN6-Zellen

Abbildung 46: Densitometrische Analyse der Caspase 9-Aktivierung

Abbildung 47: Densitometrische Analyse der Caspase 9-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression

Abbildung 48: Densitometrische Analyse der Procaspase 9-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression

Abbildung 49: Poly(dA:dT) führt im FACS-Experiment zu frühapoptotischen, Annexin V positiven und PI negativen Zellen

Abbildung 50: Poly(dA:dT) führt im FACS-Experiment zu spätapoptotischen, Annexin V positiven und PI positiven Zellen

Abbildung 51: Poly(dA:dT) führt im FACS-Experiment zu spätapoptotischen Zellen. Caspase 9- und Caspase 8-Inhibitor hemmen die Apoptose partiell

Abbildung 52: Poly(dA:dT), komplexiert mit kationischen Lipiden, führt zur Proteinexpression der BH3-only-Mitglieder Puma und Noxa

Abbildung 53: Densitometrische Auswertung der Puma- und Noxa-Expression im Western Blot nach Stimulation mit poly(dA:dT)

Abbildung 54: Densitometrische Auswertung der Puma-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression

Abbildung 55: Densitometrische Auswertung der Noxa-Expression im Verhältnis zur Beta-Tubulin-Expression

Abbildung 56: Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Abbildung 57: Antivirale Immunantwort und Virus-induzierte Apoptose von Insulin-produzierenden Zellen in der Pathogenese des Typ 1 Diabetes

Tabelle 1: Die ISG56/IFIT1-Familie

Tabelle 2: Initiator- und Effektorcaspasen bei Maus und Mensch

9 Verzeichnis der Abkürzungen

AIM 2	<i>absent in melanoma 2</i>
AK, ab	Antikörper
Apaf-1	<i>apoptotic-protease-activating factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	<i>apoptosis-related speck-like protein</i>
AT	Adenosin-Thymin
ATP	Adenosin Triphosphat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist / killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BBDR-Ratten	<i>biobreeding diabetes resistant rat</i>
BBDP-Ratten	<i>biobreeding diabetes prone rat</i>
BBC3	<i>Bcl-2 binding component 3</i> , Synonym: Puma
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-w	<i>Bcl-2-like protein 2</i>
Bcl-A1	<i>Bcl-2-related protein A1</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl2-interacting killer (apoptosis-inducing)</i>
Bok	<i>Bcl-2-related ovarian killer</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
GADA	Glutamat-Decarboxylase-Antikörper
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CCL	<i>chemokine ligand</i>
CCR	<i>chemokine receptor</i>

CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CL	kationisches Lipid
CMV	Zytomegalievirus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CXCL10	<i>CXC-Chemokine ligand 10</i> , Synonym: IP10
CXCR3	<i>CXC-Chemokine receptor 3</i>
DAI	<i>DNA dependent activator of IFN regulating factors</i>
DAMPs	<i>danger associated molecular patterns</i>
DAPI	4'-6'-Diamino-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DD	<i>death domain</i> (Todesdomäne)
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>trimerized receptor-ligand complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleotid
Dp5	Synonym: Hrk, <i>Activator of apoptosis harakiri</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus

ECL	<i>emitting chemiluminescence reagent</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
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, Synonym: Fas, CD95, Apo1</i>
FBS	Fötales bovines Serum
FCS	Fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GC	Guanosin-Cytosin
GTPasen	<i>dynamin-like large guanosine triphosphatases</i>
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Hrk	<i>Activator of apoptosis harakiri</i>
HSV	Herpes-simplex-Virus
IAA	Insulinantikörper
IA-2A	Thyrosinphosphataseantikörper
IFI 16	<i>Interferon-inducible protein 16</i>
IFIH1	<i>Interferon induces with Helicase C domain 1</i>
IFIH1	Synonym: MDA-5

IFIT1	<i>Interferon induced with tetratricopeptide repeats 1</i>
IFN	Interferon
IFNAR	<i>IFN-α/β receptor</i>
IFNR	Interferon-Rezeptor
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor κ-B kinase</i>
IL	Interleukin
IPS-1	<i>Interferon-β promoter stimulator 1</i>
IP10	<i>Interferon-γ induced protein 10kDa, Synonym: CXCL10</i>
IRF	<i>Interferon-regulating factor</i>
ISGF	<i>Interferon-stimulated gene factor</i>
ISRE	<i>Interferon-stimulated response elements</i>
JAK	Janus-aktivierte Kinase
KCL	Kaliumchlorid
KM	Knochenmark
KVR	<i>Kilham rat virus</i>
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRRFIP1	<i>leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1</i>
MAC	<i>mitochondrial apoptosis-induced channel</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling</i>
Mcl1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
MDA-5	<i>melanoma-differentiation-associated gene 5</i>

mDC	myeloide dendritische Zelle
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilisation</i>
mRNA	<i>messenger ribo nucleic acid</i>
MVA	<i>Modified Vaccinia Virus</i>
MX1	<i>Myxovirus resistance 1 protein</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
n. Chr.	nach Christus
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptoren
NO	<i>nitric oxide</i>
NOD	<i>Nucleotide oligomerisation domain</i>
NOD-Mäuse	<i>non-obese diabetic mice</i>
Noxa	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced-protein 1</i>
OAS	<i>Interferon-induced 2'-5'-oligoadenylate synthetases</i>
OASL2	<i>2-5-oligoadenylate synthase like protein 2</i>
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PI	Propidium Jodid
PKR	Protein-Kinase R
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly(dA:dT)	poly deoxyadenylic-thymidylic acid sodium salt
poly(I:C)	polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PS	Penicilin Streptomycin
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R848	Resiquimod
RCF	Relative Zentrifugalkraft
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene</i>
RLH	<i>RIG-I-like helicase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM	Rotationen pro Minute
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SeV	<i>Sendai virus</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
ssDNA	Einzelstrang-DNA
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAT-1	<i>Signal transducers and activators of transcription 1</i>
STING	<i>transmembrane protein stimulator of interferon genes</i>
STZ	Streptozotocin
SV 40 T-Antigen	<i>Simian Vacuolating Virus 40 T-Antigen</i>
t-Bid	<i>truncated Bid</i>
TBK 1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TBST	<i>TRIS-buffered saline and Tween 20</i>
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TH1	TH1-Helferzellen
TICAM	<i>TIR-containing adaptor molecule</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR-associated protein</i>
TIRP	<i>TIR-containing protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNF-R1	TNF-Rezeptor 1
TRADD	<i>TNF-receptor-associated death domain protein</i>

TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factors</i>
TRAIL-R1	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecules</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>terminal transferase-mediated dUTP nick end-labeling</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WHO	<i>World health organisation, Weltgesundheitsorganisation</i>
ZBP1	<i>Z-DNA-binding protein 1</i>

10 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders für die Überlassung und die Betreuung des Projektes und für die Möglichkeit mein Projekt auf dem TOLL Kongress in Riva del Garda und auf dem 117. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin vorzustellen. Vielen Dank für die vielen gemeinsamen Gespräche und die geweckte Begeisterung für eine wissenschaftliche Tätigkeit.

Für die freundliche Überlassung und die intensive Betreuung des Projektes möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr. med. Julia Lichtnekert bedanken.

Für die Einarbeitung in zahlreiche Labormethoden und die hilfreichen Diskussionen möchte ich mich bei Herrn Dr. hum. biol. Khader Valli Rupanagudi bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Martin Reincke und Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann für die Aufnahme in das FöFoLe-Programm, Förderung für Forschung und Lehre, für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit, mein Projekt im Rahmen des Statusseminars sowie des Abschlusseminars in Herrsching vorzustellen.

Ebenfalls möchte ich mich für die fachliche Hilfe und für die zahlreichen Diskussionen bei der gesamten Laborgruppe insbesondere bei Dr. med. Holger Hägele, Dr. hum. biol. Ram-anjaneyulu Allam, Dr. hum. biol. Narayana Murthy Darisipudi, Dr. med. Sebastian Clauss, Dr. hum. biol. Shrikant Ramesh Mulay, Anne Kuhn, Dr. med. Christian Schweninger, PD Dr. rer. hum. biol. Maciej Lech, Dr. med. Dana Thomasova, Sophie Schlosser, Marc Weidenbusch, Ewa Radomska, Dr. med. Christoph Römmele, Dr. hum. biol. Sufyan Ali Sayyed, Dr. hum. biol. Mi Ryu, Dr. hum. biol. Adriana Migliorini, Dr. med. Satish Kumar Devarupa, Dipl. Pharm. Santosh Kumar Ramaiah bedanken.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Großeltern für die fortwährende Unterstützung und für Ihr großes Verständnis bedanken. Desweiteren möchte ich mich bei meinen Freunden für die aufbauenden Worte und die vielen guten Ideen bedanken.

