

***FUNKTIONSANALYSE DER RNASE H2 ANHAND
MURINER, KONDITIONALER KNOCK-OUT MODELLE***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Kareen Bartsch

Kiel, 2016

für meine Eltern

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2016

genehmigt zum Druck: 11.11.2016

gez. Prof. Dr. rer. nat. Natascha Oppelt, Dekanin

I. INHALTSVERZEICHNIS

I. INHALTSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	7
1.1 Aicardi-Goutières-Syndrom	7
1.2 Eukaryotische Ribonuklease H2	9
1.3 Weitere AGS assoziierte Gene	13
1.4 Intrazelluläre Detektion von Nukleinsäuren und daraus resultierende Effekte	15
1.5 Autophagie	19
1.6 DNA-Schadensantwort.....	21
1.7 Zielsetzung	24
2. MATERIALIEN UND METHODEN.....	25
2.1 Material	25
2.1.1 Oligonukleotide	25
2.1.2 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen.....	26
2.1.3 Medien zur Kultivierung von Bakterien.....	27
2.1.4 Antibiotika.....	28
2.1.5 Induktoren und Inhibitoren.....	28
2.1.6 Antikörper	29
2.1.7 Enzyme	30
2.1.8 Vektoren	30
2.1.9 Größenmarker.....	31
2.1.10 Reagenziensätze (Kits)	31
2.1.11 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.12 Chemikalien.....	33
2.1.13 Geräte	33
2.1.14 Puffer und Stammlösungen	35
2.1.15 Zelllinien, Primärkulturen und Bakterienstämme	39
2.1.16 Mausstämme.....	40
2.2 Methoden.....	42
2.2.1 Zellkultur	42
2.2.2 Tierexperimentelle Methoden	46
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	49
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	54

2.2.5	Densitometrie	62
2.2.6	Statistische Auswertung	62
3.	ERGEBNISSE	63
3.1	<i>In-vitro</i> -Basischarakterisierung der RNase H2-Defizienz im murinen, induzierbaren <i>Knock-out</i> -System.....	63
3.1.1	Zucht des induzierbaren, konditionalen <i>Knock-out</i> -Stammes CreERT_H2B	63
3.1.2	Induzierbare RNase H2-Defizienz in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	64
3.1.3	Abbau der Untereinheit B der RNase H2 über das Ubiquitin-Proteasom-System	66
3.1.4	Verstärktes Auftreten geschädigter DNA in RNase H2-defizienten MEFs	68
3.1.5	Aktivierung der DNA-Schadensantwort	69
3.1.6	Vorliegen einer ISG-Signatur bei Abwesenheit der RNase H2.....	71
3.1.7	Einzelsträngige DNA im Zytoplasma RNase H2-defizienter Zellen	72
3.1.8	Doppelsträngige, zytoplasmatische DNA in RNase H2-defizienten Zellen.....	73
3.1.9	Export geschädigter DNA ins Zytoplasma.....	74
3.1.10	Export neu synthetisierter DNA ins Zytoplasma.....	75
3.1.11	Einfluss der Proliferationsrate auf das Vorkommen zytoplasmatischer dsDNA.....	77
3.1.12	Phänokopie der CreERT ^{+/+} -MEFs durch Induktion von DSB in CreERT ^{-/-} -Zellen	78
3.1.13	Aktivierung des cGAS-STING Signalweges in RNase H2-defizienten MEFs	79
3.1.14	Zytoplasmatische, ektopische dsDNA als Ligand des Sensors cGAS	80
3.1.15	Abbau zytoplasmatischer dsDNA durch Autophagie.....	81
3.1.16	RNase H2-Defizienz bedingt erhöhte basale Autophagie, aber keinen erhöhten Flux .	84
3.1.17	mTOR-Inhibitoren reduzieren die Expression von ISGs und das Vorkommen zytoplasmatischer dsDNA	85
3.1.18	Keine Vergrößerung des lysosomalen Kompartiments in RNase H2-defizienten MEFs feststellbar.....	86
3.1.19	Zelluläre Seneszenz in RNase H2-defizienten MEFs.....	88
3.1.20	Veränderung des <i>in-vitro</i> -Phänotyps der RNase H2-defizienten MEFs in der zellulären Seneszenz	90
3.1.21	Gleichzeitige p53-Defizienz negiert den seneszenten Phänotyp in RNase H2-defizienten MEFs	91
3.2	Folgen der RNase H2-Defizienz im murinen Gehirn.....	94
3.2.1	Zucht des konditionalen RNaseH2B <i>Knock-out</i> Stammes GFAP_Cre_H2B.....	94
3.2.2	Verifizierung des konditionalen, astroglialen RNase H2- <i>Knock-outs in-vivo</i>	96
3.2.3	RNase H2-Defizienz im Gehirn ohne auffälligen Phänotyp	97
3.2.4	RNaseH2-Defizienz im Gehirn ohne DNA-Schäden und ISG-Signatur.....	100

3.2.5	Astrogliale, RNase H2-defiziente Primärkulturen mit ISG-Signatur und Proliferationsdefizit mit vorzeitiger, zellulärer Seneszenz.....	101
3.2.6	DNA-Schäden erhöhen Immunantwort.....	105
4.	DISKUSSION	107
4.1	RNase H2-Defizienz in murinen, embryonalen Fibroblasten	107
4.1.1	RNase H2-Homöostase	108
4.1.2	Identifizierung des akkumulierenden Substrates in RNase H2-defizienten Zellen	109
4.1.3	Signaltransduktion über cGAS-STING in RNase H2-defizienten MEFs.....	113
4.1.4	Autophagie als Abwehrmechanismus des Immunsystems gegenüber zytoplasmatischen DNA-Spezies in RNase H2-defizienten Zellen	115
4.1.5	Seneszenz als Abwehrmechanismus des Immunsystems	117
4.1.6	Therapeutische Optionen.....	120
4.2	RNase H2-Defizienz im murinen Gehirn	121
5.	AUSBLICK	124
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	126
7.	SUMMARY	127
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	128
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	135
IV.	TABELLENVERZEICHNIS.....	137
V.	LITERATUR	138
VI.	ANHANG	157
VII.	LEBENS LAUF.....	163
VIII.	DANKSAGUNG.....	166
IX.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	167

1. EINLEITUNG

1.1 Aicardi-Goutières-Syndrom

Das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) wurde erstmals 1984 von Jean Aicardi und Françoise Goutières beschrieben (Aicardi und Goutières, 1984). Es handelt sich dabei um eine sehr seltene Erbkrankheit, die vor allem das Gehirn, die Haut und das Immunsystem betrifft (Crow *et al.*, 2015). Die Symptome können bereits zum Zeitpunkt der Geburt ausgeprägt sein, manifestieren sich aber in der Regel spätestens innerhalb des ersten Lebensjahres. Bei den betroffenen Kleinkindern treten zunächst Schwierigkeiten beim Füttern, Erbrechen, gelegentliche Fieberschübe und Zappeligkeit bis hin zu spastischer Lähmung oder dystoner, unkoordinierter Bewegung auf, die in dem Ausbleiben der Entwicklung bzw. der Rückentwicklung motorischer und sozialer Fähigkeiten münden (Rigby *et al.*, 2007). Die weiterführende klinische Untersuchung der Patienten anhand bildgebender Methoden weist auf eine Enzephalopathie hin (Aicardi und Goutières, 1984; Lanzi *et al.*, 2002), die sich vor allem durch das Auftreten von Kalzifizierungen insbesondere im Bereich der Basalganglien (Abb. 1B), Atrophie und Leukodystrophie auszeichnet. Des Weiteren treten erhöhte Konzentrationen von Interferon-alpha (IFN- α) und Neopterin sowie eine Lymphozytose in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF, *cerebrospinal fluid*) auf.

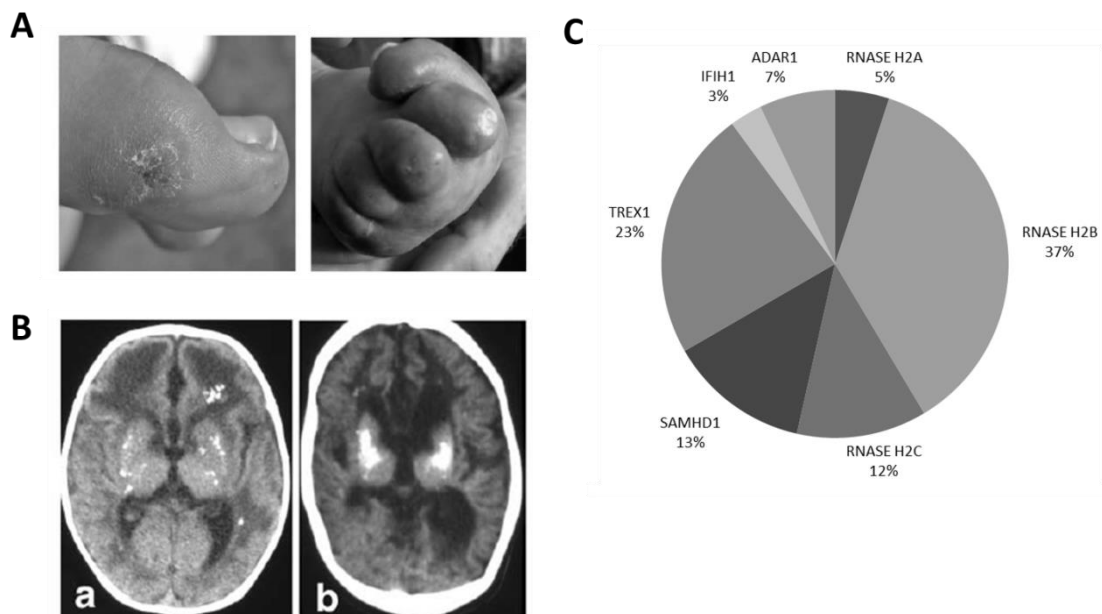


Abb. 1 Klinischer Phänotyp bei AGS-Patienten.

(A) Epidermale Veränderungen, sog. Frostbeulen (*chilblain lesions*), an den Extremitäten von AGS-Patienten (aus Rice *et al.*, 2007a). (B) CT-Scans von AGS-Patienten mit deutlich sichtbaren intrakraniellen Kalzifizierungen, insbesondere im Bereich der Basalganglien (aus Rice *et al.*, 2007a). (C) Prozentuale Aufschlüsselung der AGS-Patienten nach dem mutierten Gen (modifiziert nach Crow *et al.*, 2015).

Das Blut hingegen zeigt auch einen Anstieg der Leber-Enzymwerte (Transaminasen), die zumeist mit einer Hepatosplenomegalie in Verbindung stehen, das Auftreten von Autoantikörpern sowie eine Thrombozytopenie. Neben neurologischen Symptomen weist auch eine Vielzahl der Patienten epidermale Veränderungen, sog. Frostbeulen (*chilblain lesions*), auf (Abb. 1A; Tolmie *et al.*, 1995; Rigby *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2007a; Crow *et al.*, 2015).

Die beschriebenen phänotypischen Merkmale von AGS überschneiden mit den klinischen Symptomen von kongenitalen Virusinfektionen (KVI) sowie autoimmun-assoziierten Erkrankungen, insbesondere dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Tab. 1; Rigby *et al.*, 2008; Crow *et al.*, 2009; Ramantani *et al.*, 2010; Günther *et al.*, 2015). Dadurch wird eine differenzierte Diagnose erschwert.

Als molekularbiologischer Marker wird neben der erhöhten IFN- α Konzentration (>10 pg/ml in CSF) bei Abwesenheit einer viralen Infektion die erhöhte Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs, *interferon stimulated genes*) genutzt (Rice *et al.*, 2013).

Tab. 1 Vergleich zwischen AGS, SLE und KVI.

Übersicht einer Auswahl klinischer Merkmale von AGS im Vergleich zu SLE und KVI; + kennzeichnet das Vorliegen eines Merkmals; - kennzeichnet Symptomfreiheit bzgl. des Merkmals (Rigby *et al.*, 2008).

		AGS	SLE	KVI
Ursprung		genetisch	multifaktoriell	virale Infektion
Manifestationsalter		Geburt bis ca. 12 Monate post	20- 40 Jahre	Geburt
neurologische Merkmale	Kalzifizierung der Basalganglia	+	+	+
	Zerstörung der weißen Substanz	+	+	+
	Mikrozephalie	+	-	+
immunologische Merkmale	erhöhte IFN- α Werte in CSF	+	+	+
	Hypergammaglobinämie	+	+	+
	Auto-Antikörper	+	+	-
systemische Merkmale	Immunglobulin-Ablagerungen in der Haut	+	+	-
	Thrombozytopenie	+	+	+
	hämolytische Anämie	+	+	+
	Hepatosplenomegalie	+	-	+
	Fieber	+	+	+

Leider sind bis heute keine kausalen Therapien verfügbar, sodass nur eine rein symptomatische Behandlung erfolgt. Daher besteht ein besonderes Interesse an der Erforschung der Pathogenese von AGS. Dazu konnten bereits Mutationen in Genen identifiziert werden, die mit dem Syndrom assoziiert sind und für Proteine kodieren, die im Nukleinsäure-Stoffwechsel von Bedeutung sind. Es handelt sich dabei um *TREX1*, *RNASE H2A*, *RNASE H2B*, *RNASE H2C*, *SAMHD1* und *ADAR1* (Abschnitt 1.2 und Abschnitt 1.3; Crow *et al.*, 2015). Aufgrund dessen besteht die Hypothese, dass die funktionale Beeinträchtigung der AGS-assoziierten Proteine zur Akkumulation endogener Nukleinsäuren führt, die vom angeborenen Immunsystem detektiert werden und eine permanente Immunantwort induzieren (Abschnitt 1.4; Crow *et al.*, 2009). Gleichzeitig wurde mit der Identifizierung eines weiteren betroffenen Genlokus, der die Sequenzinformation für *IFIH1* trägt, ein zusätzliches Szenario aufgezeigt, in dem die Überreaktion des Nukleinsäure-Detektionssystems zur Pathogenese führen kann (Rice *et al.*, 2014; Oda *et al.*, 2014).

Grundsätzlich wird der überwiegende Anteil dieser Mutationen autosomal-rezessiv vererbt (Rice *et al.*, 2007a). Dennoch sind für einige Gene ebenso *de novo* als auch heterozygote, autosomal-dominante Mutationen mit Krankheitsbezug beschrieben (Rice *et al.*, 2007b; Haaxma *et al.*, 2010; Tungler *et al.*, 2012; Crow *et al.*, 2015).

Eine besondere Stellung innerhalb der Gruppe AGS-assoziiierter Gene nimmt die Ribonuklease H2 ein, da sie in der Mehrheit der Patienten (ca. 50 %, Abb. 1C) mutiert vorliegt und gleichfalls die am häufigsten auftretende Mutation (RNase H2B c.G529A, p.A177T; Abb. 3) aufweist (Abschnitt 1.2; Rice *et al.*, 2007a).

1.2 Eukaryotische Ribonuklease H2

Unter der Bezeichnung Ribonukleasen H (kurz RNasen H) werden alle Enzyme zusammengefasst, die die Spaltung des RNA-Anteils von RNA:DNA-Hybriden durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen katalysieren. Dabei entstehen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-terminierte Produkte (Stein und Hausen, 1969; Cerritelli und Crouch, 2009).

In Eukaryoten werden grundsätzlich zwei Typen unterschieden, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften und der Substratspezifität unterscheiden. Das monomere Typ I Enzym, die RNase H1, kommt in 2 Isoformen vor und benötigt mindestens vier aufeinanderfolgende Ribonukleotide zur Bindung und Katalyse (Cerritelli *et al.*, 2009). Während die Funktion der nukleären Isoform noch nicht hinreichend aufgeklärt wurde, spielt die mitochondriale Isoform eine essentielle Rolle bei der DNA Replikation im Mitochondrium (Cerritelli *et al.*, 2003; Holmes *et al.*, 2015).

Im Gegensatz dazu ist das trimere Typ II Enzym, die RNase H2, befähigt neben der klassischen Degradierung des RNA-Stranges von RNA:DNA-Hybriden auch einzelne fälschlich inkorporierte

Ribonukleotide (rNMPs, *ribonucleotide monophosphate*) aus der DNA im Zellkern zu entfernen (Abb. 2B; Rydberg und Game, 2002; Cerritelli und Crouch, 2009; McElhinny *et al.*, 2010, Lazzaro *et al.*, 2012). Dieser Prozess wird als Ribonukleotid-Entfernungsreparatur (RER, *ribonucleotide excision repair*) bezeichnet. Diese Funktionen sind jedoch nur in höheren Eukaryoten essentiell und führen in RNase H2-defizienten Mausmodellen zur embryonalen Letalität (Reijns *et al.*, 2012; Hiller *et al.*, 2012). Hingegen ist die enzymatische Aktivität für die Lebensfähigkeit einzelliger, eukaryotischer Lebensformen entbehrlich (Arudchandran *et al.*, 2000; Wahba *et al.*, 2011).

Strukturell besteht die RNase H2 aus den drei Untereinheiten A, B und C, wobei die Untereinheit A das katalytische Zentrum mit den vier hochkonservierten, sauren Aminosäuren Asp-Glu-Asp-Asp enthält, die zwei bivalente Metallionen koordinieren (Abb. 2A; Chapados *et al.*, 2001; Chai *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2004; Bubeck *et al.*, 2011). Die enzymatische Aktivität ist jedoch abhängig von der Zusammenlagerung des multimeren Komplexes (Chon *et al.*, 2009), der durch Bindung der weiteren zwei Untereinheiten, die ein stabiles Heterodimer formen, an den C-Terminus der RNaseH2A gebildet wird (Reijns *et al.*, 2011).

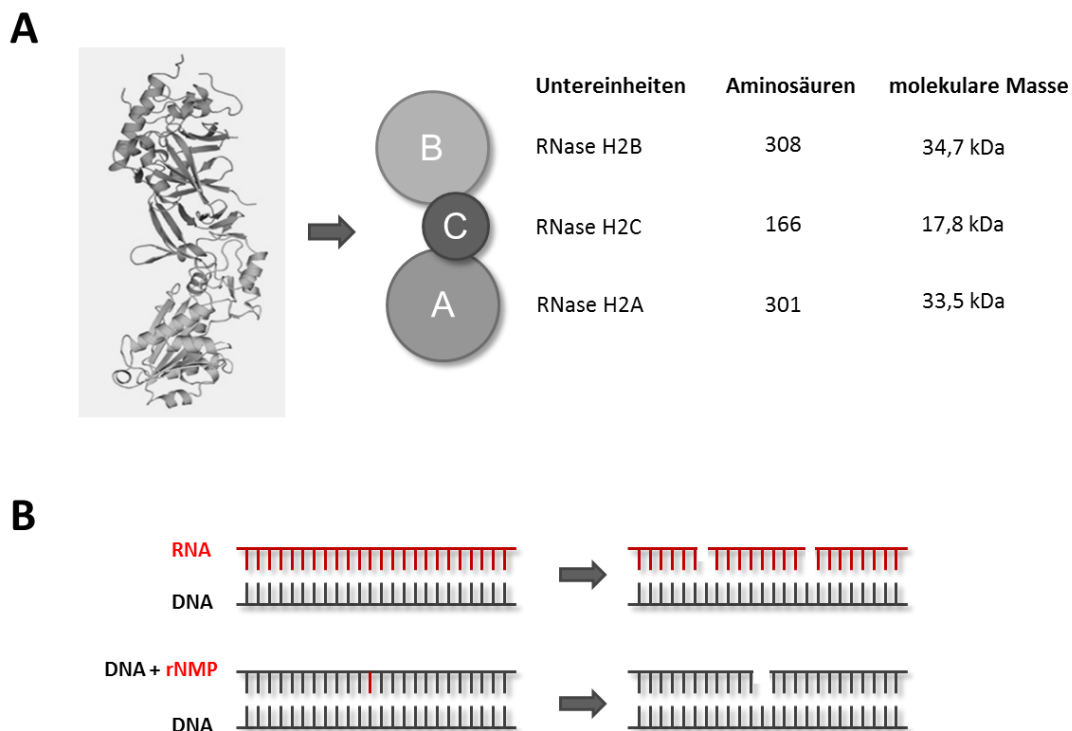


Abb. 2 Charakterisierung der RNase H2 bezüglich ihrer Struktur und Substrate.

(A) Röntgenkristallographische Struktur der murinen RNase H2, bestehend aus den drei linear angeordneten Untereinheiten A, B und C (aus Shaban *et al.*, 2010) sowie die Auflistung der Anzahl an Aminosäuren und der molekularen Masse der ribonukleären Untereinheiten. (B) Darstellung des Substratspektrums der RNase H2, die sowohl die Hydrolyse des RNA-Anteils von RNA:DNA-Hybriden als auch von einzelnen miss-inkorporierten Ribonukleotiden (rNMPs) aus DNA-Duplexen katalysiert.

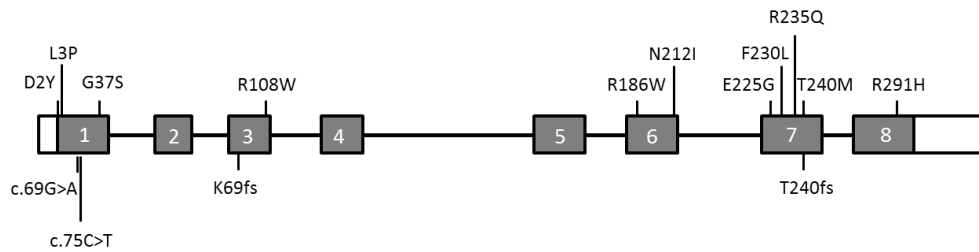
Des Weiteren dienen die Untereinheiten B und C neben der Komplexassemblierung zur Struktur- sowie Funktionsstabilisierung der Determinierung der subzellulären Lokalisation sowie der Interaktion mit anderen Proteinen. So besitzt die RNaseH2B ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS, *nuclear localization signal*), das zum Import des im Zytoplasma assemblierten Komplexes genutzt wird (Kind *et al.*, 2014). Des Weiteren weist die Sequenz der Untereinheit B ein C-terminales PIP (*PCNA-interacting-peptide*)-Box-Motiv auf, das die Bindung an das Ringklemmenprotein PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) ermöglicht und das Enzym an nukleäre Replikations- und Reparaturfoci dirigiert (Chon *et al.*, 2009; Bubeck *et al.*, 2011).

Um ein Verständnis für die Beteiligung der RNase H2 an zellulären Prozessen zu erlangen, wurden insbesondere *Knock-out*-Systeme genutzt, die vor allem die Abhängigkeit der genomischen Integrität von der enzymatischen Aktivität der Ribonuklease aufzeigten.

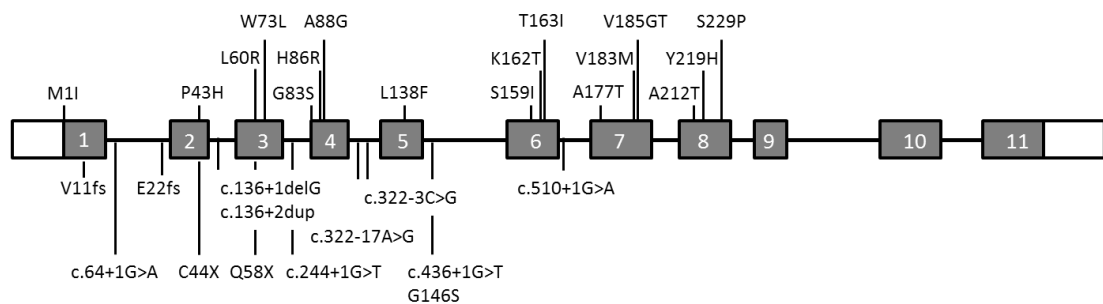
So führte deren Abwesenheit im murinen *in-vivo*-System zu einer Fehlinkorporationsrate von einzelnen Ribonukleotiden (rNMPs) in die DNA während der Replikation von 1 zu 7.600 Nukleotiden (nt). Bezogen auf das gesamte Genom einer Zelle ergeben sich dadurch >1.000.000 Inkorporationen, die damit die häufigste endogene Basenschädigung der DNA darstellen (Reijns *et al.*, 2012). Gleichzeitig konnte in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass die inkorporierten rNMPs als physiologischer Marker für den während der DNA-Replikation neu-synthetisierten Strang dienen. Diese Strangdiskriminierung erleichtert eine effiziente Basenfehlpaarungsreparatur der DNA (MMR, *mismatch repair*), bei der die Loci der entfernten einzelnen Ribonukleotide (rNMPs) als Initiationsstellen des Reparaturprozesses genutzt werden (Ghodgaonkar *et al.*, 2013; Lujan *et al.*, 2013). Findet dieser Prozess in RNase H2-defizienten Zellen nicht mehr statt, ergibt sich eine vermehrte Last an chemischen Alterationen der DNA, die ebenso mit dem erhöhten Verlust der Heterozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) und der Zunahme an nicht-allelen homologen Rekombinationen (NAHR, *non-allelic homologous recombination*) assoziiert sind (Conover *et al.*, 2015). Dadurch erfolgt die verstärkte Aktivierung der DNA-Schadensantwort (Abschnitt 1.6). Ferner treten vermehrt 2-5 nt Deletionen auf, die insbesondere in repetitiven Sequenzen vorzufinden sind. Diese beruhen auf dem alternativen RER über die Topoisomerase 1 (Top1) (Kim *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2013; Sparks *et al.*, 2015).

Neben der Aktivität als Korrekturlese (*proof-reading*)-Enzym für fehlinkorporierte rNMPs wurde auch die klassische Hydrolyse des RNA-Anteils von RNA:DNA-Hybriden als Substrat in verschiedenen Studien aufgezeigt und postuliert. So prozessiert die RNase H2 R-Schleifen (*R-loops*), die während der Transkription gebildet, jedoch nicht post-transkriptionell verarbeitet werden, sondern am codogenen DNA-Strang verbleiben (Chon *et al.*, 2013; Hage *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2014, Lim *et al.*, 2015). Diese stabilen Strukturen stellen Barrieren für die Transkription und Progression der Replikationsgabel dar (Gan *et al.*, 2011). Des Weiteren unterdrückt die Ribonuklease H2 die endogene

RNase H2A



RNase H2B



RNase H2C

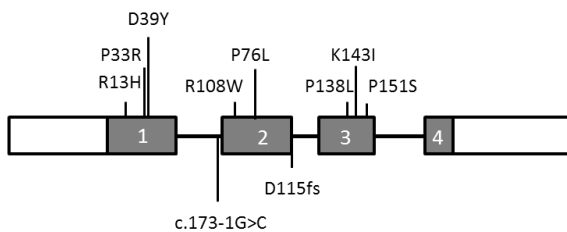


Abb. 3 AGS-assoziierte Mutationen in den Untereinheiten der RNase H2.

Schematische Darstellung der Gene *RNase H2A* (a), *RNase H2B* (b) und *RNase H2C* (c) mit den Positionen der relevanten AGS-assoziierten Mutationen (homozygot bzw. komplex heterozygot); horizontale Linien kennzeichnen Introne; Rechtecke kennzeichnen Exone (weiß – untranslatierte Region (UTR), grau – codierende Sequenz); sinnverändernde (*missense*) Mutation stehen oberhalb des Gens; sinnststellende (*nonsense*), Spleiß- (*splice site*) und Leseraster verschiebende (*frameshift*) Mutationen stehen unterhalb des Gens (nach Reijns und Jackson, 2014).

Retrotransposition von Ty1 LTR (*long terminal repeat*)-Retrotransposons in *Saccharomyces cerevisiae* (Hage *et al.*, 2014).

Im Aicardi-Goutières-Syndrom (Abschnitt 1.1) liegt jedoch keine vollständige Defizienz der RNase H2 vor, sondern es besteht eine verminderte Enzymaktivität aufgrund von Mutationen in den

verschiedenen Untereinheiten (Rice *et al.*, 2007; Abb. 3). Daher ist vermutlich anzunehmen, dass der vollständige *Knock-out* im Menschen ebenso letal wie in der Maus ist (Reijns *et al.*, 2012, Hiller *et al.*, 2012). Diese Alterationen in der DNA-Sequenz können in translaterter Form einen Einfluss auf die Substratbindung und -hydrolyse (I) und/oder auf die strukturelle Integrität (II) haben bzw. die Interaktion mit anderen Proteinen (III) stören (Figiel *et al.*, 2011). Im ersten Fall sind insbesondere Mutationen in der RNaseH2A (G37S, R186W, *etc.*) beschrieben, die beispielsweise das hoch konservierte Substratbindemotiv GRG (Glycin-Arginin-Glycin) betreffen (Figiel *et al.*, 2011), das der spezifischen Interaktion mit der 2'-OH Gruppe von (5')RNA-DNA(3')-Verbindungen dient (Rychlik *et al.*, 2010). Zur zweiten Gruppe zählen Mutationen, die geballt in den C-Termini der RNaseH2A- und RNaseH2C-Untereinheiten vorzufinden sind. Diese Regionen sind kritisch für die Bildung des Heterotrimers, sodass sie zur Reduktion der Komplexstabilität und gleichfalls auch der Enzymaktivität führen (Reijns *et al.*, 2010). Jedoch gibt es auch Mutationen außerhalb dieser Nukleotidsequenzen, deren translaterter Aminosäuren nicht in den Interaktionsflächen zwischen den Untereinheiten vorzufinden sind und die gleichfalls die Stabilität der Struktur mindern (Chon *et al.*, 2009; Reijns *et al.*, 2010; Coffin *et al.*, 2011). Die letzte Gruppe von Mutationen bedingt Veränderungen in der Oberfläche des Proteins, die Einfluss auf Proteininteraktionen nehmen könnten (Figiel *et al.*, 2011; Reijns *et al.*, 2010).

1.3 Weitere AGS assoziierte Gene

Neben Mutationen in den Genen der Untereinheiten der RNase H2 wurden weitere betroffene Gene identifiziert, die mit dem Aicardi-Goutières-Syndrom assoziiert sind. Diese kodieren ebenso für Proteine, die am Stoffwechsel und der Detektion von Nukleinsäuren beteiligt sind. Es handelt sich dabei um *TREX1*, *SAMHD1*, *ADAR1* und *IFIH1* (Crow *et al.*, 2015). Innerhalb dieser Gengruppe nimmt *IFIH1* eine besondere Stellung ein, da sich dessen Mutationen durch einen Gewinn an Aktivität (*gain-of-function*) auszeichnen, währenddessen bei allen anderen Genprodukten die Mutation zum Verlust bzw. zur Herabsenkung der Funktionalität (*loss-of-function*) führt (Rice *et al.*, 2014; Oda *et al.*, 2014; Crow *et al.*, 2015).

TREX1

Das Enzym *TREX1* (*three prime repair exonuclease 1*), auch bekannt als DNase III, besitzt 3'->5' Exonuklease-Aktivität gegenüber ssDNA (Yang *et al.*, 2007) und dsDNA bzw. 3' DNA-Überhängen (Grievos *et al.*, 2015), wodurch es eine bedeutende Rolle in der Immunantwort auf virale Infektionen (Yan *et al.*, 2010; Hasan *et al.*, 2013), der Unterdrückung von endogenen Retroelementen (Stetson *et al.*, 2008), der Degradation von aberranten Replikationsintermediaten (Yang *et al.*, 2007; Lindahl *et al.*, 2009) und nukleärer DNA während des Granzym A-vermittelten Zelltodes einnimmt (Chowdhury

et al., 2006). Ferner wurde auch Ribonuklease-Aktivität gegenüber ssRNA postuliert (Yuan *et al.*, 2015). Neben diesen klassischen Funktionen im Nucleinsäurestoffwechsel besitzt TREX1 eine ebenso große Bedeutung im Kohlenhydratstoffwechsel. So ist das Enzym mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert und interagiert hier über seinen C-Terminus mit dem Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplex, dessen katalytische Integrität dadurch stabilisiert wird. Findet diese Interaktion nicht mehr statt, akkumulieren freie Glykane und induzieren Entzündungsreaktionen (Hasan *et al.*, 2015).

SAMHD1

Das Protein SAMHD1 (*sterile alpha motif domain and HD domain-containing protein 1*) ist ein zelluläres Enzym mit Triphosphohydrolase-Aktivität. Es katalysiert die Hydrolyse von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) zu Nucleosiden und Triphosphat, worauf es zur Senkung des zellulären dNTP-Spiegels kommt. Dadurch stehen der reversen Transkriptase weniger dNTPs zur viralen cDNA-Synthese zur Verfügung. Diese Hemmung der viralen Replikation wurde insbesondere für HIV (*human immunodeficiency virus*) aufgezeigt (Berger *et al.*, 2011; Lahouassa *et al.*, 2012). Des Weiteren besitzt das Enzym Nuclease-Aktivität gegen einzelsträngige (ss, *single stranded*) DNA und RNA sowie den RNA-Anteil von RNA:DNA-Duplexen. Diese Funktion trägt gleichfalls zur HIV-Restriktion bei (Beloglazova *et al.*, 2013; Ryoo *et al.*, 2014).

ADAR1

Das Protein ADAR1 (*adenosine deaminases acting on RNA 1*) bindet doppelsträngige (ds, *double stranded*) RNA und konvertiert die Base Adenosin (A) zu Inosin (I) durch Desaminierung. Dieser Prozess wird als *RNA-Editing* bezeichnet (Gerber *et al.*, 2001). Er dient als posttranskriptionelle Modifikation zur Vergrößerung der Diversität des Transkriptoms (Paz-Yaacov *et al.*, 2010), der Diskriminierung zwischen fremder und eigener RNA (George *et al.*, 2016; Liddicoat *et al.*, 2016), der Unterdrückung von Retroelementen (Athanasiadis *et al.*, 2004) sowie der viralen Abwehr (Weiden *et al.*, 2014).

IFIH1

Das Gen *IFIH1* (*interferon induced with helicase C domain protein 1*) codiert für den RIG-I-ähnlichen Rezeptor (RLR, *RIG-I-like receptor*) MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*), der als Mustererkennungsrezeptor (PRR, *pattern recognition receptor*) zytoplasmatische dsRNA detektiert und zur Induktion der Typ I Interferon-Antwort führt (Abschnitt 1.4, Oda *et al.*, 2014). Dadurch dient er vor allem der Abwehr von RNA-Viren (Cao *et al.*, 2015; Jaeger *et al.*, 2015).

1.4 Intrazelluläre Detektion von Nukleinsäuren und daraus resultierende Effekte

Das angeborene Immunsystem beruht auf Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptor*), die das extrazelluläre, endosomale und zytoplasmatische Milieu auf Anzeichen eines pathogenen Eindringens oder zellulärer Schäden überprüfen (Takeuchi und Akira, 2010). Dazu erkennen sie konservierte Strukturen, sog. Pathogen-assoziierte (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) bzw. Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs, *damage associated molecular patterns*). Auf die Bindung dieser Liganden erfolgt die Aktivierung spezifischer Signalwege via Adaptoren zur Auslösung einer Immunantwort, die im Falle der Detektion von Nukleinsäuren insbesondere durch die erhöhte Produktion von Typ I Interferonen (IFNs) und Interferon-stimulierten Genen (ISGs, *interferon stimulated genes*) gekennzeichnet ist (Takeuchi und Akira, 2010; Junt und Barchet, 2015; Radoshevich und Dussurget, 2016).

Da Nukleinsäuren essentiell für die Replikation und Vermehrung nahezu aller Pathogene sind, hat sich deren Erkennung als ein fundamentaler Mechanismus der Abwehr entwickelt. Er beschränkt sich jedoch nicht nur auf exogene Nukleinsäuren (viral, bakteriell), sondern bezieht auch die Erkennung endogener, ektopischer Nukleinsäurespezies ein, deren Akkumulation in Interferonopathien wie AGS vorgeschlagen wird (Abschnitt 1.1; Thompson *et al.*, 2011; Junt und Barchet, 2015; Radoshevich und Dussurget, 2016). Grundsätzlich können drei Gruppen an Rezeptoren unterschieden werden, die verschiedene Kompartimente innerhalb der Zelle abdecken. Während Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR, *toll-like receptor*) endosomale Nukleinsäuren erkennen, überprüfen RIG-I-ähnliche Rezeptoren (RLR, *retinoic acid-inducible gene I-like receptors*) das Zytoplasma auf RNA. Des Weiteren kommen zytosolische DNA-Rezeptoren vor (CDR, *cytosolic DNA receptor*) (Takeuchi und Akira, 2010; Radoshevich und Dussurget, 2016).

Toll-ähnliche Rezeptoren

TLRs sind die am besten charakterisierte PRR Familie. Sie gehören zu den Typ I Transmembranproteinen, deren gemeinsame Strukturmerkmale die N-terminale Leucin-reiche Region (LRR, *leucin-rich repeats*), Transmembranregion und zytoplasmatische TIR-Domäne (*Toll/IL-1R homology domain*) darstellen (Takeuchi und Akira, 2010). Im humanen Organismus sind bis heute 10 und im murinen Organismus 13 TLRs identifiziert worden, wobei die TLRs 1-9 in beiden Spezies vorkommen (Thompson *et al.*, 2011). Jeder dieser Rezeptoren erkennt ein spezifisches PAMP bzw. DAMP. Die Detektion von endosomalen Nukleinsäuren erfolgt über TLR3, 7/8 und 9, die selektiv von nur wenigen Zelltypen, vor allem denen des angeborenen Immunsystems (Monozyten, Neutrophile, *etc.*), exprimiert werden (Junt und Barchet, 2015). Dabei agieren die Rezeptoren als Dimere, die Adaptorproteine rekrutieren, die wiederum Signalkaskaden initiieren, welche vor allem in der Aktivierung der Interferon regulierenden Faktoren 3, 5 und 7 (IRF, *interferon regulatory factor*), des

nukleären Faktors kappa B (NF- κ B, *nuclear factor kappa B*) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) münden. Zusammen bewirken diese Transkriptionsfaktoren eine gesteigerte Expression von Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen (Abb. 4; Kaisho und Akira, 2006; Thompson *et al.*, 2011).

Einzelsträngige (ss)RNA wird von TLR7 und 8 detektiert (Hornung *et al.*, 2008), währenddessen kurze doppelsträngige (ds)RNA nur von TLR7 erkannt werden kann (Thompson *et al.*, 2011; Junt und Barchet, 2015). TLR9 hingegen detektiert dsDNA, die präferenziell unmethylierte CpG Motive beinhaltet (Hemmi *et al.*, 2000; Ohto *et al.*, 2015), sowie RNA:DNA-Hybride (Rigby *et al.*, 2014). Als Adaptorprotein dient all diesen endosomalen Rezeptoren MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) als Ausgangspunkt der zytosolischen *downstream* Signalkaskade. Im Gegensatz dazu nutzt TLR3 nach seiner Aktivierung durch dsRNA TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) als Adaptor (Abb. 4; Thompson *et al.*, 2011).

RIG-I-ähnliche Rezeptoren

Die Detektion von zytoplasmatischen RNAs erfolgt über die Rezeptoren RIG-I und MDA5 (Abschnitt 1.3), die strukturell aus einer C-terminalen Liganden-bindenden Domäne, DEAxD/H-Box Helikase-Domäne und N-terminalen CARD (*caspase activation and recruitment domain*) bestehen (Junt und Barchet, 2015). Indes endogene mRNAs durch Cap-Strukturen und eine 2'-O-Methylierung gekennzeichnet sind (Schuberth-Wagner *et al.*, 2015), zeichnen sich viele pathogene dsRNAs durch 5'-phosphorylierte Enden aus, anhand derer sie von RIG-I gegenüber den zelleigenen Äquivalenten diskriminiert werden (Thompson *et al.*, 2011). Des Weiteren detektiert RIG-I kurze dsRNA (bis zu 1 kb) im Gegensatz zu MDA5, das durch lange dsRNA-Strukturen aktiviert wird (Kato *et al.*, 2008; Pichlmair *et al.*, 2009). Beide Rezeptoren nutzen als Adaptorprotein MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*), das u.a. via der Kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 induziert, dessen Aktivität zur erhöhten Expression von Interferonen und ISGs führt (Abb. 4; Junt und Barchet, 2015).

Zytosolische DNA-Rezeptoren

Die Immunabwehr pathogener, zytosolischer DNA wurde einer Reihe an möglichen Proteinen in der Funktion eines Rezeptors zugeschrieben, von denen nur wenige durch mehrere unabhängige Studien belegt sind. Zu den am umfangreich erforschtesten Sensoren zählen cGAS (*cyclic GMP-AMP synthase*), IFI16 (*interferon inducible gene 16*) und AIM2 (*absent in melanoma protein 2*) (Sun *et al.*, 2012; Paludan, 2015). Alle drei zytosolischen DNA-Rezeptoren (CDRs) sind befähigt dsDNA zu erkennen, wobei cGAS ebenso RNA:DNA-Hybride (Mankan *et al.*, 2014) und IFI16 ssDNA (Jakobsen *et al.*, 2013) detektieren können (Abb. 4).

Die Nukleotidyltransferase cGAS katalysiert nach der Ligandenbindung die Bildung des sekundären Botenstoffes cGAMP (*cyclic GMP-AMP*) aus den Ausgangsstoffen ATP und GTP (Sun *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Das Produkt bindet an den Adaptor STING (Zhang *et al.*, 2013), der u.a. die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF3 via TBK1 induziert, dessen Aktivität wiederum zur erhöhten Expression von Interferonen und ISGs führt (Tanaka und Chen, 2012). AIM2 hingegen interagiert nach der Ligandenbindung mit dem Adaptorprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), das die Caspase 1 rekrutiert und ein Inflammasom bildet. Dieses katalysiert die Spaltung der Proformen von Zytokinen in ihre aktiven Äquivalente (z.B. IL-1 β , IL-18) und kann den pyroptischen Zelltod einleiten (Rathinam *et al.*, 2010; Paludan, 2015). Für IFI16 belegen Studien sowohl die Nutzung von STING als auch ASC (Abb. 4, Monroe *et al.*, 2014; Paludan, 2015).

Effektormechanismen: Typ I Interferone und ISGs

Die Aktivierung von PRRs durch Nukleinsäuren induziert die Typ I Interferon-Produktion und anschließende Sekretion, insbesondere von Interferon alpha (IFN α) und beta (IFN β). Diese übernehmen wichtige Funktionen u.a. in der Induktion eines intrinsischen Abwehrstatus der eigenen und benachbarten Zelle(n) zur Limitierung der Infektionsausbreitung (Ivashkiv und Donlin, 2014). Dazu binden die IFNs an den heterodimeren Rezeptorkomplex IFNAR1-IFNAR2 (*interferon- α receptor1/2*) und initiieren den JAK-STAT (*Janus kinase signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg, der in der Induktion von Interferon-stimulierten Genen mündet. Zu dieser Gengruppe gehören die PRRs und entscheidende Bestandteile ihrer Signalkaskaden (positive Regulatoren), was zur Verstärkung der Immunantwort führt, sowie anti-virale Effektoren und negative Regulatoren, die die Rückkehr zur zellulären Homöostase vermitteln (Schneider *et al.*, 2014). Jedoch kann die Expression von ISGs auch Interferon-unabhängig, allein durch PRR-Aktivierung gesteigert werden (Pulit-Penalosa *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2014).

Zu den anti-viralen Effektoren zählen u.a. Mx (*Myxovirus resistance*)-GTPasen, die Cholesterin-25-Hydroxylase (CH25H), IFN-induzierbare Transmembranproteine (IFITMs), IFITs (*IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats*), TRIM (*tripartite motif*)-Proteine, die 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) und Viperin (*virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, IFN-inducible*). Diese Proteine greifen in unterschiedliche Stadien des viralen Lebenszykluses ein (Sadler und Williams, 2008). Sie inhibieren beispielsweise den Eintritt in die Zelle (Lu *et al.*, 2011; Feeley *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013), die Freisetzung des viralen Genoms (Stremlau *et al.*, 2004) sowie die virale Transkription und Translation (Guo *et al.*, 2000; Helbig *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012) und fördern die Degradation viraler Nukleinsäuren (Clemens und Vaquero, 1987).

Jedoch muss die Interferon-Antwort streng reguliert werden, da eine Dysfunktion zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen führt. Erste Hinweise darauf lieferten Patienten, die eine IFN α -

Langzeitherapie erhielten und anschließend Merkmale von SLE aufwiesen (Burman *et al.*, 1985; Rönnblom *et al.*, 1990 und 1991; Karlsson-Parra *et al.*, 1990). Ferner zeigten Mäuse, die IFN α in Astrozyten überexprimierten, eine inflammatorische Enzephalopathie mit Kalzifizierungen, einer Gliose und Neurodegeneration (Akwa *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1999). Dieser Befund ähnelt den Symptomen von AGS-Patienten (Abschnitt 1.1). Die Regulation der IFN-Antwort findet auf unterschiedlichen Ebenen statt. Wichtige Mechanismen sind u.a. die Endozytose des Rezeptors und dessen Abbau, die Aktivität von Phosphatasen gegenüber JAKs und STATs sowie die Aktivität der ISGs SOCS und USP18 (Schneider *et al.*, 2014).

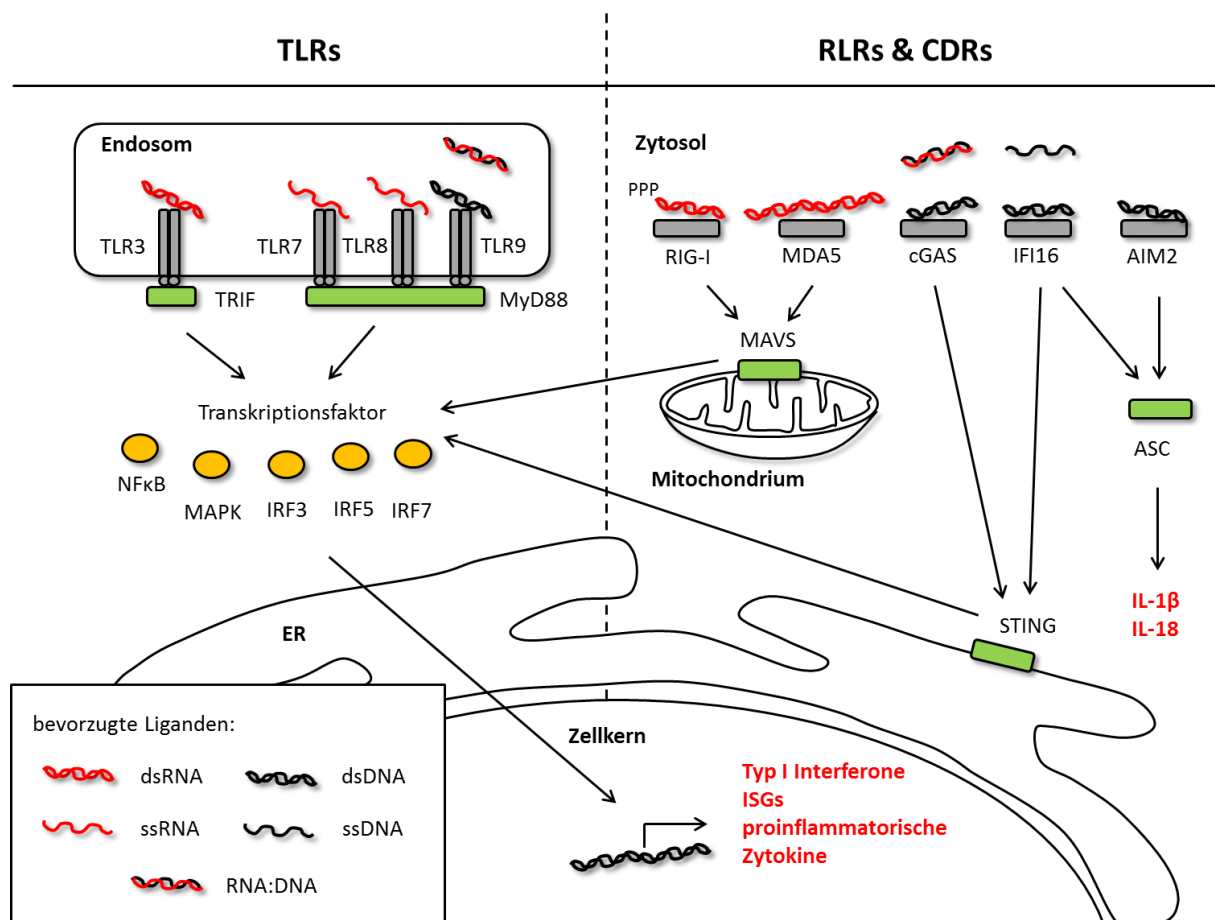


Abb. 4 Hauptsignalwege zur Detektion von Nukleinsäuren.

Schematische, stark vereinfachte Darstellung der Hauptsignalwege zur Detektion von Nukleinsäurespezies über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) des Endosoms, RIG-I-ähnliche Rezeptoren (RLRs) des Zytosols oder zytosolische DNA-Rezeptoren (CDRs). Rezeptoren sind in grau, Adaptorproteine in grün, Transkriptionsfaktoren in gelb und der Effektormechanismus in roter Schrift dargestellt. Die Signalkaskaden wurden auf die angegebenen Faktoren beschränkt und sind im Detail (Kinasen, Caspasen, *etc.*) in Primärliteratur nachzulesen (modifiziert nach Junt und Barchet, 2015).

1.5 Autophagie

Unter dem Terminus Autophagie versteht man katabole Prozesse, bei denen zytoplasmatisches Material bzw. Organellen, sog. *Cargo*, zu Lysosomen zum Abbau durch azide Hydrolasen transportiert werden. Man unterscheidet drei Transportwege: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA, *chaperon-mediated autophagy*) (Mizushima, 2007; Damme *et al.*, 2014). Während bei der Mikroautophagie die Internalisierung des Abbaumaterials in die Lysosomen durch einen Endozytose-ähnlichen Prozess erfolgt, findet bei der CMA die selektive Bindung von Proteinen mit KFERQ-ähnlichem Motiv an Chaperone der Hsc 70-Familie statt, die ihrerseits an lysosomale Membranproteine (Lamp2a, *lysosomal associated membrane proteine 2a*) binden, welche assemblieren und eine Translokationspore formen (Dice, 2007). Im Vergleich dazu werden bei der Makroautophagie die *Cargo* von einer sich bildenden Doppelmembran umschlossen. Das daraus resultierende Vesikel wird als Autophagosom bezeichnet, das mit Lysosomen fusioniert, wodurch Auto(phago)lysosomen entstehen (Massey *et al.*, 2006).

Grundsätzlich findet der autophagische Prozess unter basalen Bedingungen zur Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase statt und stellt damit neben dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) den zweiten Hauptdegradationsweg der Zelle dar (Klionsky und Emr, 2000). Er wird aber insbesondere unter Stressbedingungen wie Nährstoffmangel hochreguliert und dient dann der zellulären Minimalversorgung mit Nährstoffen durch Degradation von redundantem, zytoplasma-tischem Material. Zusätzlich können über Autophagie auch Toxine, Krankheitserreger, reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), veränderte zytosolische Komponenten wie Proteinaggregate, beschädigte und ungebrauchte Organellen sowie insbesondere langlebige Proteine abgebaut werden. Daher nimmt dieser Abbauweg vielfältige Funktionen u.a. in der Entwicklung (Levine und Klionsky, 2004), der Kontrolle des Wachstums (Jewell und Guan, 2013), der Alterung (Young *et al.*, 2009), dem Zelltod (Maiuri *et al.*, 2007) und dem Immunsystem (Deretic und Levine, 2009; Deretic, 2011) ein. In letzterem wird er beispielsweise als Abwehrmechanismus genutzt und degradiert die pathogene DNA via Makroautophagie (Watson *et al.*, 2015).

Makroautophagie in Mammalia

Die Makroautophagie kann in die drei Phasen Initiation, Elongation und Maturierung unterteilt werden (Abb. 5), die entscheidend von Proteinen der Autophagie-bezogenen Genfamilie (ATGs, *autophagy-related gene*) kontrolliert werden. Der zentrale Regulator der Initiation ist mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), der mit dem ULK(*Unc-51-like kinase*)-Komplex assoziiert vorliegt und über Phosphorylierungen diesen in seiner Aktivität unterdrückt. Unter Stressbedingungen hingegen wird diese Zusammenlagerung aufgelöst, sodass der freigesetzte Komplex, bestehend aus ULK1, ULK2, ATG13, FIP200 (*focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD*) und ATG101, in den aktiven Zustand überführt wird (Jung *et al.*, 2009; Ganley *et al.*, 2009). Dies führt

wiederum zur Rekrutierung des PI3KC3(*phosphatidyl inositol 3 kinase class III*)-Komplexes, der sich aus Beclin 1, ATG14L und den PtdIns 3-Kinase Untereinheiten Vps34 und Vps15 zusammensetzt, und damit zur Bildung des Phagophores, das durch Elongation ausgehend von einer Isolationsmembran zytoplasmatisches Material einschließt. Die Expansion dieser Membran, die sich durch Quellen wie das ER oder vesikuläre Addition speist, wird durch zwei Ubiquitin-ähnliche (UBL, *ubiquitin-like*) Konjugationssysteme gesteuert (Chen und Klionsky, 2011). Im ersten UBL-System konjugieren ATG5 und ATG12 miteinander, wobei ersteres ebenso über eine nicht-kovalente Bindung mit ATG16L1 interagiert. Dieser Heterokomplex ist nur an der äußeren Autophagosomenmembran vorzufinden und determiniert wahrscheinlich in seiner Funktion als E3 Ligase die Membranposition, an der LC3 (*microtubule associated protein 1 light chain 3*) an Phosphatidylethanolamin (PE) als zweites UBL-System konjugiert ist (Hanada *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2008). Durch diese Reaktion wird das zytoplasmatische LC3-I in seine lipidierte Form LC3-II überführt, wobei zuvor posttranslational 5 Aminosäuren C-terminal abgespalten werden (Kabeya *et al.*, 2000). Im letzten Schritt der Makroautophagie fusioniert das Autophagosom mit Lysosomen. Dieser Prozess wird durch SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*)- und RAB (*Ras-related in brain*)-Proteine kontrolliert (Amaya *et al.*, 2015). Das entstandene Auto(phago)lysosom ist nun befähigt mit Hilfe saurer Hydrolasen, wie beispielsweise den Cysteinproteasen Cathepsin B, D und L, die innere Membran und daran gebundene Cargo abzubauen. Die resultierenden Endprodukte (z.B. Aminosäuren, *etc.*) werden ins Zytoplasma zurücktransportiert (Mizushima, 2007).

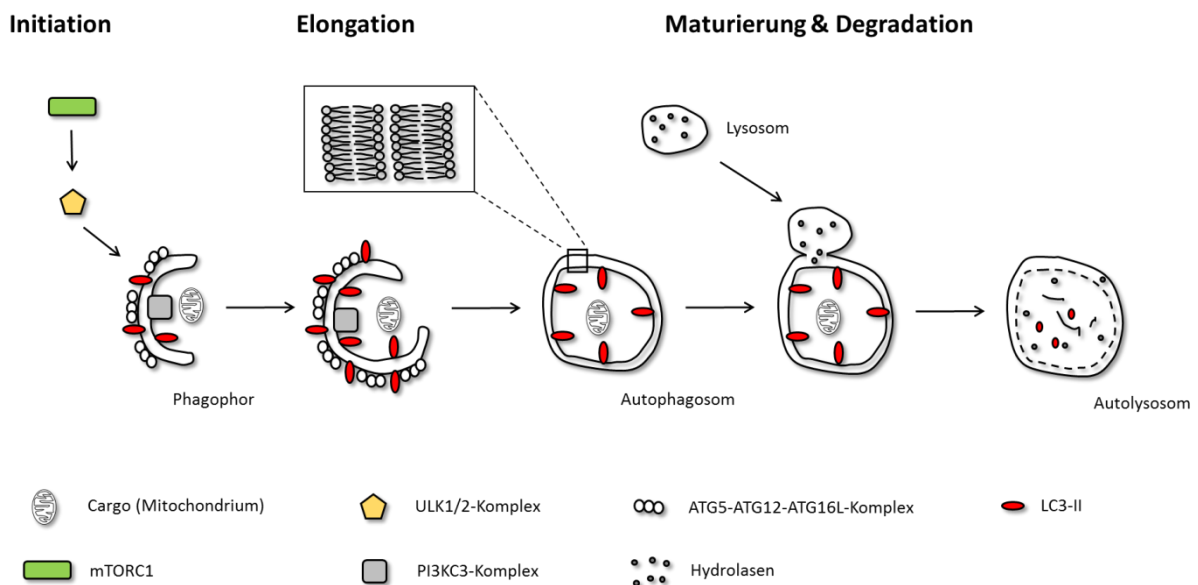


Abb. 5 Makroautophagie.

Schematische, stark vereinfachte Darstellung der Abläufe zur Bildung von Autolysosomen über die Stufen Phagophor und Autophagosom unter Angabe der Hauptkomplexe und -faktoren wie unter Abschnitt 1.5 beschrieben (modifiziert nach Yang und Klionsky, 2010).

1.6 DNA-Schadensantwort

Die DNA-Schadensantwort (DDR, *DNA damage response*) umfasst alle Prozesse, die mit der Detektion von physikalischen Veränderungen an der DNA und daraus resultierenden Signalkaskaden und Effektormechanismen einhergehen (Hühn *et al.*, 2013). Diese Schädigungen können endo- (ROS, Replikationsfehler, *etc.*) oder exogener (UV-Strahlung, Topoisomerase-Inhibitoren, *etc.*) Herkunft sein (Ciccia und Elledge, 2010).

Detektion & Signalkaskade

Die Serin/Threonin-Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) sowie deren nachgestellte Kinasen CHK2 (*checkpoint kinase*) und CHK1 sind die Hauptregulatoren der DDR. ATM wird vor allem als Antwort auf Doppelstrangbrüche (DSB, *double strand break*) und ATR als Antwort auf einzelsträngige DNA an blockierten Replikationsgabeln aktiviert (Yoshiyama *et al.*, 2013). Als Sensoren für DSBs dient der MRN-Komplex (MRE11-RAD50-NBS1; Rupnik *et al.*, 2010), der die Kinase zur Schadenstelle rekrutiert und zur Phosphorylierung der Histonvariante H2A.X führt (Dickey *et al.*, 2009). Im Vergleich dazu nutzt ATR den 9-1-1 Komplex (RAD9-RAD1-HUS1) der über RAD17 an die exponierte ssDNA gebunden wird (Bermudez *et al.*, 2003) sowie das ssDNA-bindende Protein RPA (*replication protein A*), an das sich ATRIP (*ATR-interacting protein*) anlagert und ATR rekrutiert (Zou und Elledge, 2003). Ausgehend davon werden verschiedene Mediatoren und *downstream*-Signalkaskaden aktiviert. Eine zentrale Rolle innerhalb dieser Signalwege nimmt p53 ein (Abb. 6). Unter physiologischen Bedingungen ist dessen zelluläre Proteinkonzentration aufgrund der MDM2-vermittelten Ubiquitinierung und darauffolgenden Degradierung über das UPS gering. Erfolgt jedoch die Phosphorylierung durch ATM oder ATR bzw. CHK1 oder CHK2 wird die Interaktion zwischen MDM2 und p53 inhibiert (Shieh *et al.*, 1997; Appella und Anderson, 2001). Das dadurch posttranslational stabilisierte Protein wirkt nun als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen zum Stopp des Zellzykluses bzw. der Progression zur Seneszenz (*p21*), zur Durchführung der DNA-Reparatur (*XPC*) und/oder zur Induktion von Apoptose (*BAX*, *NOXA*, *PUMA*) (Helton und Chen, 2007). Der Regulationsmechanismus zur Determinierung, welcher dieser Vorgänge aktiviert wird, ist bis heute Gegenstand der Forschung und noch nicht vollständig verstanden. Es wird jedoch postuliert, dass die p53-Proteindynamik einen entscheidenden Einfluss ausübt. So führt ein permanentes p53-Signal zur Ausbildung eines seneszenten Phänotyps (Purvis *et al.*, 2012).

Seneszenz & SASP

Der Begriff zelluläre Seneszenz beschreibt den Zustand einer Zelle als Antwort auf extra- bzw. intrazellulären Stress, der sich insbesondere durch einen permanenten, irreversiblen Zellzyklusarrest verbunden jedoch mit metabolischer Aktivität und veränderter Proteinexpression und –sekretion

(SASP, *senescence-associated secretory phenotyp*) äußert und sich damit klar von den Vorgängen Apoptose, Nekrose, Postmitotik und Quieszenz in der G₀-Phase abgrenzt (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007). Als Kennzeichen dienen neben der Abwesenheit von Proliferation, u.a. die abgeflachte Zellmorphologie (Campisi, 2013), das vergrößerte lysosomale Kompartiment (Kurz *et al.*, 2000), die Überexpression der Seneszenz-assoziierten beta-Galaktosidase (SA-β-Gal, Dimri *et al.*, 1995) und des Tumorsuppressorproteins p16^{INK4a} (Collins und Sedivy, 2003; Ohtani *et al.*, 2004) sowie das Auftreten von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF, *senescence-associated heterochromatin foci*), die häufig pro-proliferative Gene betreffen (Narita *et al.*, 2003). Dennoch sind nicht all diese Merkmale einzig für die Seneszenz charakteristisch und ebenfalls nicht für jede seneszente Zellart zutreffend, sodass der seneszente Zellzustand anhand einer Mehrzahl positiver Marker bestimmt werden muss (Campisi, 2013).

Ein weiteres, bedeutendes Charakteristikum der Seneszenz ist der SASP, dessen Komponenten eine Vielzahl löslicher Signalfaktoren (Interleukine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, *etc.*), Proteasen und Rezeptoren sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*) umfassen, die verstärkt sezerniert werden. Diese löslichen Faktoren induzieren verschiedene zelluläre Effekte, die abhängig vom physiologischen Kontext zuträglich oder schädlich für den Organismus sind (Campisi, 2013). Sie fördern beispielsweise die Tumorsuppression (Priour und Peeper, 2008; Collado und Serrano, 2010), Rekrutierung von Immunzellen, Gewebsreparatur und Wundheilung (Kortlever und

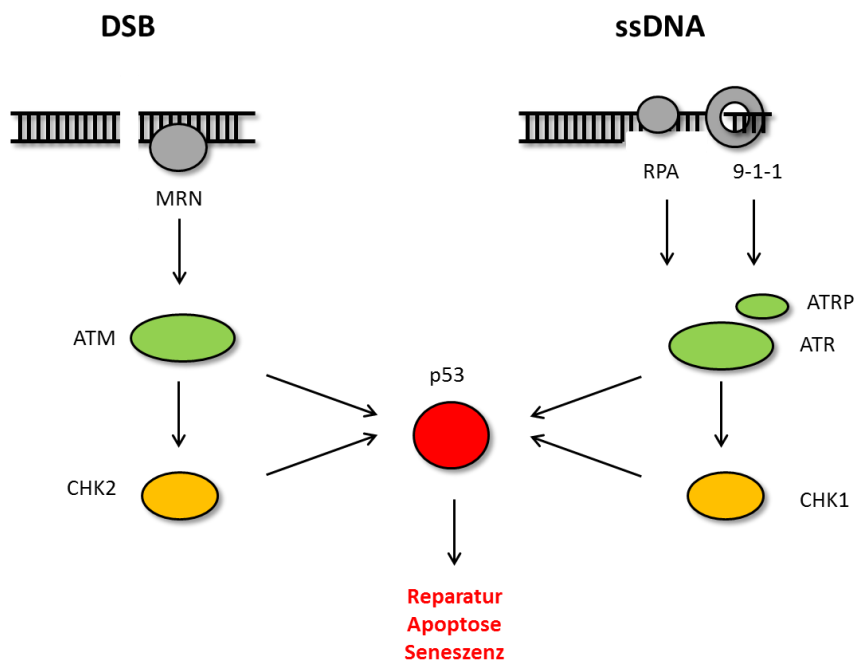


Abb. 6 DNA-Schadensantwort.

Schematische, stark vereinfachte Darstellung der DNA-Schadensantwort unter Aufführung der Schlüsselfaktoren und daraus resultierenden Effektormechanismen wie unter Abschnitt 1.6 beschrieben (modifiziert nach Yoshiyama *et al.*, 2013).

Bernards, 2006; Adams, 2009), können aber auch zum Tumorwachstum, chronischen Entzündungen und degenerativen Prozessen beitragen (Campisi *et al.*, 2011). Diese widersprüchlichen Auswirkungen der Seneszenz und des damit einhergehenden SASP sind bis heute im Fokus der Forschung. Eine Hypothese zur Erklärung dieses Paradoxons besagt, dass das transiente Auftreten seneszenten Zellen förderliche Effekte ausübt, währenddessen ein chronisches Vorliegen bzw. die Akkumulation dieser Zellen zu Schäden im Organismus führt (Campisi, 2013).

1.7 Zielsetzung

Hypomorphe Mutationen in dem ubiquitär exprimierten Enzym RNase H2 sind mit dem Aicardi-Goutières-Syndrom, einer neuroinflammatorischen Autoimmunerkrankung, assoziiert, deren Manifestation in der Regel bereits im Kindesalter besteht und die durch schwere physische und psychische Symptome charakterisiert ist (Rigby *et al.*, 2007; Crow *et al.*, 2015). Als Ursache dieser phänotypischen Veränderungen wird die Akkumulation endogener Nukleinsäuren postuliert. Dennoch konnte bisher keine definierte, immunstimulierende Nukleinsäure identifiziert werden (Crow *et al.*, 2009).

Daher war das Ziel dieser Arbeit diese zu identifizieren und den daraus resultierenden Mechanismus der Krankheitsentwicklung auf molekularer Ebene aufzuklären. Dazu sollte ein murines *Knock-out*-System auf *in-vitro*-Ebene etabliert werden, das die zeitlich definierte Induktion der RNase H2-Defizienz erlaubte. Dadurch sollten sowohl frühe Folgen der enzymatischen Abwesenheit als auch die Langzeiteffekte differenziert erforscht werden.

Die Erkenntnisse dieser grundlegenden Charakterisierung zum Verständnis der Pathogenese des Aicardi-Goutières-Syndroms sollten anschließend genutzt werden um therapeutische Ansätze zu diskutieren und ggf. auszutesten, da bis heute keine kausale Therapie zur Verfügung steht.

Neben der Etablierung eines Zellkultursystemes sollte ferner ein konditionales, murines *Knock-out*-Modell etabliert und charakterisiert werden, bei dem sich die RNase H2-Defizienz auf Astrozyten beschränken würde. Dieser Zelltyp wurde als Hauptquelle der Interferon alpha Sekretion in Gehirnen von AGS-Patienten beschrieben (van Heteren *et al.*, 2008). Ferner führt die astrogliale Überexpression des Interferons im Mausmodell zur Ausprägung eines AGS-ähnlichen Phänotyps (Akwa *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1999). Daher sollte überprüft werden, inwiefern dieses Mausmodell den AGS-Phänotyp nachstellt.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH (Steinkirchen, Deutschland) in lyophilisierter Form bezogen, mit ddH₂O auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt und bei -30 °C gelagert.

Genotypisierung

H2B_EUCOMM_for	TCCTGAGCTTGAAAAGTCACTTCG
H2B_EUCOMM_rev	TTTATGAAGCCCATCACTACACGC
GFAP_Cre_for	ACTCCTTCATAAAGCCCT
GFAP_Cre_rev	ATCACTCGTTGCATCGACCG
CreERT_for	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
CreERT_rev	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
EMX1_Cre_for	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
EMX1_Cre_rev	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT

real time PCR

GAPDH_for	TTCACCACCATGGAGAAGGC
GAPDH_rev	GGCATCGACTGTGGTCATGA
RNaseH2B_for	AGGTTTCCAGGGACAAGGAAGAGGA
RNaseH2B_rev	GTCAATGAAGCTGGAGGTTCTGGAAG
IL-6_for	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
IL-6_rev	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
IFIT1_for	GAACCCATTGGGGATGCACAACCT
IFIT1_rev	CTTGTCCAGGTAGATCTGGGCTTCT
IFIT2_for	ATGAGTTTCAGAACAGTGAGTTTAA
IFIT2_rev	AACTGGCCCATGTGATAGTAGACCC
IFIT3_for	TGGCCTACATAAAGCACCTAGATGG
IFIT3_rev	CGCAAACCTTTTGGCAAACCTTGTCT
IRF7_for	ATGCACAGATCTTCAAGGCCTGGGC
IRF7_rev	GTGCTGTGGAGTGCACAGCGGAAGT
CXCL10_for	GCCGTCATTTTCTGCCTCA

CXCL10_rev	CGTCCTTGCGAGAGGGATC
Ctsa_for	GACTCCAAGCACTTCCACTACTGGT
Ctsa_rev	CTGGCTGGATCAGAAAGGGGCCGTG
Lamp1_for	TAATGGCCAGCTTCTCTGCCTCCTT
Lamp1_rev	AGGCTGGGGTCAGAAACATTTTCTT
Atg5_for	AGCCAGGTGATGATTCACGG
Atg5_rev	GGCTGGGGGACAATGCTAA
Atg7_for	GTTCGCCCCCTTTAATAGTGC
Atg7_rev	TGAACTCCAACGTCAAGCGG
Becn1_for	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC
Becn1_rev	TCCTCTCCTGAGTTAGCCTCT
p53_for	CTAGCATTTCAGGCCCTCATC
p53_rev	TCCGACTGTGACTCCTCCAT
p21 ^{CIP} _for	CCTGGTGATGTCCGACCTGTT
p21 ^{CIP} _rev	GGGAATCTTCAGGCCGCTC
p19 ^{ARF} _for	TGAGGCTAGAGAGGATCTTGAGA
p19 ^{ARF} _rev	GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA
Igfbp5_for	CGCGGGGTTTGCCTCAACGA
Igfbp5_rev	CTGCGGCAGGGGCCTTGTTT
STING_for	AAATAACTGCCGCCTCATTG
STING_rev	ACAGTACGGAGGGAGGAGG
cGAS_for	GAGGCGCGGAAAGTCGTAA
cGAS_rev	TTGTCCGGTTCCTTCCTGGA
Trex1_for	TTCCTCAGCCACACTGCT
Trex1_rev	AGAGCTTGTCACCACACG

Sequenzierung

pMOWS_for	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
pMOWS_rev	AGCAATAGCATGATACAAAGG

2.1.2 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen

Alle zur Kultivierung von Säugerzellen verwendeten Medien wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

DMEM (-/-)	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with Stable Glutamine
-------------------	---

DMEM (+/+)	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with Stable Glutamine komplementiert mit	
	fötales Kälberserum (FKS)	10 %, v/v
	Penicillin/Streptomycin	1 %, v/v
Gliamedium 1	Minimum Essential Medium (MEM) komplementiert mit	
	Pferdeserum (HS)	10 %, v/v
	Glukose	0,6 %, v/v
	Penicillin/Streptomycin	1 %, v/v
Gliamedium 2	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with GlutaMAX™ Supplement komplementiert mit	
	fötales Kälberserum (FKS)	10 %, v/v
	Penicillin/Streptomycin	1 %, v/v
	Epidermal Growth Factor (EGF)	1 µg/50 ml
	N2 Supplement (100x)	1 x
Einfriermedium	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), with Stable Glutamine komplementiert mit	
	DMSO	10 %, v/v
	fötales Kälberserum (FKS)	50 %, v/v

2.1.3 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Alle Medien zur Kultivierung von Bakterien wurden autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Der Zusatz von Antibiotika in entsprechender Verdünnung (Abschnitt 2.1.4) erfolgte direkt vor Gebrauch.

LB-Medium (4 °C)	Trypton/Pepton	1 %, m/v
	Hefeextrakt	0,5 %, m/v
	NaCl	171 mM
	ddH ₂ O	ad 100 %, v/v

LB-Agar-Nährböden (4 °C)	Agar-Agar		1 %, m/v
	LB-Medium	ad	100 %, v/v

2.1.4 Antibiotika

Im Folgenden sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika aufgeführt, die gemäß Herstellerangaben gelöst und gelagert wurden.

Antibiotikum	Hersteller	Verwendung
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG	100 µg/ml
Tetracyclin	Sigma Aldrich	12,5 µg/ml
G418	PAA Laboratories	750 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	10 U/ml; 10 µg/ml
Puromycin	Sigma Aldrich	0,5 mg/ml
Blastizidin	InvivoGen	10 µg/ml

2.1.5 Induktoren und Inhibitoren

Alle hier aufgeführten Stimulanzen (Induktoren und Inhibitoren) wurden gemäß Herstellerangaben gelöst (LM, Lösungsmittel) und gelagert. Ihre Anwendung erfolgte gemäß Fragestellung wie unter Abschnitt 3 beschrieben.

Induktion/Inhibitor	Hersteller	Kat.nr.	LM
(Z)-4-Hydroxytamoxifen (4-OHT)	Sigma Aldrich	H7904	DMSO
Carbobenzoxy-Leu-Leu-Leucinal (MG132)	Sigma Aldrich	M7449	DMSO
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH	5050	ddH ₂ O
Doxorubicin (Doxo)	Sigma Aldrich	D1317	ddH ₂ O
Cytosin-β-D-Arabinofuranosid-hydrochlorid (Ara-C)	Sigma Aldrich	C6645	ddH ₂ O
Torin-1 (Tor-1)	Sigma Aldrich	475991	DMSO
Rapamycin (Rapa)	Sigma Aldrich	R8781	DMSO
Bafilomycin A1 (BafA1)	Sigma Aldrich	B1793	DMSO
Lipopolysaccharid von <i>E. coli</i> 0111:B4 (LPS)	Sigma Aldrich	L2630	ddH ₂ O
polyI:C HMW, tlr1-pic	Invivogen	31852-29-6	ddH ₂ O

2.1.6 Antikörper

Alle aufgeführten Antikörper wurden gemäß Herstellerangaben gelagert.

Primärantikörper	Hersteller	Kat.nr.	Methode (Verdünnung)
α -GFAP	Sigma Aldrich	G3893	IB, ICC, IHC (1:500)
α -RNase H2	Andrew Jackson	¹⁾	ICC, IHC (1:250); IB (1:500)
α -RNaseH2A	Acris	AP30734PU-N	IB (1:1.000)
α -RNaseH2A	Origene	#TA306706	IB (1:1.000)
α -pH2A.X	Cell Signaling	#9719	ICC, IHC, DZ (1:75)
α -pH2A.X	Cell Signaling	#2577	ICC, IHC (1:75), IB (1:1.000)
α -HRas	SantaCruz	#9542	IB (1:500)
α -PARP	Cell Signaling	#9542	IB (1:1.000)
α -cleaved Caspase 3	Cell Signaling	#9661	IB (1:1.000)
α -Lamp1	DSHB	1D4Bc	IB, ICC (1:1.000)
α -Lamp2	DSHB	Abl93c	IB (1:1.000)
α -pIRF3	Cell Signaling	#4947	IB (1:1.000)
α -IRF3	Santa Cruz	sc-9082	IB (1:200)
α -pTBK1	Cell Signaling	#5483	IB (1:1.000)
α - β Actin	Cell Signaling	#4967	IB (1:1.000)
α -GAPDH	Santa Cruz	sc-25778	IB (1:1.000)
α -p21 (F5)	Santa Cruz	sc-6246	IB (1:200)
α -LC3	MBL	PM036	IB (1:1.000)
α -p53	Leica Biosystem	NCL-p53-CM5p	IB (1:750)
α -HA	Cell Signaling	#3724	ICC (1:1.600)
α -dsDNA	Santa Cruz	sc-58749	ICC (1:50)
α -ssDNA	Millipore	#MAB3299	ICC, DZ (1:50)

DZ = Durchflusszytometrie IB = Immunblot ICC = Immunzytochemie IHC = Immunhistochemie

¹⁾ polyklonales Antiserum gegen das RNase H2 Holoenzym; zur Verfügung gestellt von Andrew P. Jackson (MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, UK); beschrieben in Reijns *et al.*, 2012

Sekundärantikörper	Hersteller	Kat.nr.	Methode (Verdünnung)
Alexa Fluor 488 IgG α -mouse	Invitrogen	A-11001	ICC, IHC (1:1.000)
Alexa Fluor 488 IgM α -mouse	Invitrogen	A-10680	DZ, ICC (1:1.000)

Alexa Fluor 488 IgG α -rat	Invitrogen	A-11006	ICC (1:1.000)
GE Healthcare Cy3 α -rabbit	GE Healthcare	29-0382-76	ICC, IHC (1:1.000)
goat anti-mouse IgG-HRP	Dianova	115-035-146	IB (1:5.000)
goat anti-rabbit IgG-HRP	Dianova	111-035-144	IB (1:5.000)
goat anti-rat IgG-HRP	Dianova	112-035-143	IB (1:10.000)

DZ = Durchflusszytometrie IB = Immunblot ICC = Immunzytochemie IHC = Immunhistochemie

2.1.7 Enzyme

Alle in dieser Arbeit genutzten Enzyme und deren spezifische Puffer wurden bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und, wenn nicht anders beschrieben, nach Herstellerangaben verwendet. Als Bezugsquelle diente Thermo Fisher Scientific.

2.1.8 Vektoren

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren mit einer kurzen Beschreibung ihrer Hauptmerkmale und der Bezugsquelle aufgeführt.

pBABE H-Ras^{G12V} Expressionsvektor für die retrovirale Transduktion von Säugerzellen; kodierend für die konstitutiv aktivierte H-Ras-Mutante G12V sowie für die Resistenzgene zur Selektion mittels Ampicillin und Puromycin
(von William Hahn, Addgene # 9051)

ptfLC3 Expressionsvektor, kodierend für LC3, das mit mRFP und eGFP fusioniert vorliegt und die Unterscheidung der Strukturen Autophagosom und Autolysosom in der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht, sowie die Resistenzgene zur Selektion mittels Kanamycin und Neomycin
(von Tamotsu Yoshimori, Addgene #21074)

pUNO1-cGAS-HA3X Expressionsvektor, kodierend für den C-terminal 3xHA-getaggten zytosolischen DNA-Sensor cGAS sowie für das Resistenzgen zur Selektion mittels Blastizidin
(InvivoGen, #14A23-JC)

pMOWS-eGFP	Expressionsvektor zur retroviralen Transduktion von Säugerzellen; kodierend für eGFP sowie die Resistenzgene zur Selektion mittels Ampicillin und Puromycin (Ketteler <i>et al.</i> , 2002)
pMOWS-mRFP-eGFP-LC3	Expressionsvektor zur retroviralen Transduktion von Säugerzellen; kodierend für das N-terminal mRFP-eGFP-getaggte Protein LC3 sowie für die Resistenzgene zur Selektion mittels Ampicillin und Puromycin (von Kareen Bartsch, diese Arbeit, Abschnitt V.III.)

2.1.9 Größenmarker

Die Größenbestimmung von Proteinen im Immunblot (Abschnitt 2.2.4.5) erfolgte mit Hilfe der *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (10-250 kDa). Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden die *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* (250-10000 bp) bzw. *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (100-1000 bp) je nach Fragestellung verwendet (Abschnitt 2.2.3.6). Alle Größenmarker wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen.

2.1.10 Reagenziensätze (Kits)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die unten aufgeführten Kits nach Herstellerprotoll verwendet.

Reagenziensatz	Hersteller
ELISA DuoSet (mIL-6, mKC)	R&D Systems
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJET RNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
GeneJET Gel Extraction Kit	Fermentas
NucleoBond Xtra® Midi Kit	Macherey & Nagel
Senescence Detection Kit	BioVision
Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit	Invitrogen
SuperSignal West Femto	Thermo Fisher Scientific
SYTOX AADvanced dead cell stain solution Kit	Invitrogen

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Nachfolgend sind alle in der vorliegenden Arbeit genutzten Verbrauchsmaterialien geordnet gemäß der Bezugsquelle in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Soweit es die Aufarbeitung der Proben unter sterilen Bedingungen verlangte, wurden diese Materialien gegebenenfalls zuvor autoklaviert oder mit Desinfektionsmittel behandelt.

Hersteller	Verbrauchsmaterial
Bemis	Parafilm
Biozym	BZO Seal Film; 384 Well PCR Platte (weiß, LC 480)
Braun	Sterican Einmal-Injektionskanüle; Omnifix®-F 1 ml Tuberkulin
Greiner	6-Well Platten; Mikroplatte 96-Well
Hansa Trading	Nitril-Handschuhe
Lab Logistic Group	Spritzenvorsatzfilter (0,45/0,20 µm)
Millipore	PVDF-Membran <i>Immobilon</i> (0,45 µm Porengröße)
Nunc	Mikrotestplatte 96-Well <i>Maxisorb</i>
Roth	Deckgläschen (1,8x1,8 mm); Objektträger; Nitril-Handschuhe; Alu-Folie; Papiertaschentücher; Whatman-Papier; Chromafil® Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)
Sarstedt	Reaktionsgefäße (0,2/ 1,5/ 2,0/ 15/ 50 ml); Multiply Strip 8er-Kette (0,2 ml); Biosphere-8er-Deckelkette; Petrischalen (Durchmesser 100 mm); Impfschlinge (10 µl); Halbmikroküvetten; Zellkulturschale (Durchmesser 35/ 60/ 100 mm); Zellkulturflasche (T-25/ T-75); Cryo Pure Gefäß (1,6 ml); Fitropur Spritzenfilter (0,2/ 0,45 µm Porengröße); Serologische Pipetten (5/ 10 ml), Mikro-Schraubröhre (2,0 ml); Pipettenspitzen (10/200/1000 µl); Zellschaber; Autoklavierbeutel; Mikrotestplatte 96-Well, Deckgläschen (18x18mm)

2.1.12 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, geordnet gemäß der Bezugsquelle in alphabetischer Reihenfolge, wurden gemäß Herstellerangaben gelagert und gehandhabt.

Hersteller	Chemikalie
Biozym	Agarose
Carl Roth GmbH + Co. KG	Aceton, Acrylamid/Bisacrylamid, Agar-Agar, Ampicillin, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Borsäure, bovines Serumalbumin (BSA), Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, D-Glukose, Glycerol, Glycin, Hefeextrakt, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, β -Mercaptoethanol, Methanol, Milchpulver, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natronlauge, Natriummetaborat, Natriumorthovanadat, Propanol, Saccharose, Salzsäure, Sodiumdodecylsulfat (SDS), Tetramethylethylendiamin (TEMED), Tris, Trypton/Pepton, Tween 20
Fluka	Bromphenolblau
PAA Laboratories GmbH	Trypsin/EDTA, Penicillin/Streptomycin
Roche Diagnostics	BM blue POD-Substrat, Phospho-Stop, Triton-X 100
Serva	Xylencyanol

2.1.13 Geräte

Nachstehend ist eine Auflistung der in dieser Arbeit genutzten Geräte aufgeführt, deren Funktionalität regelmäßig geprüft wurde. Ihre Handhabung und Reinigung erfolgte gemäß den Betriebsanweisungen.

Hersteller	Gerät
Alpha Innotech	Imager <i>FluorChem-Q</i>

BD Biosciences Pharmingen	BD FACS <i>Canto</i>
Binder	Wärmeschrank <i>WTC</i>
BioRad	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System; Mini-PROTEAN Tetra Cell Transfer System; Power-Pac 200/300; GelDoc 2000
Biosan	Thermoshaker <i>TS-100</i>
Branson	Sonifier <i>450</i>
Elektrolux	Kühlschrank
Flow Laboratories	Steril-Arbeitsbank <i>Gelair® BSB 6</i>
Eppendorf	Mehrkanalpipetten; Pipetten; Thermomixer <i>5436</i> ; Zentrifuge <i>5417R</i>
GFL	Taumelschüttler, Tiefkühlschrank (-80 °C)
Heidolph	Wirbelmischer <i>REAX 2000</i>
Heraeus Instruments	Steril-Arbeitsbank <i>Clean-Air</i> ; Zellkulturinkubator <i>HeraCell CO₂-Inkubator</i> ; Biofuge <i>pico</i> , <i>Labofuge 400e</i>
HuberLab	Wasserbad
IKAMA	Heizgerät <i>REO</i>
Kern	Präzisionswaage
Nexcelom Bioscience	<i>Cellometer Auto T4</i>
Olympus	Mikroskop <i>FV1000</i>
PeqLab	NanoDrop Spektrophotometer <i>ND-1000</i>
Scotsman	Eismaschine <i>AF80</i>

Tecan	<i>Microplate Reader Rainbow, Multimode Reader Infinite</i>
Thermo Scientific	Zellkulturinkubator <i>HeraCell 150i CO₂ Inkubator</i>
Zeiss	Mikroskop <i>Telaval 31</i> , Mikroskop <i>Axiovert 200</i>

2.1.14 Puffer und Stammlösungen

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Stammlösungen in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Alle Lösungen, die in der Zellkultur verwendet wurden, wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert.

Anodenpuffer (4 °C, pH 10,4) <i>(Westernblot)</i>	Tris		300 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Blockierungslösung (4 °C) <i>(Immundefektion)</i>	Milchpulver		5 %, m/v
	TBST	ad	100 %, v/v
Blockierungslösung 2 (4 °C) <i>(Immunzytochemie)</i>	BSA		0,5 %, m/v
	Glycin		0,5 %, m/v
	PBS	ad	100 %, v/v
Blockierungslösung 3 (4 °C) <i>(Immunhistochemie)</i>	BSA		0,5 %, m/v
	Glycin		0,5 %, m/v
	Triton-X 100		0,1 %, v/v
	PBS	ad	100 %, v/v
Boratpuffer (4 °C) <i>(Beschichtung von Kulturgefäßen)</i>	Borsäure		100 mM
	NaCl		75 mM
	Natriummetaborat		25 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Elektrodenpuffer (RT) <i>(SDS-PAGE)</i>	Tris		0,3 %, m/v
	Glycin		1,4 %, m/v
	SDS		0,1 %, m/v
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v

FACS Puffer (RT) (FACS)	BSA		1 %, m/v
	NaN ₃		0,05 %, m/v
	PBS	ad	100 %, v/v
Fixierlösung 1 (-20 °C) (Immunzytochemie)	Methanol		50 %, v/v
	Aceton	ad	100 %, v/v
Fixierlösung 2 (-20 °C) (Immunzytochemie)	Methanol		84 %, v/v
	PBS	ad	100 %, v/v
Formalin (4 °C) (Immunhistochemie)	Formaldehyd (37 %)		4 %, v/v
	PBS (10x)		1 x
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Isolierpuffer (4 °C) (Astrozytenisolierung)	HBSS (10x)		1 x
	HEPES		10 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Kathodenpuffer (4 °C, pH 8,0) (Westernblot)	Tris		25 mM
	Glycin		40 mM
	MeOH		20 %, v/v
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Ladepuffer (RT, 6x) (Agarosegelelektrophorese)	Glycerol		30 %, v/v
	EDTA (pH 8,0)		50 mM
	Bromphenolblau		Spatelspitze
	Xylencyanol		Spatelspitze
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Lysispuffer 1 (4 °C) (Zelllyse/Standard)	Tris		50 mM
	NaCl		100 mM
	TRITON X-100		1 %, v/v
	EDTA		2 mM
	Proteinaseinhibitor-Cocktail (5x)		1 x
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v

Lysispuffer 2 (4 °C) (<i>Gewebslyse</i>)	Natriumvanadat		0,1 mM
	PhosphoStop (5x)		1 x
	Lysispuffer 1	ad	100 %, v/v
Lysispuffer 3 (4 °C, pH 8,0) (<i>Zellyse/RNase H Assay</i>)	Tris		50 mM
	NaCl		280 mM
	NP-40		0,5 %, v/v
	EDTA		0,2 mM
	Glycerol		10 %, v/v
	Natriumvanadat		0,1 mM
	DTT		1 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Lysispuffer 4 (4 °C, pH 7,9) (<i>Zellyse/RNase H Assay</i>)	HEPES		20 mM
	KCl		10 mM
	EDTA		1 mM
	Natriumvanadat		0,1 mM
	Glycerol		10 %, v/v
	DTT		1 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Lysispuffer 5 (4 °C) (<i>β-Hexosaminidase-Assay</i>)	Proteinaseinhibitor-Cocktail (5x)		1 x
	TRITON X-100		1 %, v/v
	PBS	ad	100 %, v/v
PBS (4 °C, pH 7,2-7,4) (<i>Zellkultur</i>)	NaCl		136,89 mM
	KCl		2,68 mM
	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O		8,09 mM
	KH ₂ PO ₄		1,76 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
PBST (RT, pH 7,2-7,4) (<i>ELISA</i>)	Tween-20		%, v/v
	PBS	ad	100 %, v/v
Probenpuffer (4 °C, 5x) (<i>SDS-PAGE</i>)	Tris		0,313 M
	Glycerol		50 %, v/v
	SDS		10 %, m/v

	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Reaktionspuffer (RT, pH 8,0) <i>(RNase H Assay)</i>	Tris		50 mM
	KCl		60 mM
	MgCl ₂		10 mM
	BSA		0,01 %, m/v
	Triton-X 100		0,01 %, v/v
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
Sammelgel (5 %) <i>(SDS-PAGE)</i>	ddH ₂ O		2810 µl
	Tris-HCl (0,5 M, pH 6,7)		1250 µl
	SDS (10 %)		50 µl
	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung		835 µl
	APS (10 %)		50 µl
	TEMED		5 µl
Stripping-Puffer (RT) <i>(Stripping)</i>	SDS (10 %)		2 %, v/v
	NaOH (2M)		0,1 M
	TBST	ad	100 %, v/v
TBE (RT, 0,5x) <i>(Agarosegelelektrophorese)</i>	Tris-HCl		44,5 mM
	Borsäure		44,5 mM
	EDTA		10 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
TBS (RT, pH 7,5) <i>(Immundetektion)</i>	Tris		20 mM
	NaCl		140 mM
	EDTA		1 mM
	ddH ₂ O	ad	100 %, v/v
TBST (RT, pH 7,5) <i>(Immundetektion)</i>	Tween-20		%, v/v
	TBS	ad	100 %, v/v
Trenngel (10 %/12 %) <i>(SDS-PAGE)</i>	ddH ₂ O		6730/5590 µl
	Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)		4250 µl
	SDS (10 %)		170 µl
	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung		5660/6800 µl

	APS (10 %)	170 μ l
	TEMED	17 μ l
Zitratpuffer	Zitronensäure (pH 4,6)	0,2 M
(<i>β-Hexosaminidase-Assay</i>)	BSA	0,4 %, m/v
	NaN ₃	0,08 %, m/v
	ddH ₂ O	ad 100 %, v/v

2.1.15 Zelllinien, Primärkulturen und Bakterienstämme

Im Folgenden sind alle in der vorliegenden Arbeit genutzten Zelllinien, Primärkulturen und Bakterienstämme mit einer kurzen Beschreibung und Angabe ihrer Herkunft aufgeführt.

Zelllinien

Phoenix-ECO

Beschreibung

Verpackungszelllinie zur Produktion infektiöser, replikationsdefizienter, ekotroper Retroviren, die auf HEK293T-Zellen basiert; Expression von Gag-Pol und Env (von Garry P. Nolan zur Verfügung gestellt; Stanford University, Palo Alto, USA)

Primärkulturen

GFAP_Cre^{-/-}

Beschreibung

astrogliale Zellen, die aus den Großhirnhemisphären von P1-P4 Mäusen des Genotyps RNaseH2B^{lox/lox} GFAP_Cre^{-/-} isoliert wurden (diese Arbeit, Abschnitt 2.2.2.5)

GFAP_Cre^{+/-}

astrogliale Zellen, die aus den Großhirnhemisphären von P1-P4 Mäusen des Genotyps RNaseH2B^{lox/lox} GFAP_Cre^{+/-} isoliert wurden und eine Deletion des 5. Exons des *RNaseH2B* Genes aufwiesen (diese Arbeit, Abschnitt 2.2.2.5)

CreERT^{-/-}

murine embryonale Fibroblasten (MEFs), die aus Embryonen des Entwicklungsstadiums E13.5 mit dem Genotyp RNaseH2B^{lox/lox} CreERT^{-/-} isoliert wurden (diese Arbeit, Abschnitt 2.2.2.6)

CreERT^{+/-} murine embryonale Fibroblasten (MEFs), die aus Embryonen des Entwicklungsstadiums E13.5 mit dem Genotyp RNaseH2B^{lox/lox} CreERT^{+/-} isoliert wurden und die durch Zusatz von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) eine zeitlich definierte Deletion des von *lox-P sites* eingeschlossenen 5. Exons des *RNaseH2B* Genes erlaubten
(diese Arbeit, Abschnitt 2.2.2.6)

p53^{-/-} H2B^{+/+} murine embryonale Fibroblasten (MEFs) des Genotyps p53^{-/-} H2B^{+/+} (Reijns *et al.*, 2012)
(von Andrew P. Jackson zur Verfügung gestellt; MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, UK)

p53^{-/-} H2B^{-/-} murine embryonale Fibroblasten (MEFs) des Genotyps p53^{-/-} H2B^{-/-} (Reijns *et al.*, 2012)
(von Andrew P. Jackson zur Verfügung gestellt; MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, UK)

Bakterienstämme

E. coli XL-1 Blue

Beschreibung

aus dem Stamm *Escherichia coli* K12 hervorgegangener Stamm
(Stratagen)

2.1.16 Mausstämme

2.1.16.1 RNaseH2B_flox-Mausstamm

Der RNaseH2B_flox-Mausstamm wurde von Prof. Dr. Axel Roers (Institut für Immunologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Generierung erfolgte durch Kreuzung heterozygoter RNaseH2B^{KOF}-Mäuse (Rnaseh2b^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/J}), die vom *International Knock-out Mouse Consortium* bezogen wurden, mit einem Flpe-Deleter-Mausstamm (Rodriguez *et al.*, 2000). Die Deletion der frt-flankierten *GeneTrap*-Kassette wurde anhand einer PCR demonstriert (Hiller *et al.*, 2012).

Die RNaseH2B_flox-Mäuse sind lebensfähig, fertil und weisen keine besonderen Auffälligkeiten auf. Bei der Einkreuzung eines Cre-Treiberstammes erfolgt die Deletion des fünften Exons im Gen der RNaseH2B-Untereinheit.

2.1.16.2 Cre-Treiberstämme

Nachstehend sind alle im Rahmen dieser Arbeit zur Zucht konditionaler RNaseH2B-*Knock-out*-Tiere eingesetzten Cre-Treiberstämme (a)-(c) aufgeführt, die in den RNaseH2B_flox-Mausstamm eingekreuzt wurden und zu den folgenden neuen transgenen Linien führten:

gefloxter Mausstamm	Cre-Treiberstamm	konditionaler Mausstamm
RNaseH2B_flox	CreERT (#4682)	CreERT_H2B
	GFAP_Cre (#4600)	GFAP_Cre_H2B
	EMX1_Cre (#5628)	EMX1_Cre_H2B

Alle Cre-Treiberstämme wurden von *The Jackson Laboratory* (USA) bezogen.

(a) CreERT-Mausstamm (B6.Cg-Tg(cre/Esr1)^{5Amc}/J)

Der CreERT-Mausstamm wurde zur induzierbaren, spezifischen Deletion von loxP-flankierenden Genomsequenzen generiert (Hayashi *et al.*, 2002). Die Expression des Fusionsproteins aus Cre-Rekombinase und Östrogenrezeptor, dessen natürlicher Ligand aufgrund der G525R-Mutation nicht mehr gebunden werden kann, unterliegt der Kontrolle des konstitutiv aktiven beta-Aktin-Promotors des Huhnes, an den der beta-Aktin- als auch der Cytomegalievirus (CMV) *immediate-early*-Enhancer gekoppelt sind. Die Deletion erfolgt ubiquitär durch 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induzierbare Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern.

(b) GFAP_Cre-Mausstamm (FVB-Tg(GFAP-cre)^{25Mes}/J)

Der GFAP_Cre-Mausstamm wurde von Dr. Albee Messing (University of Wisconsin-Madison; Zhuo *et al.*, 2001) als transgene Linie zur spezifischen Deletion von loxP-flankierenden Genomsequenzen im zentralen Nervensystem generiert. Die Expression der Cre-Rekombinase unterliegt dabei der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors, der ab dem embryonalen Tag 13.5 (E13.5) aktiv ist. Die hemizygoten Mäuse (GFAP_Cre^{+/-}) sind lebensfähig, fertil und weisen keine besonderen Auffälligkeiten auf. Bei der Einkreuzung eines loxP-Sequenz-tragenden Stammes erfolgt die Deletion im Genom von Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen sowie einigen Neuronen.

(c) EMX1_Cre-Mausstamm (B6.129S2-Emx1^{tm1(cre)K_{rj}}/J)

Der EMX1_Cre-Mausstamm wurde von Kevin R. Jones (University of Colorado-Boulder, Gorski *et al.*, 2002) als transgene Linie zur spezifischen Deletion von loxP-flankierenden Genomsequenzen im Vorderhirn generiert. Die Expression der Cre-Rekombinase wird vom endogenen Promotor des *Emx1*-Lokus kontrolliert, der ab dem embryonalen Tag 10.5 (E10.5) aktiv ist. Die hemizygoten Mäuse (EMX1_Cre^{+/-}) sind lebensfähig, fertil und weisen keine besonderen Auffälligkeiten auf. Die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des loxP-flankierenden Genabschnittes erfolgt in 88 % der Neuronen des Neocortex und Hippocampus sowie in den glialen Zellen des Palliums.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten zur Kultivierung von Säugerzellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, deren Arbeitsflächen regelmäßig mit Desinfektionsmitteln behandelt und mit UV-Licht bestrahlt wurden. Ferner wurden alle Gebrauchsmaterialien autoklaviert bzw. deren Oberflächen vor Gebrauch mit desinfizierenden Flüssigkeiten gesäubert.

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von adhärennten Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Abschnitt 2.1.15) wurden in DMEM (+/+) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre in Inkubatoren kultiviert. Ferner wurden die Zellen regelmäßig bezüglich ihrer Zellform und -dichte lichtmikroskopisch begutachtet und bei einem nahezu flächendeckenden Wachstum passagiert. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/EDTA (Sigma Aldrich) von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Je nach Wachstumsverhalten wurden sie anschließend in entsprechender Verdünnung bzw. nach vorheriger Zellzählung (Abschnitt 2.2.1.6) erneut ausgesät.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagieren von primären adhärennten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Die in dieser Arbeit isolierten murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs, Abschnitt 2.2.2.6) wurden in DMEM (+/+) bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und physiologischen O₂-Drücken von 3 % in Inkubatoren kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte bei 90 %iger Konfluenz im Verhältnis 1:4, wobei die Ablösung der adhärennten Zellen mit Accutase® (Sigma Aldrich) durchgeführt wurde. Die Kulturen wurden bis zur Subkultur 15 verwendet.

2.2.1.3 Induktion des *Knock-outs* in MEFs des CreERT_H2B-Stammes

Zur Induktion der Cre-Rekombinase vermittelten Deletion des von *loxP-sites* flankierten 5. Exons des *RNaseH2B* Genes wurde dem Medium der primären CreERT^{+/+}-MEFs des CreERT_H2B-Stammes einen Tag nach Aussaat 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT, Stock: 500 µM) in einer Endkonzentration von 100 nM hinzugesetzt. In gleicher Weise wurden die CreERT^{-/-}-Kontrollzellen behandelt. Nach drei Tagen wurde das Medium gewechselt oder die Zellen direkt für Experimente verwendet.

2.2.1.4 Kultivierung und Passagieren von adhärenenten, astroglialen Primärzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Astrozyten wurden nach der Isolierung (Abschnitt 2.2.2.5) für 48 h in Gliamedium 1 und anschließend in Gliamedium 2 bei 37 °C, 5 % CO₂- und 3 % O₂-Atmosphäre in Inkubatoren kultiviert. Zur Entfernung der leicht adhärenenten Mikroglia wurde jeweils am Tag vor der Durchführung eines Experimentes mehrfach stark mit PBS gewaschen. Die Passagierung erfolgte bei einem flächendeckenden Wachstum im Verhältnis 1:6 bzw. 1:2 für Cre-Rekombinase negative bzw. positive Kulturen. Dazu wurden die astroglialen Zellen mit PBS gewaschen, mit Hilfe eines Gemisches aus Accutase® und Trypsin/EDTA (2:3; Sigma Aldrich) von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und auf Poly-L-lysin beschichtete Kulturschalen (Abschnitt 2.2.1.5) ausgesät.

2.2.1.5 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Poly-L-Lysin

Zur Beschichtung von Kulturgefäßen wurde Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich) in Boratpuffer in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml gelöst. Die Kulturgefäße wurden mit dieser Lösung über Nacht im Inkubator inkubiert und am darauffolgenden Tag zwei Mal für jeweils zwei Stunden mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend konnten sie für die Kultivierung astroglialer Primärzellen genutzt werden (Abschnitt 2.2.1.4).

2.2.1.6 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die durch enzymatische Behandlung (Trypsin/EDTA bzw. Accutase®) in Suspension überführten vormals adhärenenten Zellen mit Hilfe einer Neubauerkammer gemäß Herstellerprotokoll ausgezählt. Die automatisierte Auszählung mit Hilfe des *Cellometer Auto T4* erfolgte nur zur Bestimmung der Zellzahl der zur Analyse von Überständen mittels ELISA eingesetzten Kulturen (Abschnitt 2.2.1.8).

2.2.1.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zelllinien und primären Kulturen wurden diese nach erfolgter enzymatischer Ablösung von der Oberfläche des Kultivierungsgefäßes (Trypsin/EDTA bzw. Accutase®) und Pelletierung (1.300 g, 3 min, RT) in Einfriermedium aufgenommen und mit Hilfe eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussells bei -80 °C eingefroren. Dabei galt, dass pro Kryoröhrchen eine 10 cm Schale adhärenter Zellen abgelöst und in 1 ml Einfriermedium überführt wurde.

Bei erneuter Inkulturnahme wurden die eingefrorenen Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in 9 ml DMEM (+/+) überführt. Die anschließend durch Zentrifugation (1.300 g, 3 min, RT) pelletierten Zellen wurden in neuem Medium in einem Kultivierungsgefäß ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Kultivierungsmedium gewechselt.

2.2.1.8 Ernte von Zellüberständen

Zum Nachweis des Seneszenz-assoziierten, sekretorischen Phänotyps (SASP) wurden die Überstände der primären MEFs des CreERT_H2B-Stammes sowie der primären Astrozyten gesammelt. Dazu wurden die in 6-Well-Platten ausgesäten und ggf. induzierten Zellen zuvor in 600 µl DMEM (+/+) für 24 h inkubiert. Die abgenommen Überstände wurden zur Entfernung von Zellen und Zelltrümmern zentrifugiert (12.000 g, 5 min, 4 °C) und bis zur Durchführung der ELISA-Messungen (Abschnitt 2.2.4.11) bei -30 °C gelagert. Ferner wurden die im Kulturgefäß verbliebenen Zellen trypsinisiert und zur Normierung der gemessenen Konzentration an löslichem Protein deren Zellzahl bestimmt (Abschnitt 2.2.1.6).

2.2.1.9 Transfektion mit TurboFect™

Zur transienten Einbringung von Vektoren in Zelllinien wurden Transfektionen mit TurboFect™ (Fisher Thermo Scientific) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurde der unten aufgeführte Ansatz pipettiert und für 20 min bei RT inkubiert, ehe er tropfenweise auf die am Vortag ausgesäten, zu 70-90 % konfluenten Zellen gegeben wurde. Daraufhin wurden die Säugerzellen bei 37 °C über Nacht inkubiert und das Medium am folgenden Tag gewechselt.

Ansatz zur Transfektion einer 10-cm Schale

DMEM (-/-)	400,0 µl
Vektor	5,0 µg
TurboFect™	10,0 µl

2.2.1.10 Transfektion mit Lipofectamine® 2000

Zur transienten Einbringung von Vektoren in Primärzellen wurden Transfektionen mit Lipofectamine®2000 (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurden 1,5 µg Vektor in 100 µl Opti-MEM® (GIBCO) gelöst und zu mit 0,5 µl Lipofectamine®2000 versetzten 100 µl Opti-MEM® pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz tropfenweise auf die am Vortag in 6-Wells ausgesäten, zu 70-90 % konfluenten Zellen gegeben. Ein Wechsel des Mediums am darauffolgenden Tag war nicht notwendig.

2.2.1.11 Transfektion von siRNA mittels Lipofectamine ® RNAiMAX

Zur gezielten Senkung von Transkripten eines Genes (*Knock-down*) wurden Transfektionen mit Lipofectamine ® RNAiMAX (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurden 25 µM siRNA (siGENOME SMARTpool, Dharmacon) in 150 µl Opti-MEM® gelöst und zu mit 7,5 µl Lipofectamine®RNAiMAX versetzten 150 µl Opti-MEM® pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz tropfenweise auf die am Vortag in 6-Wells ausgesäten, zu 60-80 % konfluenten Zellen gegeben. Ein Wechsel des Mediums am darauffolgenden Tag war nicht notwendig.

siRNA Oligonukleotide: Zielgen	Dharmacon-Referenznummer
cGAS	M-055608-01-0005
STING	M-05528-01
ATG5	M-064838-02-0005
<i>non-targeting pool</i>	D-001206-13-05

2.2.1.12 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion diente der stabilen Einbringung eines Zielgenes in das Genom von murinen Primärzellen. Dazu wurden $2 \cdot 10^6$ Phoenix-ECO-Zellen auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät und am darauffolgenden Tag mit dem für das Zielgen kodierenden Vektor transfiziert (Abschnitt 2.2.1.9). Es handelte sich hierbei um eine Verpackungszelllinie zur Produktion von infektiösen, replikationsdefizienten, ekotropen Retroviren, die auf der HEK293T-Zelllinie basiert und nur einen eingeschränkten Wirtstropismus aufweist. Sie zeichnet sich durch die Expression der retroviralen Gene *gagpol* sowie *env* aus, die für die Kapsidproteine, reverse Transkriptase sowie Hüllproteine kodieren. Der Viruspartikel-haltige Zellüberstand wurde nach 24 h mit einer 5 ml Spritze abgenommen und über einen 0,45 µm Spritzenfilter auf die zu transduzierenden Zellen überführt (6-Well: 2 ml Überstand; 12-Well: 1 ml Überstand). Des Weiteren wurde Polybren in einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugesetzt und das Kulturgefäß bei 1.000 g für 1 h zentrifugiert. Nach

weiteren 24 h wurden die adhärennten Zellen mit warmem PBS gewaschen und neuem Medium überschichtet, das mit einem entsprechendem Antibiotikum zur Selektion versetzt wurde.

2.2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.2.1 Haltung von Mäusen

Die Haltung der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme erfolgte in der geschlossenen Barrierehaltung des Victor-Hensen-Hauses (VHH) der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel. Die mikrobielle Belastung wurde regelmäßig gemäß den Vorgaben der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) überprüft.

Die Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (*individually ventilated cages*, IVC-Rack) mit Einstreu und Fütterung *ad libitum* nach Geschlechtern getrennt gehalten. Pro Käfig wurde die Anzahl der Tiere auf fünf Weibchen oder drei Männchen begrenzt. Eine Einzelhaltung der Tiere wurde aufgrund ihres sozialen Wesens vermieden, da sie zu Isolationsstress führen kann. Zur eindeutigen Identifizierung der Einzeltiere wurden diese fortlaufend auf Haltungskarten nummeriert und mit Ohrstanzen markiert.

Position der Ohrstanze	Kennzeichnung
keine	o
rechts	re
links	li
rechts & links	reli
2x rechts	rere
2x links	lili

2.2.2.2 Schwanzbiopsie und –lyse zur Genotypisierung der Mauslinien

Zur Feststellung des Genotyps der Mäuse wurden zwischen der dritten und sechsten Woche nach der Geburt Biopsien der Schwanzspitze genommen. Dazu wurde der terminale, nicht verknöcherte Anteil des Schwanzes unter Verwendung einer auf 250 °C erhitzten Präparationsschere abgeschnitten. Anschließend wurden die Biopsate mit 200 µl *Direct Lysis Solution* (Peqlab) und 4 µl Proteinase K bei 55 °C und 450 rpm über Nacht lysiert und zur enzymatischen Inaktivierung bei 85 °C für 45 min am darauffolgenden Tag inkubiert. Das DNA-haltige Lysat konnte direkt zum PCR-Ansatz (Abschnitt 2.2.2.3) zugesetzt werden.

2.2.2.3 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurden Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Diese dienen der selektiven Amplifikation gentechnisch modifizierter bzw. nativ vorkommender Genombereiche. Die Bestimmung des genetischen Status kann anschließend anhand des Bandenmusters der Amplifikate im Agarosegel (Abschnitt 2.2.3.6) erfolgen. Dazu wurde das DNA-haltige Lysat der Schwanzbiopsate (Abschnitt 2.2.2.2) zu dem unten aufgeführten Ansatz pipettiert und im Thermocycler nach einem spezifischen Programm prozessiert.

Ansatz der Genotypisierungs-PCR		PCR-Programm		
10x DreamTaq Buffer	5,0 µl	Initiation	95 °C	3 min
dNTPs (10 mM)	1,0 µl	Denaturierung	95 °C	30 s
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	Annealing	X °C	1 min
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	Elongation	72 °C	Y s
Lysat	1,0 µl	finale Elongation	72 °C	10 min
ddH ₂ O	39,75 µl	Lagerung	4 °C	
DreamTaq DNA Polymerase	0,25 µl			
	Σ 50,0 µl			

Mausstamm	X	Y
RNaseH2B_flox	53,0 °C	30 s
GFAP_Cre	51,0 °C	25 s
CreERT	51,7 °C	120 s
EMX1_Cre	51,7 °C	30 s

2.2.2.4 Zucht von Mäusen

Die Zucht der Mäuse erfolgte je nach Fragestellung als Dauer- oder Terminverpaarung. Die Dauerverpaarung (DVP) diente in erster Linie der Verbreiterung der Zucht. Dazu wurden ein Weibchen und ein Männchen über längere Zeit in einem Käfig gehalten und die Jungtiere nach 21 Tagen geschlechterspezifisch getrennt abgesetzt. Im Vergleich dazu wurden Terminverpaarungen (TVP) bei der Verwendung spezifischer Embryonalstadien durchgeführt, wie sie bei der Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs, Abschnitt 2.2.2.6) erforderlich waren. Hierzu wurde das Männchen zur Reviermarkierung für drei Tage in einem Käfig gehalten, ehe das Weibchen dazugesetzt wurde. Die darauffolgenden vier Tage wurde eine „Plug-Kontrolle“ als Zeichen der Imprägnation durchgeführt und das Männchen wieder abgesetzt.

2.2.2.5 Isolierung von primären Astrozyten

Zur Anlage einer primären astroglialen Kultur wurden P1-P4 Tiere durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden die Kopfhaut als auch die Schädelkalotte in caudal-rostraler Schnittrichtung eröffnet und entfernt. Nach Entnahme des Gehirnes wurden die Meningen unter einem Binokular abgezogen und einzig die Großhirnhemisphären zur weiteren Isolierung verwendet. Alle Präparationsschritte wurden mit in 70 % (v/v) Ethanol desinfiziertem Präparationsbesteck und in Eis gekühltem Isolierpuffer durchgeführt. Die Großhirnhemisphären wurden mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und anschließend enzymatisch mit 2,5 % (v/v) Trypsin in HBSS, das mit 1 % (m/v) DNase I komplementiert wurde, für 30 min bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Nach jeweils 10 min wurde der Verdau zudem zusätzlich stufenweise mechanisch durch Pipettieren mit einer 5 ml Pasteurpipette bzw. 1 ml Eppendorfpipette geschert, ehe er durch ein Zellsieb der Maschenweite 40 µm filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit dem zweifachen Volumen MEM aufgefüllt und bei 1.300 g für 3 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Gliamedium 1 aufgenommen und auf drei mit Poly-L-Lysin beschichtete 6-Wellen je Gehirn verteilt (modifiziert nach Kaech und Banker, 2006). Nach 48 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂- sowie 3 % O₂-Athmosphäre wurde das Medium gegen Gliamedium 2 ausgetauscht und die Zellen bis zur experimentellen Verwendung darin kultiviert (Abschnitt 2.2.1.4).

2.2.2.6 Isolierung von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Zur Isolierung von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurden Terminverpaarungen (TVPs, Abschnitt 2.2.2.4) angesetzt, sodass die Embryonen am Embryonaltag E13.5 präpariert werden konnten. Dazu wurden die trächtigen Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und ihr Uterus entnommen. Aus diesem wurden die Embryos herauspräpariert und von Dottersack, Amnion und der Plazenta befreit. Dann wurde jedem einzelnen Embryo der Kopf abgetrennt, die Eingeweide entfernt und ein Schwanzbiopsat zur Genotypisierung genommen. Das verbleibende Gewebe wurde mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert und durch Auf- und Abpipettieren mit einer Eppendorf-Pipette zusätzlich geschert. Zuletzt wurde die Gewebssuspension in T25-Flaschen in DMEM (+/+) ausgesät und bei 37 °C sowie 5 % CO₂- und 3 % O₂-Atmosphäre bis zur Konfluenz kultiviert.

2.2.2.7 Perfusion

Um histologisch zu analysierende Gehirne vom Blut zu befreien und sie *in-situ* zu fixieren wurde bei den Versuchstieren eine Perfusion durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse narkotisiert und ihre Reflexe bis zur vollständigen Schmerzunempfindlichkeit mittels Testung des Zwischenzehenreflexes überwacht. Sobald die Tiere in tiefer Narkose und an den Extremitäten fixiert lagen, wurde deren

Thorax eröffnet und eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt, währenddessen der rechte Vorhof mit einer Präparationsschere aufgeschnitten wurde. Über die Kanüle wurde mit gleichmäßigem Druck zunächst PBS und anschließend zur Fixierung 4 % (m/v) Paraformaldehyd (PFA) oder 4 % (v/v) Formalin in PBS geleitet.

2.2.2.8 Herstellung von Kryopräparaten

Zur Untersuchung von Organen in der Immunhistochemie (Abschnitt 2.2.4.10) wurden Kryopräparate angefertigt, die sowohl eine Langzeitlagerung der Proben bei -80 °C ermöglichten als auch die Anfertigung von Gewebsschnitten erlaubten. Dazu wurden die präparierten Organe (Abschnitt 2.2.2.7) in TissueTek® O.C.T Compound (Sakura® Finetek Inc.) eingebettet und das Medium auf Trockeneis ausgehärtet. Anschließend konnten Schnitte am Kryotom mit einer Schichtdicke von 10-20 µm angefertigt werden, die auf Objektträger übertragen und für mehrere Stunden bei RT getrocknet wurden. Die Gewebsschnitte wurden bis zur Verwendung bei -30 °C gelagert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren (RNA, engl. *ribonucleic acid*) aus solidem Gewebe erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurde das in flüssigem Stickstoff zerstoßene Gewebe in 800 µl Trizol® Reagent (Invitrogen) aufgenommen und zur Entfernung grober Zellbestandteile für 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform überschichtet und mehrfach invertiert. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte zur Auftrennung der Phasen wiederum die Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4 °C. Anschließend wurde die oberste, RNA-haltige Phase abgenommen, mit 500 µl Isopropanol versetzt und zur Präzipitation der Nukleinsäure für 40 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g und 4 °C pelletiert und mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Dann wurde das Pellet an der Luft getrocknet und darauffolgend in 30 µl RNase-freiem ddH₂O für 10 min bei 58 °C gelöst. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Zur Isolierung von RNA aus Zellkulturen wurde das Gene Jet RNA Purification Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die isolierte Nukleinsäure wurde in 30 µl ddH₂O gelöst und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der isolierten RNA (Abschnitt 2.2.3.1, Abschnitt 2.2.3.2) als auch DNA (Abschnitt 2.2.3.12, Abschnitt 2.2.3.13) wurden Absorptionsmessungen am NanoDrop ND-1000 durchgeführt. Als Kriterium der Probenqualität wurde das Extinktionsverhältnis 260 nm/280 nm herangezogen. Eine reine RNA-Lösung war dabei durch einen Wert um 2,0 gekennzeichnet. Dieser lag bei der Präparation von DNA bei circa 1,8.

2.2.3.4 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA (Abschnitt 2.2.3.1, Abschnitt 2.2.3.2) wurde über eine reverse Transkription in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA in 10,5 µl ddH₂O gelöst, mit jeweils 1 µl Oligo(dT)₁₈ und *Random Hexamer* Primern versetzt sowie zum Schmelzen der Sekundärstrukturen auf 70 °C für 5 min erwärmt. Der Ansatz wurde nach kurzem Abkühlen auf Eis gemäß den unten aufgeführten Angaben komplementiert und im Thermocycler prozessiert.

Ansatz zur cDNA-Synthese		PCR-Programm		
RNA (1 µg in ddH ₂ O)	10,5 µl	Annealing	25 °C	10 min
Random Hexamer Primer	1,0 µl	Elongation	42 °C	60 min
Oligo(dT) ₁₈	1,0 µl	Denaturierung	70 °C	10 min
5x Reaction Buffer	4,0 µl	Lagerung	4 °C	
dNTPs (10 mM)	2,0 µl			
Ribolock RNase Inhibitor	0,5 µl			
Revert Aid Reverse Transcriptase	1,0 µl			

2.2.3.5 Restriktion

Zur hydrolytischen Spaltung von Vektoren oder DNA-Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die sequenzspezifisch schneiden und dadurch glatte (*blunt*) oder kohäsive (*sticky*) Enden hervorbringen. Die verwendeten Enzyme wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

beispielhafter Restriktionsansatz

Enzym 1	1	U
Enzym 2	1	U
10x Puffer	2,0	µl
DNA	1-5	µg
ddH ₂ O	ad	20 µl

2.2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung der Nukleinsäuren nach ihrer Größe erfolgte über nicht-denaturierende Agarosegelelektrophoresen. Dazu wurde Agarose in 0,5 % TBE-Puffer durch Erwärmen gelöst und in horizontale Gelkammern gegossen. Die anschließend mit Ethidiumbromid versetzte Lösung (0,2 µg/ml) verfestigte sich zu einer Matrix durch Abkühlung auf Raumtemperatur und wurde in ihrer Prozentigkeit gemäß der zu erwartenden Fragmentgröße gewählt.

Die DNA-haltigen Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Marker im elektrischen Feld bei einer konstanten Spannung von 100-120 V aufgetrennt. Zur Visualisierung der Fragmente anhand des in die DNA interkalierten Ethidiumbromides wurde UV-Licht eingesetzt.

DNA-Fragmente	Prozentigkeit (m/v)
> 3 kbp	0,5 %
500 bp – 3 kbp	1 %
< 500 bp	2 %

2.2.3.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das GeneJET Gel Extraction Kit nach Herstellerprotokoll verwendet. Die extrahierte DNA wurde in 30 µl ddH₂O eluiert und bei -20 °C gelagert. Ebenso wurden auch Restriktionsansätze mit Hilfe des benannten Kits aufgereinigt.

2.2.3.8 Dephosphorylierung geschnittener Vektoren

Zur Vermeidung der Selbstligation des Vektors wurde eine Dephosphorylierung unter Verwendung des Enzymes Fast AP (*alkaline phosphatase*) durchgeführt, das die Entfernung der freien 5'-Phosphatgruppen katalysiert. Dazu wurde 1 µl Fast AP direkt in den Restriktionsansatz pipettiert und dieser bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die enzymatische Inaktivierung wurde durch Erhitzen auf 80 °C gewährleistet.

2.2.3.9 Ligation

Zur Ligation von Vektor und Insert wurde die T4-DNA-Ligase genutzt. Dabei war der Ansatz je nach Vorlage von glatten (*blunt ends*) oder kohäsiven (*sticky ends*) Enden, die miteinander zu verbinden waren, unterschiedlich zusammengesetzt.

Ligationsansatz „glatte“ Enden		Ligationsansatz „kohäsive“ Enden	
Vektor: Insert	1:5	Vektor:Insert	1:5
10x T4 DNA Ligase Buffer	2,0 µl	10x T4 DNA Ligase Buffer	2,0 µl
50% PEG 4000	2,0 µl	T4 DNA Ligase	1 U
T4 DNA Ligase	2 U	ddH ₂ O	ad 20,0 µl
ddH ₂ O	ad 20,0 µl		

Zusätzlich wurde außerdem jeweils eine Kontrolle zur Überprüfung der Selbstligation des Vektors mitgeführt, die kein Insert enthielt. Grundsätzlich wurden alle Ligationsansätze für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, ehe die entstandenen Konstrukte in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 Blue eingebracht wurden (Abschnitt 2.2.3.11).

2.2.3.10 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* XL-1 Blue Bakterien wurde 1 l LB-Medium mit einer Vorkultur inokuliert (OD = 0,1) und die Bakterien bis zu einer OD von 0,5 - 0,6 bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Daraufhin wurde die Kultur 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (4.000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 50 mM CaCl₂-Lösung (eiskalt) resuspendiert und die Resuspension daraufhin für 20 min auf Eis gelagert. Diese Arbeitsfolge wurde zwei Mal wiederholt, wobei zwischen den Zentrifugationsschritten keine Lagerung auf Eis mehr erfolgte. Ferner wurde der Resuspensionslösung nun 10 % (v/v) Glycerol hinzugesetzt. Abschließend wurden die resuspendierten *E.coli* XL-1 Blue Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquoten wurden bei -80 °C gelagert und bei Bedarf zur Hitzeschocktransformation (Abschnitt 2.2.3.11) genutzt.

2.2.3.11 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Zum Einbringen von Vektoren in den gram-negativen Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) XL-1 Blue wurden Hitzeschocktransformationen durchgeführt. Dazu wurden chemisch-kompetente Bakterien (Abschnitt 2.2.3.10) auf Eis aufgetaut, mit dem Vektor bzw. Ligationsansatz versetzt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 s einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt und dann wiederum für 5 min auf Eis gelagert. Daraufhin wurden 700 µl LB-Medium zum Transformationsansatz hinzugefügt, der bei 750 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert wurde, ehe dessen Ausstrich auf Antibiotika-haltige LB-Agar-Platten erfolgte. Auf diesen Selektionsböden wurden Bakterienkolonien bei 37 °C über Nacht angezogen.

2.2.3.12 Präparation von extrachromosomaler, bakterieller DNA im Kleinmaßstab

Die Isolierung der extrachromosomalen Plasmid-DNA aus transfizierten *E. coli* XL-1 Blue Stämmen (Abschnitt 2.2.3.11) erfolgte unter Verwendung des GeneJET Plasmid Miniprep Kits nach den Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial der Präparation diente eine Flüssigkultur im Maßstab von 1,8 ml LB-Medium, das mit einem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion komplementiert, mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 750 rpm inkubiert wurde. Die isolierte DNA wurde in 50 µl ddH₂O gelöst und bei -30 °C gelagert.

2.2.3.13 Präparation von extrachromosomaler, bakterieller DNA im Großmaßstab

Um große Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen wurden Präparationen im Großmaßstab mit Hilfe des NucleoBond Xtra® Midi Kits durchgeführt. Dazu wurden 100 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm über Nacht schüttelnd inkubiert. Die isolierte DNA wurde in 200 µl ddH₂O gelöst und bei -30 °C gelagert.

2.2.3.14 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit klonierten Vektoren wurden von der Firma GATC Biotech sequenziert und sind im Anhang mit der Sequenz aufgelistet. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit den frei zugänglichen Programmen *Chromas™ Lite 2.1.1* (Technelysium Pty Ltd.) und BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Institutes of Health USA, Altschul *et al.*, 1990).

2.2.3.15 Quantitative real time PCR

Die Untersuchung der Expression verschiedener Gene auf RNA-Ebene erfolgte anhand von quantitativen *real time* PCRs (rtPCR). Diese wurden als technische Duplikate im 96- oder 384-Well-Format durchgeführt.

<i>real time</i> PCR-Ansatz		<i>real time</i> PCR-Programm		
cDNA (10 ng)	2,0 µl	Initiation	95 °C	10 min
SYBR Green	5,0 µl	Denaturierung	95 °C	10 s
Primer_forward (5 pmol/µl)	0,5 µl	Annealing	60 °C	20 s
Primer_reverse (5 pmol/µl)	0,5 µl	Elongation	72 °C	20 s
ddH ₂ O	2,0 µl	Schmelzkurve		
	Σ 10,0 µl			

Zur relativen Quantifizierung der Expression eines zu analysierenden Genes wurde ferner jeweils als Referenzkontrolle zur Normalisierung des C_p -Wertes die Expression des Haushaltsgenes Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Die relative Genexpression errechnete sich, wie folgt:

$$\text{Relative Genexpression} = \Delta C_p = C_{p, \text{Gen von Interesse}} - C_{p, \text{GAPDH}}$$

Da die Amplifikationsreaktion nicht linear, sondern exponentiell verläuft, kann eine Linearisierung über folgende Formel durchgeführt werden:

$$\text{Linearisierte relative Genexpression} = 2^{-(\Delta C_p)}$$

Damit ergibt sich zum Beispiel bei einer Differenz von 3,33 eine gegenüber dem Haushaltsgen 10-fach geringere Genexpression. Beim Vergleich zweier zu untersuchender Proben bezüglich der Änderung der Genexpression wurde die sog. $\Delta\Delta C_p$ -Methode verwendet:

$$\text{Linearisierte Expressionsänderung} = 2^{-(\Delta C_{p, \text{Probe 1}} - \Delta C_{p, \text{Probe 2}})}$$

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen

Standard

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden kultivierte Säugerzellen pelletiert (1.300 g, 3 min, RT), mit PBS gewaschen, in Lysispuffer 1 aufgenommen (6-Well: 50 μ l; 10 cm Schale: 100 μ l) und zur Abtrennung grober Zellbestandteile bei maximaler Drehzahl für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das als Überstand vorliegende Zelllysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung kurzzeitig auf Eis oder bei -30 °C gelagert.

Lysate für den RNase H Assay

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Analyse der RNase H Aktivität (Abschnitt 2.2.4.13) wurden die Zellen pelletiert (1.300 g, 3 min, RT), mit PBS gewaschen, in Lysispuffer 3 (10 cm Schale: 25 μ l) aufgenommen und für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde Lysispuffer 4 in äquivalentem Volumen hinzugesetzt und die Proben erneut für 10 min auf Eis gelagert. Zur anschließenden Entfernung grober Zellbestandteile erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei maximaler Drehzahl für 10 min bei 4 °C. Das als Überstand vorliegende Zelllysate wurde in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung kurzzeitig auf Eis oder bei -30 °C gelagert.

Lysate zur Analyse der Autophagie

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Analyse des Autophagieprozesses (Abschnitt 2.2.4.5 und Abschnitt 2.2.4.12) wurden die Zellen pelletiert (1.300 g, 3 min, RT), mit PBS gewaschen, in Lysispuffer 5 (10 cm Schale: 50 µl) aufgenommen und unter Verwendung eines Branson Sonifier 450 homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und zur Entfernung grober Zellbestandteile zentrifugiert (16.000 g, 10 min, 4 °C). Das als Überstand vorliegende Zelllysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung kurzzeitig auf Eis oder bei -30 °C gelagert.

2.2.4.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Geweben

Um aus Gewebeproben Proteinlysate herzustellen wurden diese zunächst in flüssigem Stickstoff gemörkert, zur Lyse der Zellen in Lysispuffer 2 (300 µl/ Gewebe) aufgenommen und für 1 h unter gelegentlichem starkem Vermischen auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte zur Abtrennung grober Gewebs- bzw. Zellbestandteile die Zentrifugation bei maximaler Drehzahl für 10 min bei 4 °C. Das als Überstand vorliegende Zelllysate wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung kurzzeitig auf Eis oder bei -30 °C gelagert.

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten (Abschnitt 2.2.4.1, Abschnitt 2.2.4.2) wurde das PierceTM BCA Protein Assay Kit verwendet. Dazu wurden die Lysate aus Geweben bzw. Säugerzellen 1:30 bzw. 1:5 mit dem verwendeten Lysispuffer verdünnt. Die verdünnten Proben als auch eine Standardreihe mit BSA in bekannter Konzentration wurden dann in einer 96-Well-Platte aufgetragen und nach Herstellerprotokoll mit Reagenzien komplementiert. Die Messung der Absorptionswerte erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm im Tecan *Spectra Rainbow* Reader nach 30 min Inkubation bei 37 °C.

2.2.4.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse erfolgte durch eine reduzierende, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Diese wurde mit Hilfe des Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell Systems von Biorad durchgeführt.

Dazu wurde zunächst das Trenngel in die Gelkammer gegossen und zur Ausbildung eines geraden, waagerechten Abschlusses sowie zum Schutz vor molekularem Sauerstoff, der den Kettenabbruch der Reaktion einleiten würde, mit Isopropanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Alkanol entfernt und stattdessen eine Überschichtung mit dem Sammelgel durchgeführt, in das der Probenkamm zur Ausbildung der Geltaschen gesetzt wurde.

Die aufzutrennenden Proben wurden dann gemäß den unten stehenden Angaben angesetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Ansätze auf Eis.

Zur Auftrennung wurden die Proben sowie ein Standard zur Bestimmung der molekularen Masse (Abschnitt 2.1.9) in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 90-150 V und wurde beendet, sobald die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

Ansatz zur Beladung der SDS-PAGE

5x Probenpuffer		6	µl
beta-Mercaptoethanol (1 M)		3	µl
Proteinlysat		x	µg
Lysispuffer	ad	30	µl

2.2.4.5 Westernblot

Zum Übertrag der mittels SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse separierten Proteine (Abschnitt 2.2.4.4) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurden Westernblots nach dem *Semi-Dry*-Verfahren mit Hilfe des Trans-Blot® Turbo™ Transfer System von Biorad durchgeführt.

Die elektrophoretische Übertragung erfolgte bei 25 V und 1 A unter Verwendung von Anoden- und Kathodenpuffer nach Herstellerangaben. Die Übertragungsdauer richtete sich nach der molekularen Masse des zu detektierenden Zielproteins.

Zielprotein	Übertragungsdauer
< 30 kDa	30 min
30 – 80 kDa	40 min
> 80 kDa	50 min

2.2.4.6 Immundetektion

Die Identifizierung auf eine PVDF-Membran übertragener Proteine (Abschnitt 2.2.4.5) erfolgte über ein immunologisches Detektionsverfahren. Dazu wurde die Membran zunächst in 5 % (m/v) Milchpulver in TBST zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h inkubiert, ehe sie zur Markierung spezifischer Epitope mit dem in 2 % (m/v) Milchpulver in TBST gelösten primären Anti-

körper bei 4 °C über Nacht rollend gelagert wurde. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Inkubation mit dem ebenfalls in 2 % (m/v) Milchpulver in TBST gelösten sekundären Antikörper für 1 h bei RT, der an den F_c-Teil des Primärantikörpers bindet und die Detektion über eine Chemilumineszenzreaktion aufgrund der Kopplung mit einer Peroxidase ermöglicht. Vor und nach diesem Schritt wurde die Membran zudem jeweils drei Mal für je 10 min mit TBST gewaschen. Die abschließende Detektion wurde nach einem einmaligen Waschschrift mit TBS für 5 min mit Hilfe des Super Signal West Pico bzw. Femto Kits gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.4.7 Stripping von Membranen

Um die spezifische Detektion unterschiedlicher Proteine durch Nutzung weiterer, primärer Antikörper im Immunblot zu ermöglichen, wurden bereits gebundene Antikörper durch Inkubation der Membran in *Stripping*-Puffer für 30 min bei RT entfernt. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit TBST für jeweils 10 min, ehe die PVDF-Membran gemäß Abschnitt 2.2.4.6 weiterprozessiert wurde.

2.2.4.8 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden am BD *Biosciences FACS Canto Flow Cytometer* vorgenommen und mit Hilfe der Software *FCS Express V3 Research Edition* (De Novo Software) ausgewertet und visualisiert. Die Zellen wurden am Ende jeder unten aufgeführten Färbung mit 1 % (m/v) BSA in PBS gewaschen und in selbiger Waschlösung zur Analyse am Instrument resuspendiert.

Färbung einzelsträngiger DNA

Zum Nachweis von ssDNA wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, anhand derer eine Quantifizierung der in der Immunzytochemie beobachteten Effekte erfolgte. Die Durchführung der Fluoreszenzfärbung entsprach dem Vorgehen von auf Deckgläschen fixierten Zellen (Abschnitt 2.2.4.9), wurde aber in diesem Fall an zuvor trypsinisierten Zellen vorgenommen. Zur Verifizierung der Spezifität des Antikörpers wurden die defizienten Primärzellen zusätzlich nach der Fixierung mit der ssDNA degradierenden Nuklease S1 behandelt. Dazu wurden die Zellen mit 10 U/ml Enzym in FACS-Puffer bei 37 °C für 15 min inkubiert.

EdU-Assay

Zur Analyse des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase wurde das *Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit* nach Herstellerprotokoll verwendet. Dieses beruht auf der Inkorporation des Nukleosid-Analogons 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) in den neu-synthetisierten DNA-Strang

während der S-Phase. Dazu wird das Analogon für eine definierte Zeitspanne dem Kulturmedium der zu untersuchenden Zellen zugesetzt (Puls). Der Assay basiert auf der *Click-iT* Reaktion, bei der eine Kupferionen katalysierte Zyklisierung zwischen Ethynylgruppe und Fluorophor-gekoppeltem Picolylazid stattfindet.

Färbung von DNA-Schäden

Um festzustellen, ob Doppelstrangbrüche in Primärzellen vorlagen, wurden durchflusszytometrische Messungen gegen das phosphorylierte Histon H2A.X als Marker durchgeführt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, in 4 % (m/v) PFA in PBS für 20 min fixiert, mit *saponin-based permeabilisation & wash reagent* (Bestandteil des Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit, Invitrogen) für 15 min permeabilisiert, in 1 % BSA (m/v) in PBS für 15 min blockiert und abschließend mit FITC gekoppeltem Antikörper für 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Zellzyklus-Analyse

Zur Analyse der prozentualen Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzykluses wurde der EdU Assay erweitert und eine zusätzliche Färbung der DNA zur Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Hilfe des *SYTOX AADvanced dead cell stain solution* Kit nach Herstellerangaben vorgenommen.

2.2.4.9 Immunzytochemie

Für alle immunzytochemischen Färbungen mit Ausnahme der Analyse der beta-Galaktosidase Aktivität wurden die Zellen in 60-80 % Konfluenz auf Glas-Deckgläschen (18x18 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG) ausgesät. Im Falle der Analyse von Astrozyten wurden diese Deckgläschen zuvor mit poly-L-Lysin beschichtet (Abschnitt 2.2.1.5).

Am Ende der aufgeführten Fluoreszenz-basierten Färbungen wurden die Deckgläschen kurz in destilliertem Wasser geschwenkt und mit ImmuMount® (Thermo Fisher Scientific) eingedeckelt, das zur Gegenfärbung der Zellkerne mit 5µg/ml 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma Aldrich) versetzt und bei 4 °C über Nacht ausgehärtet wurde.

Die Begutachtung als auch photographische Dokumentation wurde je nach Fragestellung am *Axiovert 200* Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss oder dem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop *FV1000* der Firma Olympus vorgenommen und unter Nutzung der Computerprogramme *Axio Vision Release 4.8 digital* (Zeiss), *Adobe Photoshop CS4 extended* Version 11.0.2 (Adobe Systems Incorporated) und *ImageJ* Version 1.47 (National Institutes of Health USA) visualisiert und bearbeitet.

Standardfärbung

Um das Vorhandensein als auch die subzelluläre Lokalisation von Proteinen als auch Nukleinsäuren zu analysieren wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen mit einem Methanol-Aceton-Gemisch (1:2, eiskalt) für 10 min und zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierungslösung 2 bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Lösung diente ebenso der Verdünnung des primären Antikörpers, der direkt am darauffolgenden Tag auf die Zellen für 4 h bei RT aufgetragen und dessen ungebundener Anteil anschließend durch Waschschriffe mit PBS entfernt wurde. Dann wurden die fixierten Zellen mit dem in PBS gelösten, sekundären Antikörper für 2 h benetzt, der spezifisch an den F_c-Teil des Primärantikörpers bindet und mit einem Fluorophor gekoppelt vorliegt.

Färbung von einzelsträngiger DNA

Um einzelsträngige (ss), zytoplasmatische DNA nachzuweisen wurden Fluoreszenzfärbungen durchgeführt, bei denen die Fixierung der auf Deckgläschen zuvor ausgesäten Zellen mit Fixierlösung 2 für 2 d bei -30 °C erfolgte. Daraufhin wurden die Zellen nacheinander mit 1 % (m/v) BSA in PBS für 15 min blockiert und mit anti-ssDNA Antikörper in PBS sowie anti-mouse Alexa Fluor IgM 488 Antikörper in PBS für jeweils weitere 15 min bei RT inkubiert.

Färbung neu-synthetisierter DNA

Zur Visualisierung neu-synthetisierter DNA wurde dem Medium der auf Deckgläschen ausgesäten Primärzellen 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) in einer Endkonzentration von 5 µM zugesetzt. Die Zellen wurden daraufhin für 24 h bei 37 °C in einem Inkubator gelagert und anschließend durch Behandlung mit Fixierlösung 1 für 10 min fixiert. Die Färbung erfolgte unter Verwendung des *Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kits* nach Herstellerprotokoll.

Färbung zum Nachweis der sauren beta-Galaktosidase

Zur Untersuchung der Expression der lysosomalen beta-Galaktosidase wurden Färbungen unter Verwendung des Senescence Detection Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Zellen jedoch direkt im 6-Well bearbeitet und nicht vorher auf Deckgläschen ausgesät. Das Prinzip dieses Aktivitätsassays beruht auf einer Substratumsatzreaktion, bei der X-Gal durch das lysosomale Enzym im sauren Milieu (pH = 6,0) in einen blauen Farbstoff umgesetzt wird.

Die Dokumentation der Farbreaktion erfolgte mit Hilfe des Mikroskops *Telaval 31* und unter Nutzung des Computerprogrammes *Adobe Photoshop CS4 extended* Version 11.0.2 (Adobe Systems Incorporated).

2.2.4.10 Immunhistochemie

Ein Großteil der immunhistologischen Untersuchungen wurde extern durch Kooperationspartner durchgeführt, die namentlich mit ihrer Institution sowie dem Anteil am Experiment im Ergebnisteil und im Anhang aufgeführt wurden.

Die Begutachtung als auch photographische Dokumentation der HE- und DAB-Färbungen wurde unter Nutzung des Computerprogrammes *NDP NanoZoomer Digital Pathology* (Hamamatsu) vorgenommen.

Die Begutachtung als auch photographische Dokumentation der Fluoreszenzfärbungen wurde am konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop *FV1000* der Firma Olympus vorgenommen und unter Nutzung der Computerprogramme *Adobe Photoshop CS4 extended* Version 11.0.2 (Adobe Systems Incorporated) und *ImageJ* Version 1.47 (National Institutes of Health USA) visualisiert und bearbeitet.

Die Dokumentation der beta-Galaktosidase-Färbung erfolgte mit Hilfe des Mikroskops *Telaval 31* und unter Nutzung des Computerprogrammes *Adobe Photoshop CS4 extended* Version 11.0.2 (Adobe Systems Incorporated).

Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Zur morphologischen Begutachtung von murinen Gehirnen des GFAP_Cre_H2B-Stammes wurden Hämatoxylin- und Eosin (HE)-Färbungen an Formalin-fixierten Schnitten (Abschnitt 2.2.2.7) durchgeführt, bei denen zwei Farbstoffe mit unterschiedlicher Bindungsaffinität verwendet wurden. Während Hämatoxylin als basischer Farbstoff vor allem an basophile Biomoleküle (DNA, RNA, raues ER *etc.*) bindet, lagert sich Eosin als saurer Farbstoff an acidophile Biomoleküle (Mitochondrien, Zellplasmaproteine, glattes ER, *etc.*) vor allem des Zytoplasmas an.

Die Durchführung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Glatzel (Institut für Neuropathologie, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) wie unter Altmeyen *et al.*, 2015 beschrieben.

DAB-Färbung

Zur spezifischen Analyse der Expression eines Proteins im murinen Gehirn der GFAP_Cre_H2B-Tiere wurden 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbungen an Formalin-fixierten, entparaffinierten Schnitten (Abschnitt 2.2.2.7) im Färbeautomat *Benchmark XT* (Ventana) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Glatzel (Institut für Neuropathologie, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde nach Protokollen gemäß Altmeyen *et al.*, 2015 verfahren.

Fluoreszenzfärbungen

Alternativ zu DAB-Färbungen wurden Fluoreszenzfärbungen an PFA-fixierten Kryoschnitten von murinen Gehirnen des GFAP_Cre_H2B-Stammes (Abschnitt 2.2.2.7) in der Arbeitsgruppe von Paul Saftig in Kooperation mit Dr. Markus Damme (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland) durchgeführt. Diese erfolgten prinzipiell gemäß den Angaben der Immunzytochemie (Abschnitt 2.2.4.9) und sind in Damme *et al.*, 2015 beschrieben.

Färbung zum Nachweis der sauren beta-Galaktosidase

Zur Untersuchung der Expression der lysosomalen beta-Galaktosidase wurden Färbungen unter Verwendung des Senescence Detection Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden jedoch keine fixierten, sondern native Gehirne des GFAP_Cre_H2B-Stammes in Form von Kryoschnitten (Abschnitt 2.2.2.8) verwendet.

2.2.4.11 ELISA

Um die Konzentration der Proteine IL-6 und KC in den Überständen des Kulturmediums einer Zellpopulation zu bestimmen, wurden ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) der Firma R&D gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationen wurden auf die Zellzahl (Abschnitt 2.2.1.6) normiert.

2.2.4.12 Beta-Hexosaminidase-Assay

Um eine Aussage über die enzymale Aktivität der lysosomalen β -Hexosaminidase treffen zu können, wurde der Substratumsatz des Enzyms bestimmt. Dazu wurden die murinen Zellen in Lysispuffer 5 unter Verwendung eines Branson Sonifier 450 homogenisiert, das Gesamtlysat für 30 min auf Eis inkubiert und zur Entfernung grober Zellbestandteile zentrifugiert (16.000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurden 10 mM p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid (Sigma Aldrich) gelöst in Zitratpuffer hinzugegeben und eine Inkubation für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Stopp-Lösung (0,4 M Glycin, pH 10,4) beendet und die Absorption bei 405 nm nach Zentrifugation (16.000 g, 10 min) gemessen. Die Messwerte wurden auf die Proteinkonzentration (Abschnitt 2.2.4.3) normalisiert.

Der Aktivitätsassay wurde in Kooperation mit M.Sc. Sönke Rudnik der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Saftig (Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland) durchgeführt.

2.2.4.13 RNase H Assay

Um die Aktivität der RNase H2 zu bestimmen wurde ein Fluoreszenz-basierter Assay gemäß Reijns *et. al.*, 2011 durchgeführt. Dieser basiert auf der Hydrolyse von spezifischen, doppelsträngigen (ds) Substraten, die sowohl Quencher (DABCYL) als auch Fluorophor (Fluorescein) aufweisen, welche nach enzymatischer Prozessierung in keiner räumlichen Nähe mehr zueinanderstehen, sodass ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Als Substrate dienen RNA:DNA-Hybride, die sowohl von RNase H1 als auch H2 degradiert werden können (RNase H Aktivität), dsDNA mit einem rNMP (RNase H2 und DNase Aktivität) sowie dsDNA (DNase Aktivität). Jeder Ansatz wird zur Vergleichbarkeit mit der identischen, finalen Proteinkonzentration von 100 µg/µl durchgeführt. Ein relatives Maß für die Aktivitäten ergibt sich nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz wie folgt:

RNase H Aktivität: $RFU_{\text{RNA:DNA}}$

RNase H2 (RER) Aktivität: $RFU_{\text{dsDNA+rNMP}} - RFU_{\text{dsDNA}}$

2.2.5 Densitometrie

Zur densitometrischen Auswertung der Banden der Immunblots (Abschnitt 2.2.4.6) wurde das Programm *ImageJ* Version 1.47 (National Institutes of Health USA) verwendet. Dabei wurde zunächst der Hintergrund unter Verwendung der Funktion „Subtract Background“ reduziert und anschließend die quadratisch markierten Banden bezüglich ihrer Fläche und Intensität ausgelesen und als Densitogramme dargestellt, deren Integrale computergestützt berechnet wurden. Die erhaltenen Werte der Banden der Proteine wurden letztlich gegen die Werte der Banden der Ladungskontrolle normalisiert und unter der Bedingung, dass die Kontrolle 100 % entspricht, prozentual aufgeschlüsselt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der aufgenommenen Messwerte wurde sowohl der Mittelwert (MW) als auch der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgehend von einer Stichprobe aus mindestens drei unabhängigen Proben berechnet. Zudem wurde je nach Fragestellung die statistische Auswertung über einen studentischen T-TEST oder ANOVA (*analysis of variances*) zur Ermittlung der Signifikanzen, deren Grenzen bei 5 % (* $p < 0,05$), 1 % (** $p < 0,01$) und 0,1 % (***) $p < 0,001$) gesetzt wurden, durchgeführt. Dazu wurde das Programm *GraphPad Prism*® Version 5.03 (GraphPad Software Inc.) genutzt.

3. ERGEBNISSE

Die RNase H2 ist ein essentielles Enzym während der Entwicklung und adulten zellulären Homöostase höherer Eukaryoten (Reijns *et al.*, 2012; Mackenzie *et al.*, 2016). Mutationen in ihren Untereinheiten sind mit dem Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) assoziiert und führen bereits im Kindesalter zu schweren klinischen Symptomen, die aufgrund mangelnder Kenntnisse der Pathogenese bisher nicht kausal therapiert werden können (Rigby *et al.*, 2007). Daher war es von besonderem Interesse die Folgen der RNase H2-Defizienz in verschiedenen murinen Modellen zu analysieren. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Aufklärung der molekularen Prozesse auf *in-vitro*-Ebene, anhand derer therapeutische Optionen diskutiert und ggf. getestet werden sollten. Ein weiterer Schwerpunkt bestand in der Etablierung und Charakterisierung eines murinen *in-vivo*-Modells sowie der Bewertung dieses Systems im Hinblick auf die Nachstellung des AGS-Phänotyps und der damit verbundenen Nutzbarkeit als Krankheitsmodell. Aufgrund der embryonalen Letalität wurden konditionale *Knock-out*-Systeme genutzt (Reijns *et al.*, 2012; Hiller *et al.*, 2012), die auf dem Cre-loxP-System beruhen und eine gezielte Defizienz in definierten Zellarten erlaubten.

3.1 *In-vitro*-Basischarakterisierung der RNase H2-Defizienz im murinen, induzierbaren *Knock-out*-System

Die RNase H2 ist aufgrund ihrer Bindung an das Ringklemmenprotein PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und der Korrekturlese (*proof-reading*)-Eigenschaft zur Entfernung fehlerhaft eingebauter Ribonukleotide (rNMPs) während der DNA-Replikation eng mit dem Zellzyklus verbunden, der bei Abwesenheit der Nuklease grundlegend gestört ist (Günther *et al.*, 2015). Diese für den Organismus essentielle Funktion spiegelt die embryonale Letalität der RNase H2-defizienten Mäuse wider, deren Entwicklung bereits im Gastrulationsstadium aufgrund genomischer Instabilität bedingt durch die erhöhte Rate inkorporierter rNMPs in die DNA endet (Reijns *et al.*, 2012; Hiller *et al.*, 2012). Um daher die Folgen der RNase H2-Defizienz auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, wurde ein konditionales murines *Knock-out*-System gewählt, das die zeitlich definierte Induktion der Cre-Rekombinase vermittelten Deletion des von *loxP-sites* eingeschlossenen Genlokus erlaubte.

3.1.1 Zucht des induzierbaren, konditionalen *Knock-out*-Stammes CreERT_H2B

Zur Generierung eines induzierbaren murinen RNaseH2B *Knock-out*-Stammes wurden die Linien RNaseH2B_flox (Rnaseh2b^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/J}) und CreERT (*B6.Cg-Tg(cre/Esr1)^{5Ame}/J*) miteinander gekreuzt (Abb. 7A/B). Die Zuordnung der Genotypen erfolgte mit Hilfe von Genotypisierungs-PCRs

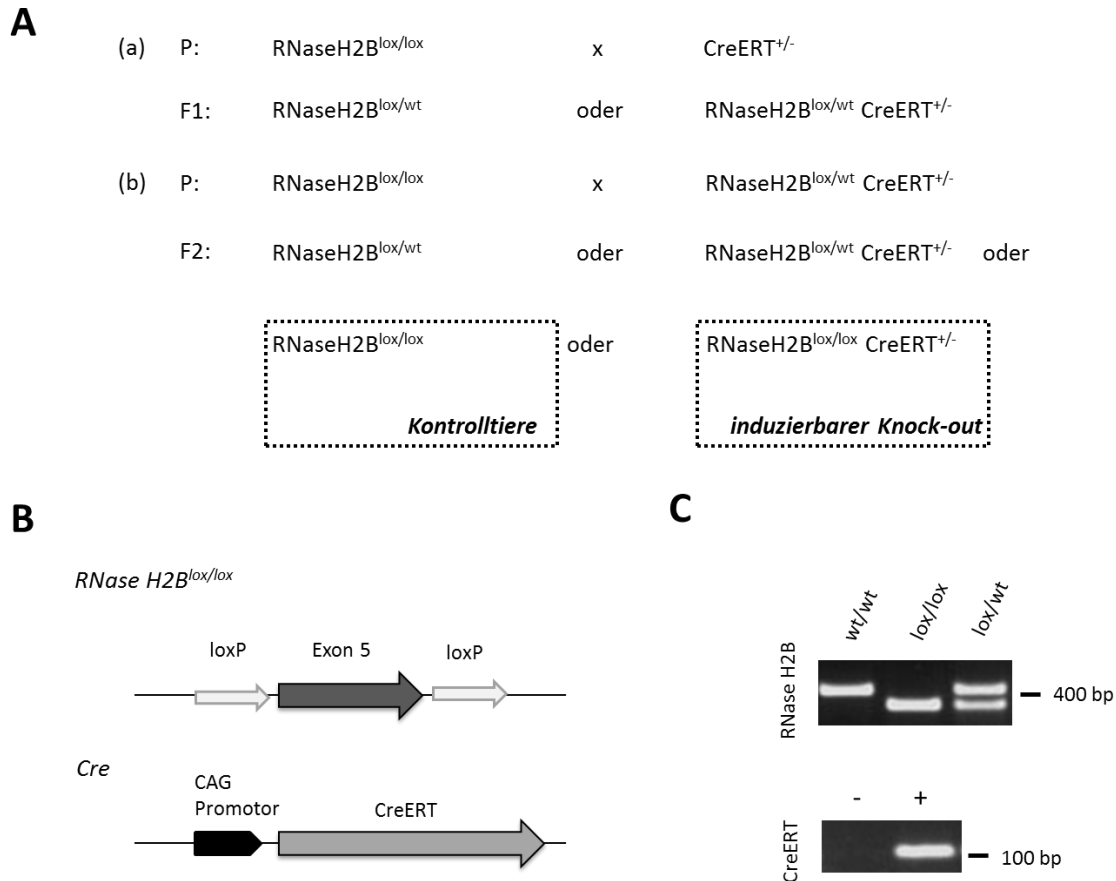


Abb. 7 Zucht des induzierbaren *Knock-out*-Stammes CreERT_H2B.

(A) Verpaarungsschemata zur Zucht des induzierbaren RNaseH2B-*Knock-outs* mit Darstellung der Genotypen der Parental- (P) und Filialgenerationen (F1 bzw. F2); alle folgenden Generationen (> F2) basierten auf Geschwisterverpaarungen. (B) Aufbau der transgenen Genbereiche des RNaseH2B_flox- sowie CreERT-Stammes wie unter Abschnitt 2.1.16 beschrieben. (C) Fotografische Dokumentation der Fragmente der Genotypisierungs-PCRs, die mittels Agarosegelelektrophorese (2 % Matrix) aufgetrennt, mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert und bezüglich ihrer Länge (Basenpaar, bp) qualitativ untersucht wurden; RNaseH2B_flox-Fragment wt: 420 bp tg: 390 bp; CreERT-Fragment: 100 bp.

auf den Lysaten der Schwanzbiopsate, wobei ein gefloxtes Allel eine Bande in Höhe von 390 bp und ein Wildtyp-Allel eine Bande in Höhe von 420 bp aufwies. Das CreERT-Transgen war als Amplifikat von 100 bp eindeutig identifizierbar (Abb. 7C).

3.1.2 Induzierbare RNase H2-Defizienz in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Zur Untersuchung der Folgen der RNase H2-Defizienz auf zellulärer Ebene wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) aus Embryonen einer Terminverpaarung der F2-Generation des CreERT_H2B-Stammes am embryonalen Tag E13.5 isoliert. Die Kulturen des Genotyps RNaseH2B^{lox/lox} dienten in allen weiteren Versuchen als Kontrollgruppe (abgekürzt als CreERT^{-/-}),

deren Charakteristika im Vergleich zu den Primärkulturen des Genotyps $RNaseH2B^{lox/lox}$ $CreERT^{+/-}$ (abgekürzt als $CreERT^{+/-}$) begutachtet wurden. In den $CreERT^{+/-}$ MEFs lag die Cre-Rekombinase als Fusionsprotein in Kombination mit dem Östrogenrezeptor vor, dessen Translokation in den Zellkern durch Zusatz des synthetischen Liganden 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induziert werden konnte. Aufgrund dieser Lokalisationsänderung war die Cre-Rekombinase befähigt das im Zellkern codierte und von *loxP-sites* flankierte 5. Exon des *RNaseH2B*-Genes herauszuschneiden (Abb. 8).

Die Effizienz des *RNaseH2B-Knock-outs* wurde drei als auch zehn Tage nach Zusatz des Induktors auf Proteinebene analysiert. An beiden Untersuchungszeitpunkten konnte keine Bande in Höhe von 34,7 kDa in den Gesamtzelllysaten der $CreERT^{+/-}$ -Kulturen im Immunblot detektiert werden, die dem Molekulargewicht der Untereinheit B entsprochen hätte. Diese war jedoch in den $CreERT^{-/-}$ -Lysaten deutlich ausgeprägt (Abb. 9A). Als Kontrollen dienten p53-defiziente $RNaseH2B^{+/+}$ - und $^{-/-}$ -MEFs, die von Andrew P. Jackson (MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, UK) zur Verfügung gestellt wurden (Abschnitt 3.1.21).

Als zusätzlichen Nachweis für die Abwesenheit der Nuklease wurden immunzytochemische Färbungen drei Tage nach Zusatz von 4-Hydroxytamoxifen durchgeführt. Hierbei wiesen einzig die Cre-negativen Kontrollzellen Fluoreszenzsignale im nukleären Bereich auf, während diese Signale in den induzierten $CreERT^{+/-}$ -Primärzellen fehlten (Abb. 9B). Als Negativkontrolle dienten $CreERT^{-/-}$ -Zellen, die nur mit dem sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper behandelt wurden und keine spezifische Signalgebung am Mikroskop aufwiesen (Anhang A1). Alle Aufnahmen wurden zur Vergleichbarkeit bei konstanter Belichtungsdauer und Laserintensität aufgenommen.

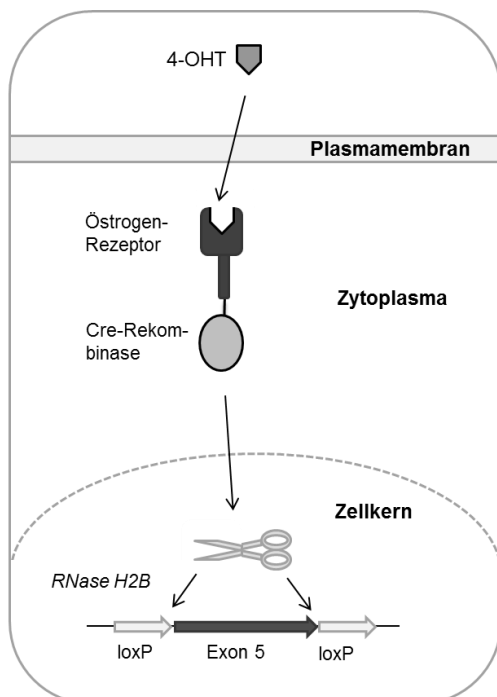


Abb. 8 Funktionsweise des Induktionssystems.

Der Induktor 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) wird als Zellmembran-permeables Östrogenderivat von der Zelle aufgenommen und bindet an den Östrogenrezeptor im Zytosol, der als Fusionsprotein mit der Cre-Rekombinase exprimiert vorliegt und in den Zellkern transloziert. Dort schneidet die Cre-Rekombinase das mit *loxP-sites* flankierte fünfte Exon des *RNase H2B* Genes heraus.

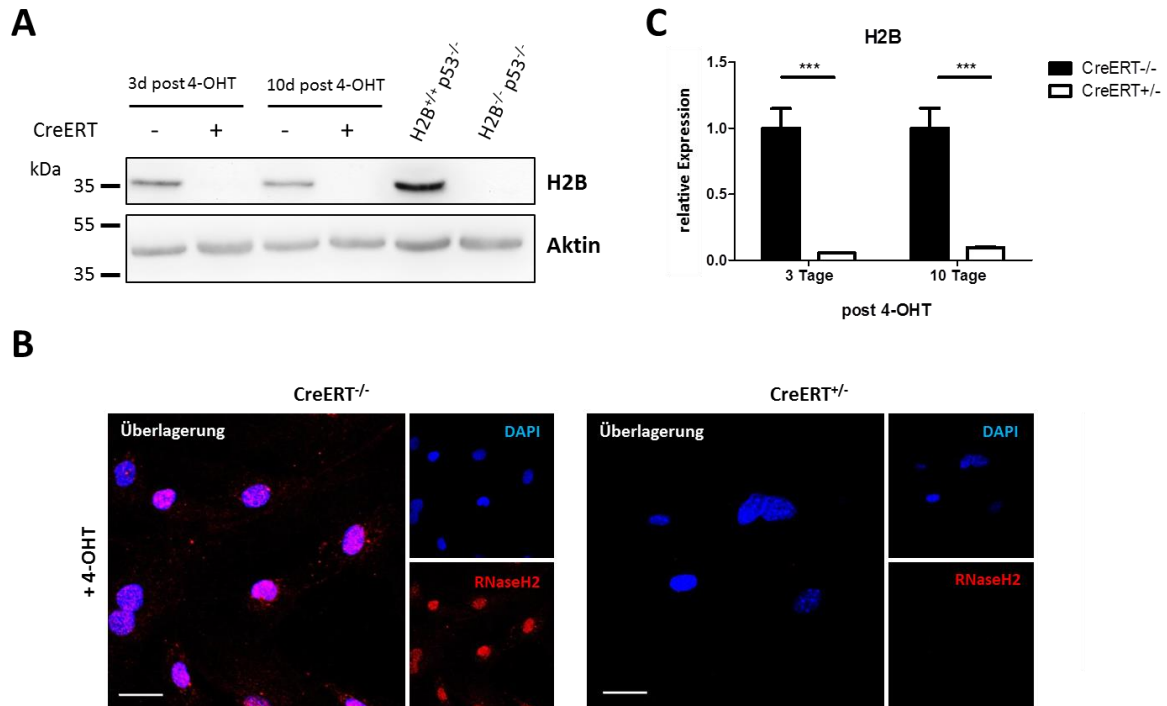


Abb. 9 Verifizierung des 4-OHT induzierbaren RNaseH2B-Knock-outs.

(A) Repräsentativer Immunblot der 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induzierten CreERT^{-/-} bzw. ^{+/-}-MEFs 3 d und 10 d nach Induktion sowie p53 defizienter H2B^{+/-} bzw. ^{-/-}-MEFs als Kontrolle gegen die murine RNaseH2B-Untereinheit (34,7 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n= 3). (B) Repräsentative immunzytochemische Färbung der CreERT^{-/-} bzw. ^{+/-}-MEFs gegen die RNaseH2 (Cy3, rot) 3 d post 4-OHT mit Gegenfärbung des Nukleus (DAPI, blau), Maßstab 30 µm (n= 3). (C) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der RNaseH2B-Untereinheit der CreERT^{-/-} (x = 1) gegenüber den CreERT^{+/-}-MEFs 3 d und 10 d post Induktion via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM, 2-WAY-ANOVA, Bonferri Posttest, *** p < 0,001 (n= 4).

Um ferner zu analysieren, ob die deutlich reduzierte Proteinexpression der Untereinheit B auf einer ebenso verminderten RNA-Menge beruhte, wurde cDNA des Genes in den MEFs anhand einer *real time* PCR quantifiziert. Das zu messende Amplifikat überspannte einen Bereich von Exon 7 bis Exon 9 und zeigte in den CreERT^{+/-}-Primärzellen gegenüber den Kontrollzellen eine deutliche, hoch signifikante Minderung in der Expression (Abb. 9C).

3.1.3 Abbau der Untereinheit B der RNase H2 über das Ubiquitin-Proteasom-System

Um ein besseres Verständnis über den Abbauprozess der Untereinheit B der RNase H2 zu erhalten, wurde zunächst die Kinetik der Degradation betrachtet, d.h. die nach Induktion detektierbare Proteinmenge über die Zeit. Dabei zeigte sich im Immunblot, dass einen Tag nach Zusatz von 4-Hydroxytamoxifen eine deutliche Reduktion der Proteinmenge gegenüber der nicht induzierten Kontrolle sichtbar war. Des Weiteren konnte 48 h nach der Induktion nahezu keine Bande in Höhe der

RNaseH2B-Untereinheit detektiert werden, die am dritten und vierten Untersuchungstag gänzlich fehlte (Abb. 10A). Dieser Verlauf spiegelte sich ebenso auf der Transkriptionsebene der Untereinheit B der Ribonuklease H2 wieder (Abb. 10B).

Um festzustellen, ob der proteolytische Abbau auf Proteinebene über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder den lysosomalen Abbauweg stattfindet, wurden Inhibitoren 24 h nach der Induktion mit dem Östradiolderivat 4-OHT für einen Zeitraum von weiteren 24 h zugesetzt. Bei MG132 (Carbobenzoxy-Leu-Leu-Leucinal) handelt es sich um ein Membran-permeables Peptid-aldehyd, das die proteolytische Aktivität des 26S Proteasom-Komplexes blockiert (Han *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wirkt Ammoniumchlorid (NH₄Cl) als Inhibitor des lysosomalen Proteinabbaus durch die Erhöhung des pH-Wertes im Kompartiment (Hart *et al.*, 1983).

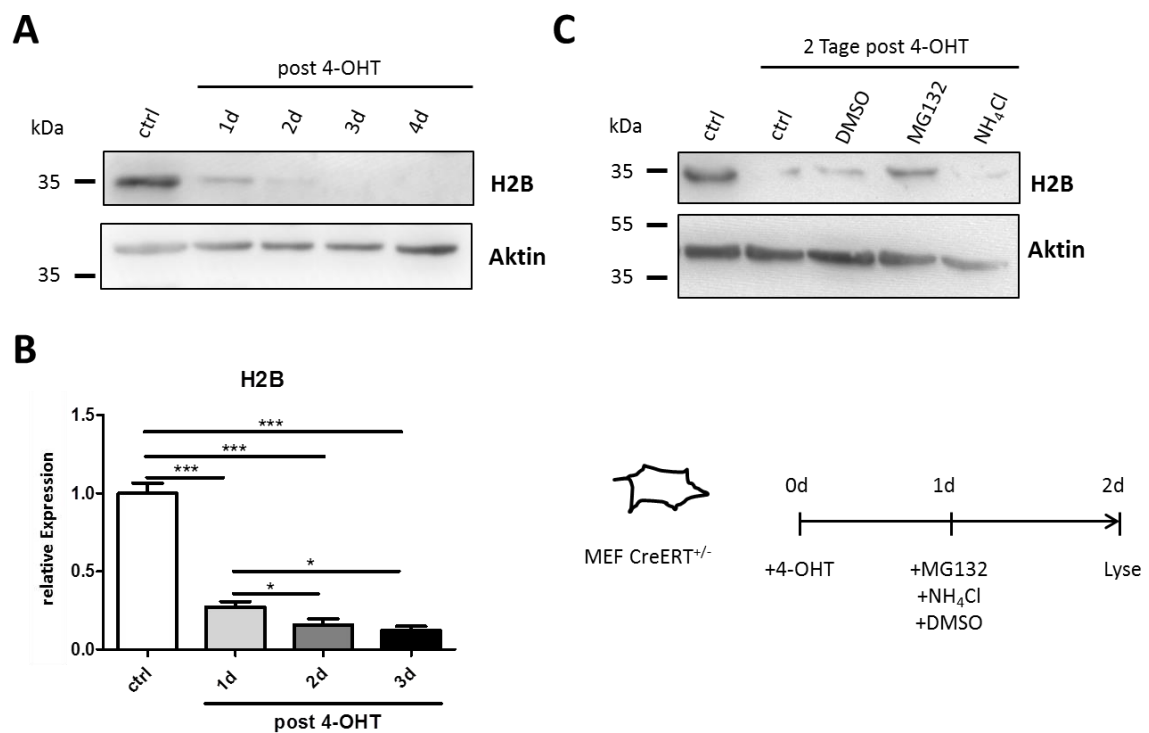


Abb. 10 Abbau der RNaseH2B-Untereinheit.

(A) Repräsentativer Immunblot von Gesamtzelllysaten nicht induzierter (ctrl, DMSO) und 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induzierter (1-4 d post) CreERT^{+/-}-Zellen gegen die RNaseH2B-Untereinheit (34,7 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n = 2). (B) Vergleich der Transkription (2^{ΔΔCp}) nicht induzierter (ctrl, DMSO; x = 1) gegenüber 4-OHT induzierter (1-3 d post) CreERT^{+/-}-MEFs bezüglich der Untereinheit B der Ribonuklease H2; Normalisierung gegen GAPDH, (n = 3), Mittelwert ± SEM, 1-WAY-ANOVA, *** p < 0,001 und * p < 0,05. (C) Repräsentativer Immunblot nicht induzierter (ctrl, DMSO) und für 2 d 4-OHT induzierter CreERT^{+/-}-MEFs, die zusätzlich an Tag 1 post Induktion für 24 h mit DMSO, MG132 (4 μM) oder Ammoniumchlorid (NH₄Cl, 50 mM) behandelt wurden, gegen die RNaseH2B-Untereinheit (34,7 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n = 2); schematische Darstellung des Versuchablaufs unterhalb des Immunblots aufgeführt.

Die behandelten Zellen wurden als Gesamtzelllysate mittels Immunblot gegen die Untereinheit B analysiert, wobei einzig die Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems zur Detektion einer gegenüber der induzierten Kontrolle verstärkten Bande in der Höhe des Molekulargewichtes der RNaseH2B führte (Abb. 10C).

3.1.4 Verstärktes Auftreten geschädigter DNA in RNase H2-defizienten MEFs

Die Abwesenheit der RNase H2 konnte bereits mit dem verstärkten Auftreten von DNA-Schäden in embryonalen Geweben der RNase H2^{null} Mäuse assoziiert werden (Reijns *et al.*, 2012). Daher wurde dieser Befund ebenso in den induzierbaren MEFs analysiert.

Dazu wurden Gesamtzelllysate auf die Phosphorylierung des Histons H2A.X an Position S139 getestet, die im Zuge der DNA-Schadensantwort auf Doppelstrangbrüche (DSB) auftritt (Rogakou *et al.*, 1998). Die primären CreERT^{+/-}-Kulturen zeigten drei Tage nach Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen im Gegensatz zu den CreERT^{-/-}-Zellen eine deutliche Bande im Immunblot, die dem Molekulargewicht des DNA-Schadenmarkers entsprach. Zur Verifizierung der Spezifität des Antikörpers und der detektierten Banden wurden gleichfalls Kontrollzellen mit dem Topoisomerase II-Hemmer Doxorubicin behandelt und deren Gesamtzelllysate als Positivkontrolle auf das phosphorylierte Histon untersucht. Die behandelten Zellen zeigten eine deutliche Signalgebung auf Höhe derer der defizienten Zellen (Abb. 11A).

Ferner konnte die verstärkte Last an Doppelstrangbrüchen mittels immunzytochemischer Färbungen belegt werden. So wurden bei der mikroskopischen Begutachtung der Immunfluoreszenzen gegen pH2A.X drei Tage nach Induktion vermehrt Zellen mit nukleärer, punktueller Signalgebung in der defizienten Zellpopulation detektiert, währendd diese nur sehr vereinzelt in den CreERT^{-/-}-Kulturen zu sehen waren. Als Positivkontrolle dienten mit dem Topoisomerase I-Hemmer Cytosin-β-D-Arabinofuranosidhydrochlorid (AraC) behandelte Zellen, die eine sehr starke Fluoreszenz im Bereich des Zellkernes aufwiesen. Diese fehlte gänzlich in den nur mit sekundärem Antikörper inkubierten Proben (Anhang A1). Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit aller mikroskopischen Aufnahmen wurde bei identischer Belichtungsdauer und Laserintensität gearbeitet (Abb. 11C).

Die vorangegangenen Ergebnisse wurden zusätzlich mittels durchflusszytometrischer Messungen verifiziert. Als Kontrolle dienten ungefärbte CreERT^{-/-}-Zellen, deren gegen pH2A.X gefärbte Äquivalente im Histogramm nahezu überlagerten. Im Vergleich dazu wiesen die CreERT^{+/-}-Kulturen eine stärkere Fluoreszenz auf (Abb. 11B).

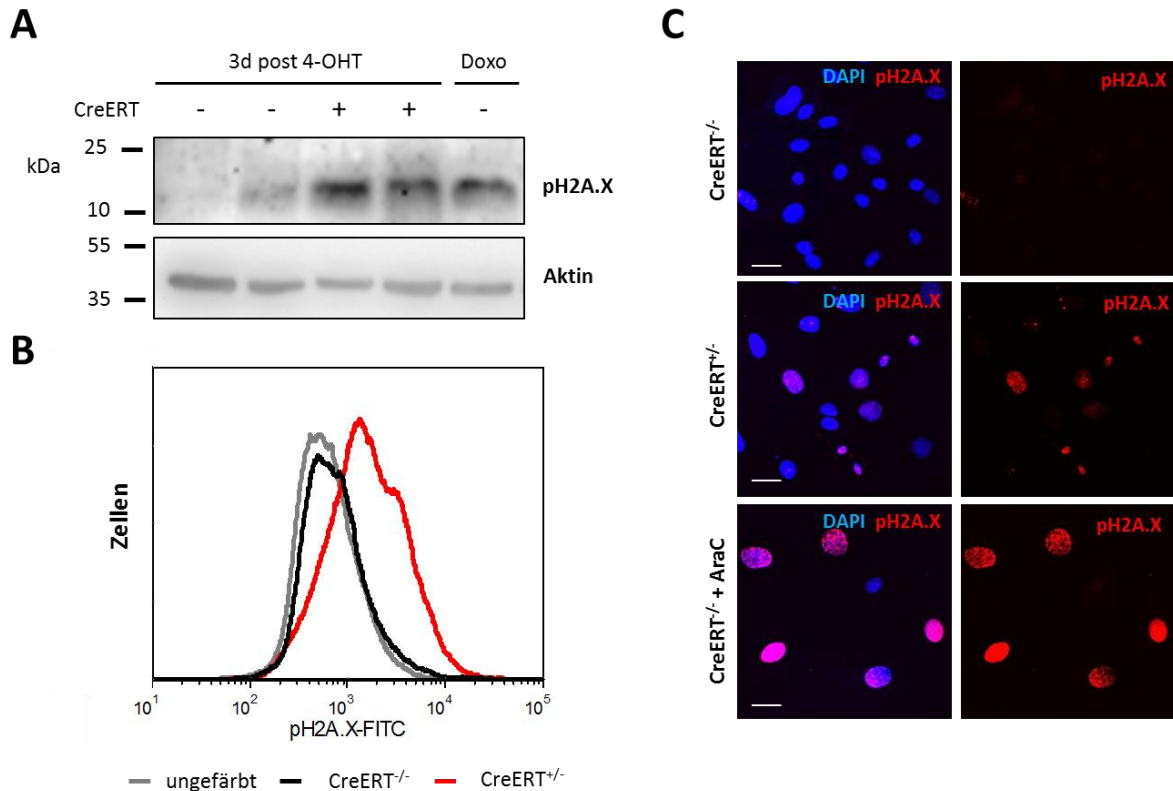


Abb. 11 Verstärktes Auftreten von DNA-Schäden in RNase H2-defizienten MEFs.

(A) Repräsentativer Immunblot der 4-OHT induzierten CreERT^{-/-} bzw. ^{+/-}-MEFs 3 d nach Induktion sowie mit 1 μ M Doxorubicin (Doxo) für 24 h behandelter Kontrollzellen als Positivkontrolle gegen den Doppelstrangbruch (DSB)-Marker pH2A.X (15 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n= 2). (B) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von ungefärbten (grau) und gegen pH2A.X (FITC) gefärbten CreERT^{-/-} (schwarz) bzw. ^{+/-} (rot) MEFs 3 d nach Induktion (n= 3). (C) Repräsentative immunzytochemische Färbung der CreERT^{-/-} bzw. ^{+/-}-MEFs sowie mit 10 μ M AraC für 24 h behandelter Kontrollzellen gegen pH2A.X (Cy3, rot) 3 d post 4-OHT mit Gegenfärbung des Nukleus (DAPI, blau), Maßstab 30 μ m (n= 3).

3.1.5 Aktivierung der DNA-Schadensantwort

DNA-Schäden bedrohen die genomische Integrität der Zelle und müssen daher effizient erkannt und wenn möglich behoben werden. Dazu wird über Signalwege der Zellzyklus arretiert, bis die markierte Alteration in der chemischen Struktur der DNA repariert worden ist. Handelt es sich jedoch um einen irreparablen Schaden, ist ein Wiedereintritt in den Zellzyklus ausgeschlossen. Stattdessen gehen die Zellen dann in Seneszenz oder Apoptose (Yoshiyama *et al.*, 2013; Abschnitt 1.6). Da die RNase H2-Defizienz mit einer erhöhten Last an DNA-Schäden assoziiert ist (Abschnitt 3.1.4), galt es den Fokus der Analyse auf die DNA-Schadensantwort (DDR, *DNA damage response*) zu legen.

Zunächst wurde die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 (Cazzalini *et al.*, 2010) auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene drei Tage nach Zusatz des Induktors 4-Hydroxytamoxifen untersucht. In den RNaseH2-defizienten Kulturen war die Transkriptmenge des Genes

geringfügig erhöht (Abb. 12A), während eine deutlich erhöhte Proteinexpression im Immunblot detektierbar war, die auch in der mit Doxorubicin behandelten Positivkontrolle sichtbar wurde (Abb. 12B).

Um festzustellen, ob diese Erhöhung ebenso mit einer verringerten Proliferation einhergeht, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. In diesen wurde deutlich, dass eine signifikante Abnahme der Zellen in der S-Phase innerhalb der CreERT^{+/-}-Kultur gegenüber der Cre-Rekombinase negativen Kultur vorlag (Abb. 12D/E). Gleichzeitig erhöhte sich der Anteil an defizienten Zellen in der M/G2-Phase. Die Anzahl an apoptotischen Zellen hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied und war mit Werten unterhalb von 5 % äußerst gering (Abb. 12D/F).

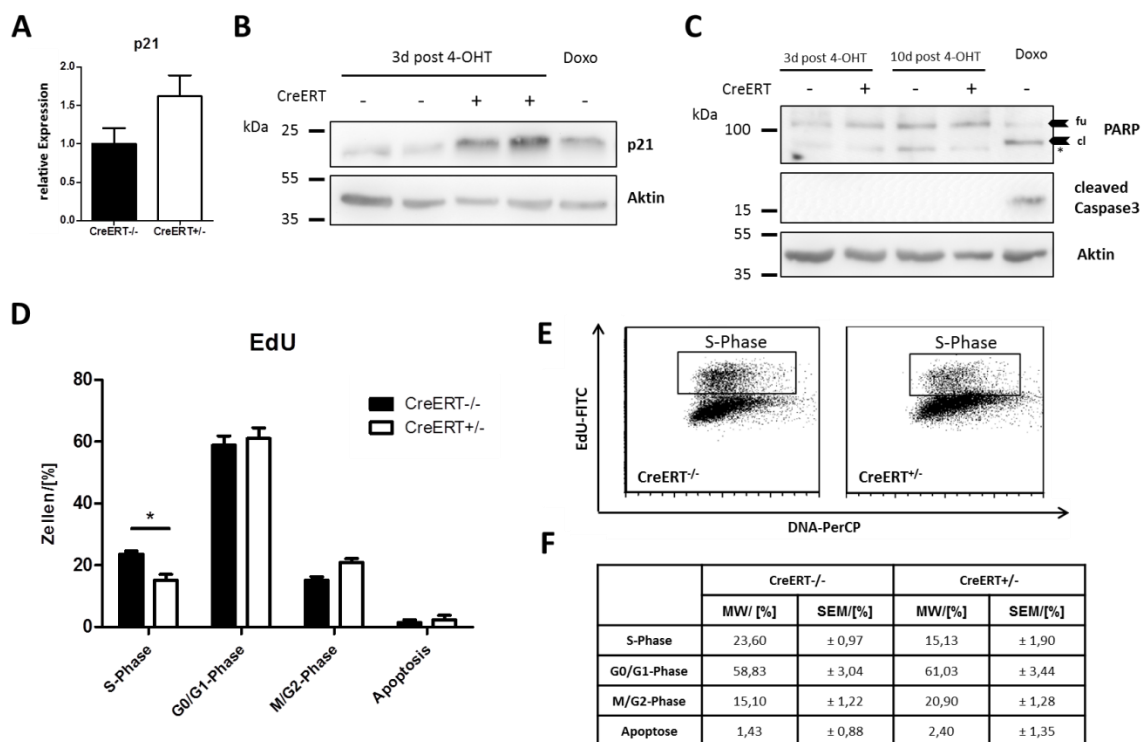


Abb. 12 RNase H2-Defizienz führt zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort.

(A) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) des Zellzyklusinhibitors *p21* der CreERT^{-/-} ($x=1$) gegenüber den CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post Induktion via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST ($n=3-4$). (B) Repräsentativer Immunblot der 4-OHT induzierten CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3 d nach Induktion sowie mit 1 μ M Doxorubicin (Doxo) für 24 h behandelter Kontrollzellen als Positivkontrolle gegen den Zellzyklusinhibitor p21 (21 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle. (C) Repräsentativer Immunblot der 4-OHT induzierten CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3d und 10 d nach Induktion sowie mit 25 μ M Doxorubicin (Doxo) für 24 h behandelter Kontrollzellen als Positivkontrolle gegen die Apoptose-Marker PARP (cl – *cleaved* mit 89 kDa, fu – *full length* mit 116 kDa) und die prozessierte (*cleaved*) Caspase 3 (17 kDa) sowie beta Aktin als Ladekontrolle. (D) Zellzyklusanalyse mittels EdU Assay (4 h Puls) von CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3 d nach Induktion mit 4-OHT, 2-WAY-ANOVA, Bonferri-Posttest, * $p < 0,05$ ($n=3$). (E) Beispielhafte grafische Auftragung der PerCP- gegen die FITC-Fluoreszenz (*dot blot*) mit Kennzeichnung aller Zellen in S-Phase. (F) Prozentuale Aufschlüsselung der Zellen in den Phasen S, G0/G1, M/G2 sowie subG0 (Apoptose).

Dennoch sollte unter Verwendung einer weiteren Methode verifiziert werden, dass die RNase H2-Defizienz und damit assoziierte DNA-Schädigung nicht zur Ausbildung eines apoptotischen Phänotyps führt. Dazu wurden Gesamtzelllysate gegen die Apoptosemarker Caspase 3 und PARP geblottet. In beiden Fällen würde sich der programmierte Zelltod anhand des Auftretens eines Spaltungsproduktes der Pro-Formen darstellen (Kaufmann *et al.*, 1993; Nicholson *et al.*, 1995). Diese wurden in der Positivkontrolle sichtbar, bei der die MEFs für 24 h mit dem Topoisomerase II-Hemmer Doxorubicin behandelt wurden, nicht jedoch in den Lysaten der CreERT^{-/-}- und CreERT^{+/-}-Zellen (Abb. 12C).

3.1.6 Vorliegen einer ISG-Signatur bei Abwesenheit der RNase H2

Mutationen in den Genen der RNase H2-Untereinheiten sind mit dem Aicardi-Goutières-Syndrom assoziiert. Es handelt sich dabei um eine Interferonopathie. Als diagnostischer Marker wird die erhöhte Expression von Interferon stimulierten Genen (ISGs) angesehen (Rice *et al.*, 2013).

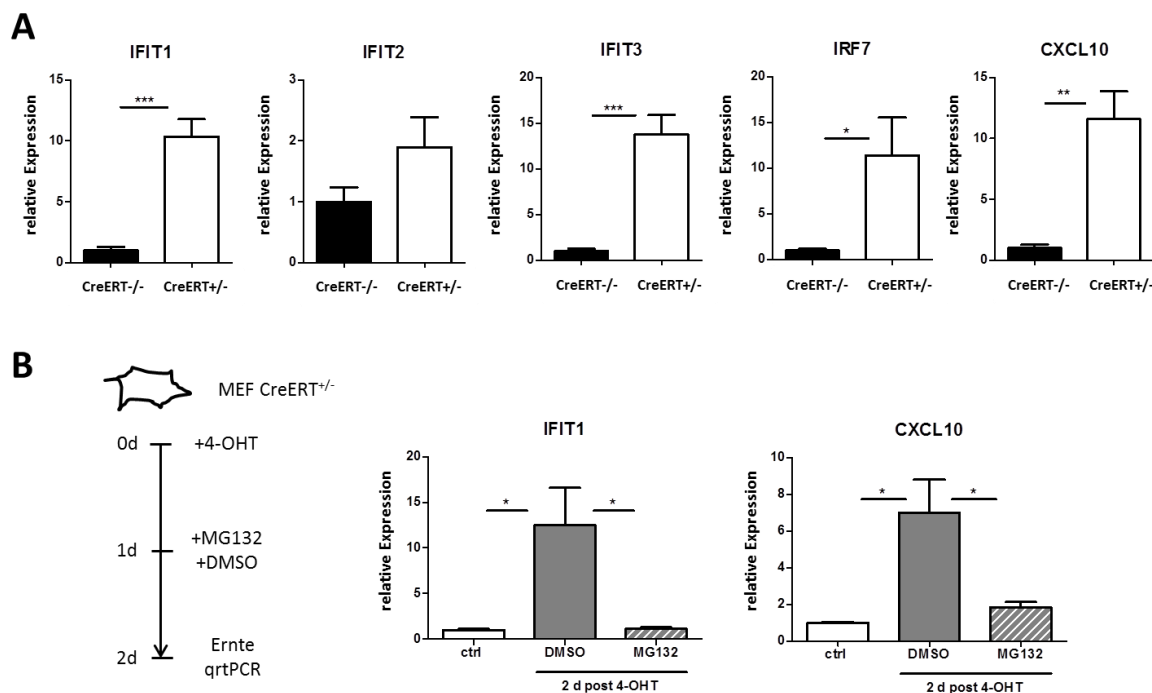


Abb. 13 RNase H2-abhängiges Auftreten einer ISG-Signatur.

(A) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der ISGs *IFIT1-3*, *IRF7* und *CXCL10* der CreERT^{-/-} ($x=1$) gegenüber den CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post Induktion via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$ ($n = 3$). (B) Repräsentative Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) nicht induzierter (ctrl, $x = 1$) sowie für 2 d 4-OHT induzierter CreERT^{+/-}-MEFs, die zusätzlich an Tag 1 post Induktion für 24 h mit DMSO oder MG132 (4 μ M) behandelt wurden, auf die ISGs *IFIT1* und *CXCL10* mittels *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM, 1-WAY-ANOVA, * $p < 0,05$ ($n = 2$).

Um festzustellen, ob diese ISG-Signatur auch im induzierbaren *Knock-out* vorliegt, wurden MEFs drei Tage nach Zusatz von Hydroxytamoxifen mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert. Die Transkriptmengen der Gene *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *CXCL10* und *IRF7* waren in den CreERT^{+/-}-Kulturen gegenüber den Kontrollen zumeist signifikant höher exprimiert (Abb. 13A). Um die Abhängigkeit dieser Signatur von der Abwesenheit der RNase H2 zu belegen, wurden ferner die Transkriptmengen nach Inhibition des UPS quantifiziert. Durch die Blockierung des Abbaus der Untereinheit B mittels Zusatz des proteasomalen Inhibitors MG132 (Abschnitt 3.1.3) wurde die bereits an Tag 2 vorliegende ISG-Erhöhung signifikant nahezu auf das Niveau der Kontrollzellen reduziert (Abb. 13B).

3.1.7 Einzelsträngige DNA im Zytoplasma RNase H2-defizienter Zellen

Das Aicardi-Goutières-Syndrom ist mit Mutationen in einer Vielzahl von Genen assoziiert, die für Proteine kodieren, welche im Nukleinsäure-Stoffwechsel (*RNaseH2*, *TREX1*, *SAMHD1*, *ADARI*) bzw. ihrer Detektion (*IFIH1*) wirksam sind. Sind diese Proteine in ihrer Funktionalität gestört, postulieren Hypothesen bezüglich der Pathogenese der Erkrankung die Akkumulation endogener Nukleinsäuren bzw. eine gestörte Detektionssignalkette, die sich in der ISG-Signatur als Krankheitsmerkmal manifestiert (Crow *et al.*, 2009). Für TREX1-defiziente Zellen konnte in diesem Zusammenhang bereits das verstärkte Vorkommen von einzelsträngiger DNA (ssDNA, *single stranded DNA*) im Zytoplasma belegt werden (Yang *et al.*, 2007). Dieser Befund war ebenso in ATM-defizienten Zellen ersichtlich, die gleichfalls eine ISG-Erhöhung aufwiesen (Härtlova *et al.*, 2015).

Um der Fragestellung nachzugehen, welche endogene Nukleinsäurespezies in RNase H2-defizienten Zellen akkumuliert und zur verstärkten Expression der ISGs führt, wurden die primären MEFs auf verschiedene mögliche Substrate sowie Enzyme zu deren Abbau untersucht. Ein erster Schwerpunkt lag auf dem Nachweis von einzelsträngiger DNA im Zytoplasma der CreERT^{+/-}-Kulturen. Dazu wurden Fluoreszenzfärbungen mit einem gegen ssDNA gerichteten Antikörper drei Tage nach Zusatz von Hydroxytamoxifen durchgeführt, die zeigten, dass in der RNaseH2-defizienten Zellpopulation ein erhöhter Anteil stark zytoplasmatisch gefärbter Zellen sichtbar wurde (Abb. 14A). Diese Signale konnten in nur mit dem sekundären Antikörper behandelten Zellen nicht detektiert werden (Anhang A1), wobei alle Färbungen bei identischer Belichtungsdauer und Laserintensität begutachtet wurden.

Um diesen Effekt zu quantifizieren wurden zusätzlich durchflusszytometrische Messungen am gleichen Versuchstag vorgenommen, bei denen ersichtlich wurde, dass die RNase H2-defizienten Zellen mehr zytoplasmatische ssDNA als die entsprechenden Kontrollzellen aufwiesen. Zum Nachweis der Spezifität der Zellfärbung wurden die CreERT^{+/-}-Kulturen außerdem mit S1 Nuklease, einem ssDNA abbauendem Enzym, behandelt, wodurch der zuvor sichtbare Versatz (*shift*) gegenüber den Kontrollzellen im Histogramm negiert wurde (Abb. 14B).

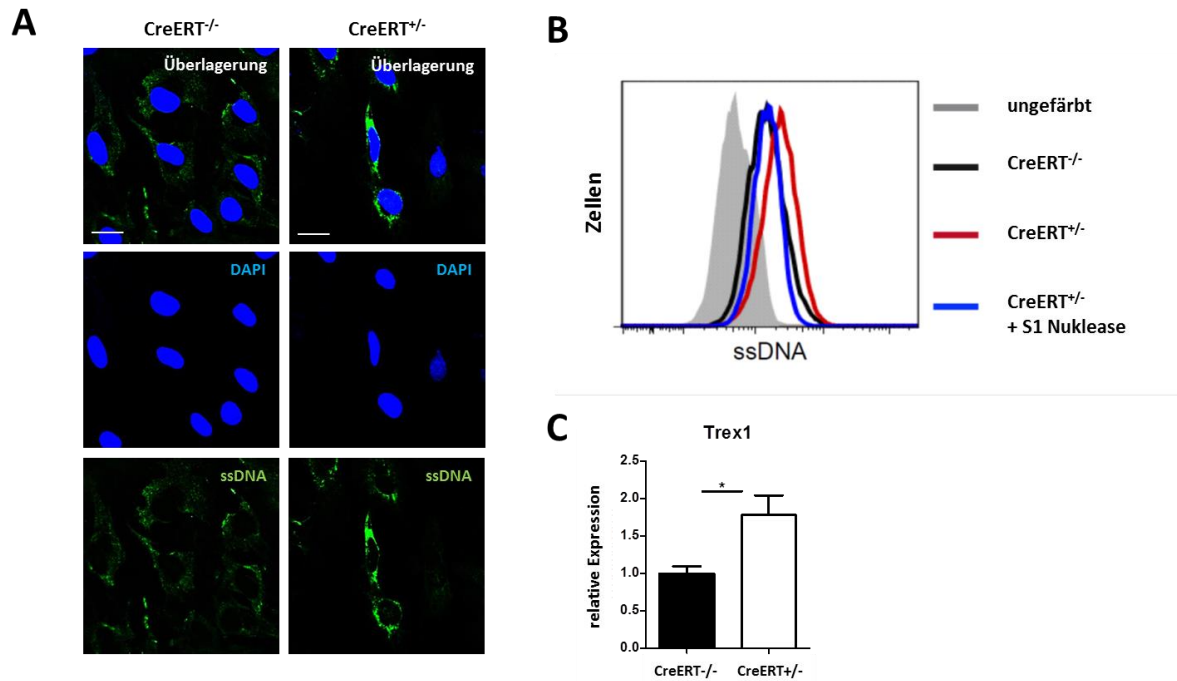


Abb. 14 Einzelsträngige DNA im Zytoplasma RNase H2-defizienter Zellen.

(A) Repräsentative immunzytochemische Färbung von Kontrollzellen ($\text{CreERT}^{-/-}$) und RNase H2-defizienten Zellen ($\text{CreERT}^{+/-}$) 3 d nach 4-OHT-Induktion gegen ssDNA (Alexa Flour 488, grün) mit Gegenfärbung des Nukleus (DAPI, blau); Zu sehen ist eine deutlich, stärkere zytoplasmatische Signalgebung in der RNase H2-defizienten Zellpopulation; Maßstab 20 μm , ($n = 3$). (B) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse 3 d post 4-OHT induzierter $\text{CreERT}^{-/-}$ - und $\text{CreERT}^{+/-}$ -MEFs (-/+ S1 Nuklease) auf ssDNA (FITC) sowie ungefärbter Kontrollzellen ($n = 3$). (C) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$) der Nuklease *TREX1* der $\text{CreERT}^{-/-}$ ($x = 1$) gegenüber den $\text{CreERT}^{+/-}$ -MEFs 3 d post Induktion via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST, * $p < 0,05$ ($n = 3$).

Ebenso konnte mit Hilfe einer quantitativen *real time* PCR eine signifikant, leicht erhöhte *TREX1* Transkriptmenge festgestellt werden (Abb. 14C). Hierbei handelt es sich um eine Nuklease, die vorrangig ssDNA degradiert (Yang *et al.*, 2007).

3.1.8 Doppelsträngige, zytoplasmatische DNA in RNase H2-defizienten Zellen

Neben der Akkumulation einzelsträngiger DNA (Abschnitt 3.1.7) wurde die Möglichkeit des Vorliegens doppelsträngiger DNA (dsDNA, *double stranded DNA*) im Zytoplasma RNase H2-defizienter Zellen in den Fokus der Untersuchung gestellt. Dieser Befund wurde bereits für *TREX1*-defiziente Zellen beschrieben (Ahn *et al.*, 2014).

Dazu erfolgten unter Verwendung eines Antikörpers gegen dsDNA immunzytochemische Färbungen, die zytoplasmatische DNA-Strukturen erkennen ließen (Abb. 15A). So wiesen die primären $\text{CreERT}^{+/-}$

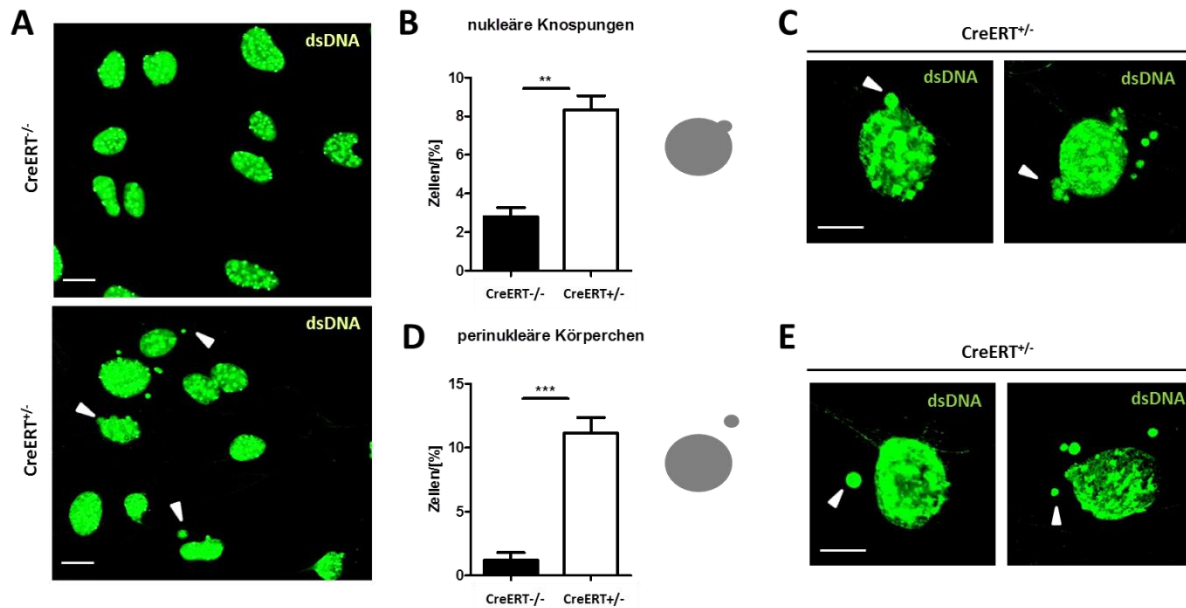


Abb. 15 Zytoplasmatische dsDNA-Strukturen in RNase H2-defizienten MEFs.

(A) Repräsentative immunzytochemische Färbung von Kontrollzellen (CreERT^{-/-}) und RNase H2 defizienten MEFs (CreERT^{+/-}) 3 d nach 4-OHT Induktion gegen dsDNA (Alexa Flour 488, grün); zytoplasmatische dsDNA-Strukturen sind mit Pfeilen gekennzeichnet; Maßstab 15 μ m (n= 3). (B,D) Quantifizierung der nukleären Knospungen und perinukleären Körperchen der Färbungen aus (A); studentischer, zweiseitiger T-TEST, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 (n= 3, insgesamt 300 Zellen) (C/E) Vergrößerte Darstellung der zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen (Alexa Flour 488, grün, mit Pfeilen gekennzeichnet) aus (A), Maßstab 10 μ m.

MEFs drei Tage nach 4-OHT-Induktion sowohl Knospungen (*buds*, Abb. 15C) am Zellkern als auch perinukleäre Körperchen (*perinuclear bodies*, Abb. 15E) auf, deren prozentuale Anzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht war. Grundsätzlich waren diese zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen jedoch in beiden Zellpopulationen sichtbar; unterschieden sich aber in der Häufigkeit ihres Vorkommens (Abb. 15B/D). Die Spezifität des Antikörpers wurde anhand der Kolo-kalisation mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI belegt (Anhang A2). Als Negativkontrolle dienten nur mit sekundärem Antikörper inkubierte CreERT^{-/-}-Zellen, die keine spezifischen Fluoreszenzsignale zeigten (Anhang A1).

3.1.9 Export geschädigter DNA ins Zytoplasma

Das Zytoplasma RNase H2-defizienter Zellen wies eine erhöhte Anzahl an nukleären Knospungen und perinukleären Körperchen auf (Abschnitt 3.1.8). Diese Strukturen wurden bereits in *DNase2a*-defizienten Zellen beschrieben und dienten dem Export geschädigter DNA (Lan *et al.*, 2014). Da auch die Defizienz der Ribonuklease H2 mit einer erhöhten Frequenz an Doppelstrangbrüchen (DSB)

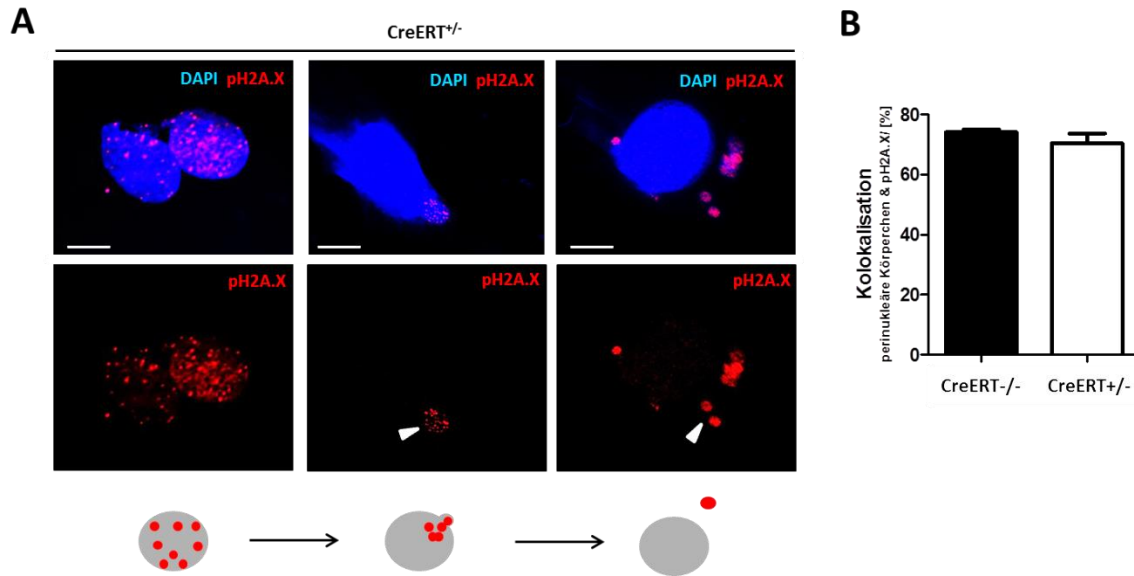


Abb. 16 Export geschädigter DNA ins Zytoplasma.

(A) Repräsentative immunzytochemische Färbung von CreERT^{+/-} MEFs 3 d nach 4-OHT-Induktion gegen den DSB-Marker pH2A.X (Cy3, rot) mit Gegenfärbung des Zellkernes (DAPI, blau); Auftreten punktueller Schadenmuster im Zellkern und den nukleären Knospungen sowie Signalkonzentrierung in perinukleären Körperchen (mit Pfeilen gekennzeichnet); Maßstab 10 μ m (n = 3). (B) Quantifizierung der Kolokalisation von pH2A.X und perinukleären Körperchen anhand der Färbungen aus (A); studentischer, zweiseitiger T-TEST (n = 3, insgesamt 300 perinukleäre Körperchen).

einhergeht, die bereits anhand des Markers pH2A.X unter Nutzung verschiedener Methoden zuvor aufgezeigt wurden (Abschnitt 3.1.4), lag die Vermutung nahe, dass die zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen der RNase H2-defizienten MEFs demselben Exportprozess dienten.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden Fluoreszenzfärbungen der primären MEFs gegen pH2A.X drei Tage nach Induktion mit Hydroxytamoxifen begutachtet. Neben Zellen, die ein starkes, punktförmiges Schädigungsmuster im Nukleus aufwiesen, war ferner die Konzentrierung von DNA-Schäden in den zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen ersichtlich, die sich in einer Kolokalisation von DAPI und phosphoryliertem Histon darstellte (Abb. 16A). Diese Signalüberlagerung wurde für die perinukleären Körperchen in 70 - 74 % der Fälle unabhängig vom Genotyp festgestellt (Abb. 16B).

3.1.10 Export neu synthetisierter DNA ins Zytoplasma

Die Untereinheit B der Ribonuklease H2 besitzt ein PIP-Box-Motiv, das der Bindung an das Ringklemmenprotein PCNA dient und die Nuklease damit lokal und funktionell an die Replikation koppelt (Chon et al., 2009; Bubeck *et al.*, 2011). Andernfalls führt die enzymale Abwesenheit zur erhöhten Integration von einzelnen Ribonukleotiden in den neu-synthetisierten DNA-Strang und einer damit assoziierten verstärkten Last an DNA-Schäden (Reijns et al., 2012). Wie bereits zuvor gezeigt

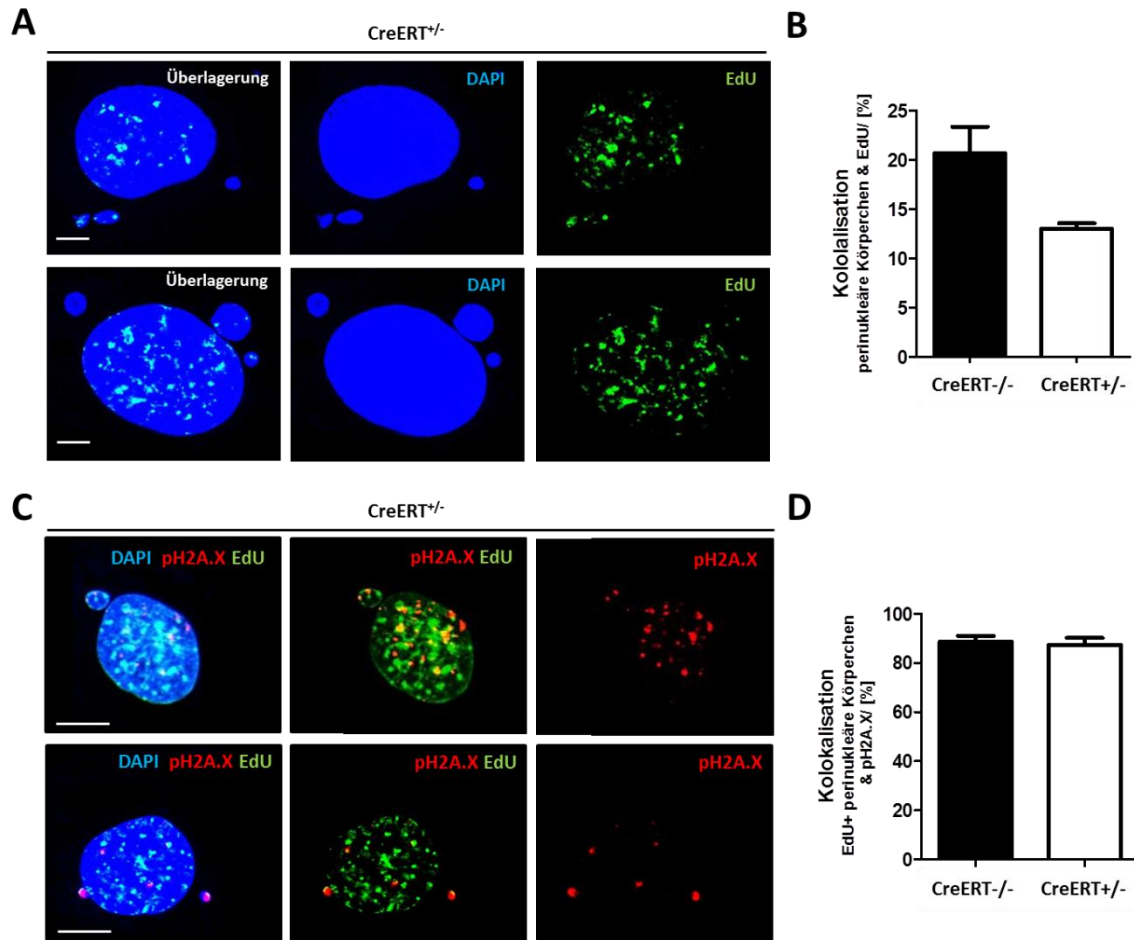


Abb. 17 Export neu-synthetisierter, geschädigter DNA.

(A) Repräsentative immunzytochemische Färbung von CreERT^{+/−} MEFs 3 d nach 4-OHT-Induktion sowie 24 h post EdU-Zusatz gegen das Nukleosid-Analogon EdU (Alexa Fluor 488, grün) mit Gegenfärbung des Zellkernes (DAPI, blau); Kolokalisation von EdU und dsDNA im Zellkern sowie den perinukleären Körperchen; Maßstab 5 μ m (n = 3). (B) Quantifizierung der Kolokalisation von EdU und den perinukleären Körperchen anhand der Färbungen aus (A), studentischer, zweiseitiger T-TEST (n = 3, insgesamt 300 perinukleäre Körperchen). (C) Repräsentative immunzytochemische Färbung von CreERT^{+/−} MEFs 3 d nach 4-OHT-Induktion sowie 24 h post EdU-Zusatz gegen das Nukleosid-Analogon EdU (Alexa Fluor 488, grün) sowie den DSB-Marker pH2A.X (Cy3, rot) mit Gegenfärbung des Zellkernes (DAPI, blau); Kolokalisation von EdU, pH2A.X und dsDNA im Zellkern sowie den perinukleären Körperchen; Maßstab 10 μ m (n = 3). (D) Quantifizierung der Kolokalisation von pH2A.X und EdU+ perinukleären Körperchen anhand der Färbungen aus (C), studentischer, zweiseitiger T-TEST (n = 3, insgesamt 300 perinukleäre Körperchen).

wurde (Abschnitt 3.1.9), wird die beschädigte DNA von der Zelle ins Zytoplasma exportiert. Um festzustellen, ob es sich bei dieser extranukleären DNA um neu synthetisierte Nukleinsäuren handelte, wurde den Primärkulturen zwei Tage nach Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen EdU als Zellmembran permeables Nukleosid-Analogon für 24 h zugesetzt, das alle innerhalb dieser Zeitspanne in der S-Phase befindlichen Zellen in den neu gebildeten Strang einbauen. Die mikroskopische Auswertung der Fluoreszenzfärbung gegen das Analogon ergab eine Kolokalisation mit den anhand einer DAPI-Färbung visualisierten perinukleären Körperchen (Abb. 17A). Diese Signalüberlagerung konnte in

13,00 % \pm 0,58 % der zytoplasmatischen Strukturen in den CreERT^{+/-}-Kulturen festgestellt werden, während der prozentuale Anteil in den Kontrollzellen leicht erhöht bei 20,67 % \pm 2,78 % lag (Abb. 17B). Ferner wurden diese EdU positiven Körperchen auf eine Kolokalisation mit dem DSB-Marker pH2A.X geprüft (Abb. 17C), wobei sich anhand der Auszählung dieser Strukturen ein Wert von 87 - 88 % unabhängig vom Genotyp ergab (Abb. 17D).

3.1.11 Einfluss der Proliferationsrate auf das Vorkommen zytoplasmatischer dsDNA

Da RNase H2-defiziente Primärzellen neu-synthetisierte DNA ins Zytoplasma exportieren (Abschnitt 3.1.10) sollte in weiterführenden Experimenten der Einfluss der Proliferationsrate auf den *in-vitro*-Phänotyp untersucht werden. Dazu wurden die Primärzellen in Serum-armem (0,5 % FKS), 4-OHT-haltigem Medium für drei Tage kultiviert und im Vergleich zu unter Standardbedingungen gehaltenen Kontrollzellen auf die Parameter Proliferation und die Anzahl der dsDNA-Strukturen analysiert.

Der erste Parameter wurde anhand durchflusszytometrischer Messungen nach Zusatz von EdU für vier Stunden bewertet. Die Kultivierung unter Serumarmut führte unabhängig von der Anwesenheit der RNase H2 zu einer starken Reduktion der in S-Phase befindlichen Zellen, die stattdessen vor allem in der G0/G1-Phase akkumulierten und ebenso einen geringen Anstieg in der M/G2-Phase aufwiesen (Abb. 18A). Gleichzeitig war die Senkung der Proliferationsrate mit einer Minderung der zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen in den CreERT^{+/-}-Primärzellen assoziiert, die anhand einer Fluoreszenzfärbung mikroskopisch quantifiziert wurden (Abb. 18B).

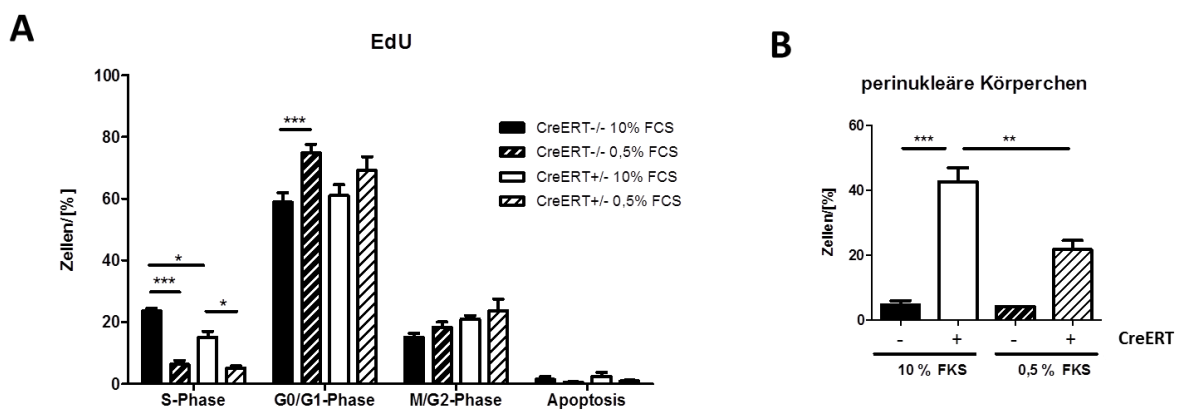


Abb. 18 Einfluss der Proliferationsrate auf das Vorkommen zytoplasmatischer dsDNA.

(A) Zellzyklusanalyse mittels EdU Assay von CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3 d nach Induktion mit 4-OHT sowie der Kultivierung unter Standardbedingungen (10 % FKS) oder Serumarmut (0,5 % FKS); prozentuale Aufschlüsselung der Zellen in den Phasen S, G0/G1, M/G2 sowie subG0 (Apoptose); 2-WAY-ANOVA, Bonferri-Posttest, * p < 0,05 und *** p < 0,001 (n = 3). (B) Quantifizierung der perinukleären Körperchen in CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3 d nach Induktion mit 4-OHT sowie der Kultivierung unter Standardbedingungen (10 % FKS) oder Serumarmut (0,5 % FKS); 1-WAY-ANOVA, Turkey Posttest, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 (n = 3).

3.1.12 Phänokopie der CreERT^{+/-}-MEFs durch Induktion von DSB in CreERT^{-/-}-Zellen

Die Induktion von DNA-Schäden führt zur erhöhten Expression von ISGs. Diese Assoziation konnte bereits nach Behandlung von Zellkulturen mit Topoisomerase-Inhibitoren (Etoposid, Doxorubicin, Ara-C, *etc.*) sowie ionisierender Strahlung belegt werden (Härtlova *et al.*, 2015). Ebenso wurde aufgezeigt, dass daraus resultierend zytoplasmatische DNA-Strukturen auftreten (Lan *et al.*, 2014) und die Typ I Interferonantwort aktiviert wird (Kim *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse sollten mit den primären MEFs reproduziert werden und damit als prinzipieller, mechanistischer Beweis für den Einfluss von DNA-Schäden auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems dienen.

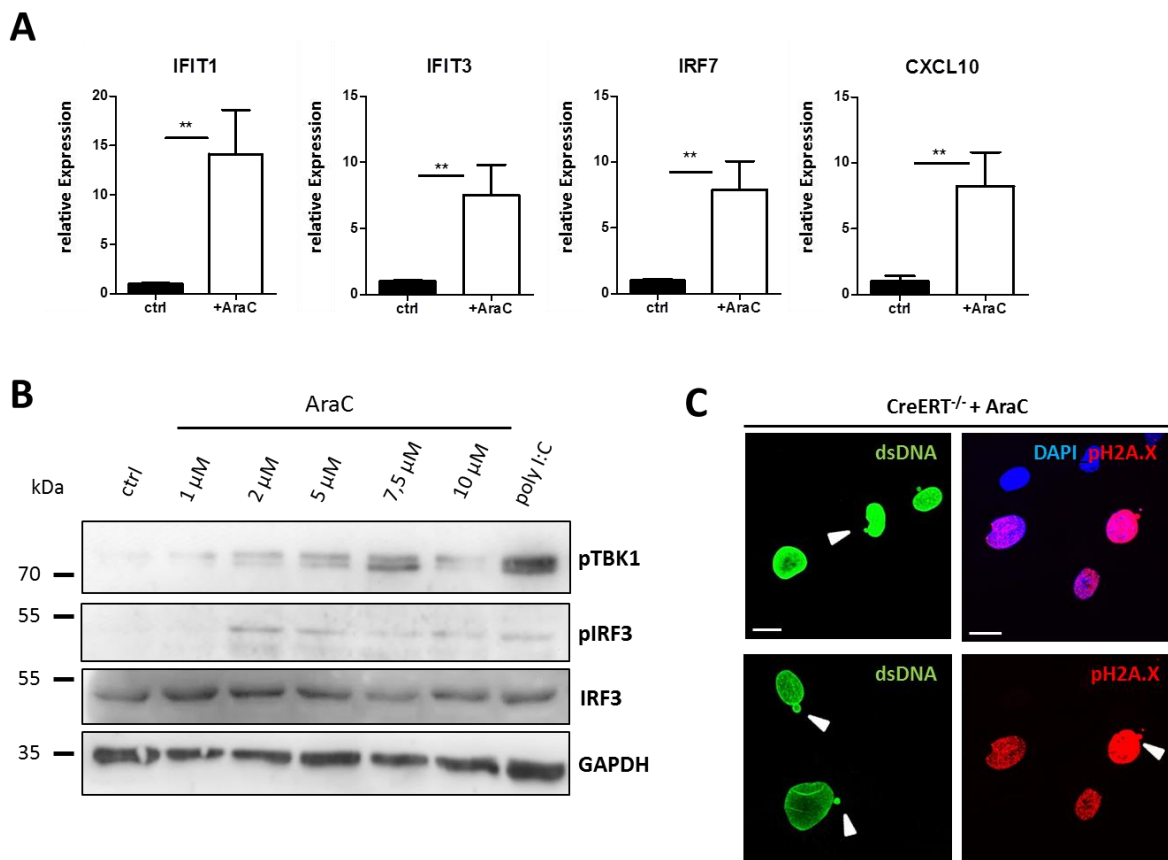


Abb. 19 Induktion von DNA-Schäden führt zum Vorkommen zytoplasmatischer pH2A.X⁺ dsDNA-Strukturen sowie zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Wildtyp-MEFs.

(A) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der ISGs *IFIT1*, *IFIT3*, *IRF7* und *CXCL10* der CreERT^{-/-}-MEFs ($x=1$) gegenüber ihren mit AraC (10 μ M/24 h) behandelten Äquivalenten via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST; ** $p < 0,01$ ($n = 3$). (B) Repräsentativer Immunblot von CreERT^{-/-}-MEFs, die für 24 h mit AraC (1/2/5/7,5/10 μ M) inkubiert wurden, gegen pTKB1 (84 kDa) und pIRF3 (50 kDa) zum Beweis der Aktivierung des Typ I Interferonsystems sowie gegen GAPDH (37 kDa) und IRF3 (50 kDa) als Ladekontrolle; Verwendung von polyI:C (1 μ g) transfizierten CreERT^{-/-}-Zellen 1 h post Transfektion als Positivkontrolle ($n = 2$). (C) Repräsentative Fluoreszenzfärbung von CreERT^{-/-}-MEFs 24 h post AraC-Behandlung (10 μ M) gegen dsDNA (Alexa Fluor 488, grün) und pH2A.X (Cy3, rot); Vorkommen zytoplasmatischer pH2A.X⁺ dsDNA-Strukturen (mit Pfeilen gekennzeichnet), Maßstab 15 μ M ($n = 3$).

So wiesen mit AraC behandelte primäre murine embryonale Fibroblasten in immunzytochemischen Färbungen gegen dsDNA nukleäre Knospungen sowie perinukleäre Körperchen auf, die ebenso mit dem DSB-Marker pH2A.X kolokalisierten (Abb. 19C).

Die Induktion von DNA-Schäden durch AraC führte gleichfalls zur signifikanten Erhöhung der Expression der ISGs *CXCL10*, *IFIT1*, *IFIT3* und *IRF7*, deren Transkriptmengen mit Hilfe von *real time* PCRs gemessen wurden (Abb. 19A). Diese Induktion wies auf die Aktivierung des Typ I Interferonsystems hin, das durch die Phosphorylierung der Kinase TBK1 und des Transkriptionsfaktor IRF3 gekennzeichnet ist. Beide Proteine wurden bezüglich ihres Aktivierungszustandes in Abhängigkeit zur Konzentration von AraC in Immunblots untersucht. So wurde mit steigender Konzentration des Topoisomerase-Hemmers eine verstärkte Phosphorylierung festgestellt, die ebenso in der mit polyI:C transfizierten Positivkontrolle sichtbar wurde. Die Aktivierung erfolgte ab einer Konzentration von 2 μ M AraC, das für 24 h dem Zellkulturmedium zugesetzt wurde. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung wurde in den Gesamtproteinlysaten außerdem das Haushaltsgen GAPDH sowie die unphosphorylierte Form von IRF3 detektiert (Abb. 19B).

3.1.13 Aktivierung des cGAS-STING Signalweges in RNase H2-defizienten MEFs

Das Erkennen von pathogenen Nucleinsäuren stellt einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort dar und funktioniert über eine Vielzahl verschiedener Detektoren und Adaptoren, die je nach Spezies der Nucleinsäure aktiviert werden und in der transkriptionellen Erhöhung der Expression von Typ I Interferonen sowie ISGs münden (Takeuchi und Akira, 2010; Radoshevich und Dussurget, 2016; Abschnitt 1.4). Die Pathogene beschränken sich nicht nur auf bakterielle und virale Nucleinsäuren, sondern können auch endogener Herkunft sein (Thompson *et al.*, 2011). Tritt in Zellen beispielsweise zytoplasmatische DNA auf, wird diese über den Sensor cGAS wahrgenommen, der den Sekundärbotenstoff cGAMP bildet, der wiederum an den Adaptor STING bindet und zu dessen Dimerisierung führt (Zhang *et al.*, 2013). Da RNase H2-defiziente Primärzellen dsDNA-Strukturen im Zytoplasma aufwiesen (Abschnitt 3.1.8), galt es nachzuprüfen, ob dieser spezifische Signalweg zur Erhöhung der ISGs führte.

Dazu wurden die primären MEFs mit siRNAs gegen den Sensor sowie den Adaptor transfiziert und nach drei Tagen mit Hilfe von *real time* PCRs auf die Effizienz des *Knock-downs* sowie das Vorliegen der ISG-Signatur untersucht. Als Kontrollgruppen dienten mit *non-targeting* siRNA (ctrl, *control*) in gleicher Weise behandelte Zellen.

Die Transkriptmengen von *STING* als auch *cGAS* waren auf ein Niveau von etwa 12 % gegenüber den Kontrollzellen reduziert (Abb. 20A/B). Die Analyse der transkriptionellen Rate von *CXCL10* und *IFIT1* belegte die gesteigerte Expression beider ISGs in den mit *non-targeting* siRNA transfizierten

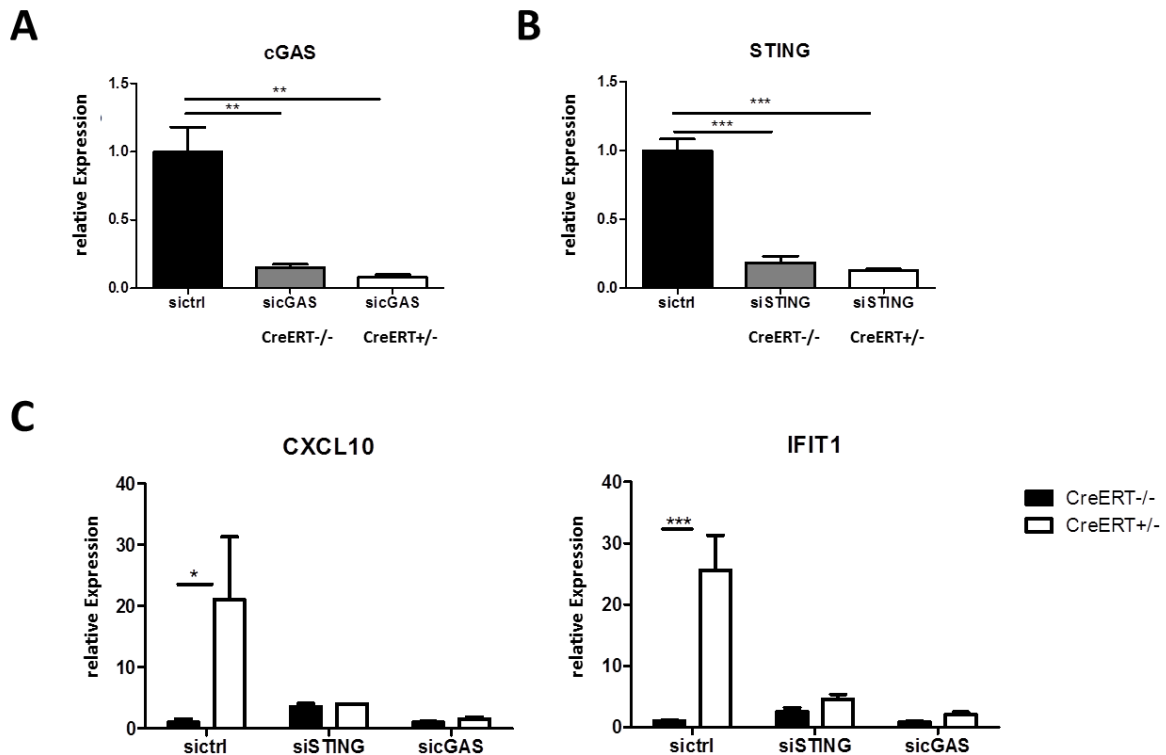


Abb. 20 Signaltransduktion in RNase H2-defizienten MEFs über den cGAS-STING-Signalweg.

(A/B) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) des DNA-Sensors *cGAS* und des Adaptorproteins *STING* der CreERT^{-/-}-MEFs ($x = 1$) und CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post Induktion mit 4-OHT und 3 d post Transfektion mit siRNA (*non-targeting* = siCtrl, siGAS, siSTING) mittels *real time* PCR zur Untersuchung der *Knock-down*-Effizienz; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; 1-WAY-ANOVA, Turkey Posttest; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ ($n = 2$). (C) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der ISGs *IFIT1* und *CXCL10* in transfizierten und induzierten Zellen aus (A) mittels *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; 2-WAY-ANOVA, Bonferri-Posttest; * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ ($n = 2$).

CreERT^{+/-}-Kulturen gegenüber den identisch behandelten CreERT^{-/-}-Primärzellen. Dieser Unterschied war beim Vergleich beider Zellpopulationen sowohl nach dem *Knock-down* von *STING* als auch *cGAS* nicht mehr vorhanden. Stattdessen waren beide Versuchsgruppen auf einem nahezu identischen Niveau bezüglich der Transkriptmenge beider ISGs (Abb. 20C).

3.1.14 Zytoplasmatische, ektopische dsDNA als Ligand des Sensors cGAS

Das Protein cGAS wurde als zytoplasmatischer Sensor für dsDNA beschrieben und katalysiert nach der Bindung des Liganden die Synthese des sekundären Botenstoffes cGAMP (Sun *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Da bereits gezeigt werden konnte, dass im Zytoplasma RNase H2-defizienter MEFs bzw. mit AraC behandelter MEFs perinukleäre Körperchen verstärkt vorzufinden sind (Abschnitt 3.1.8 und

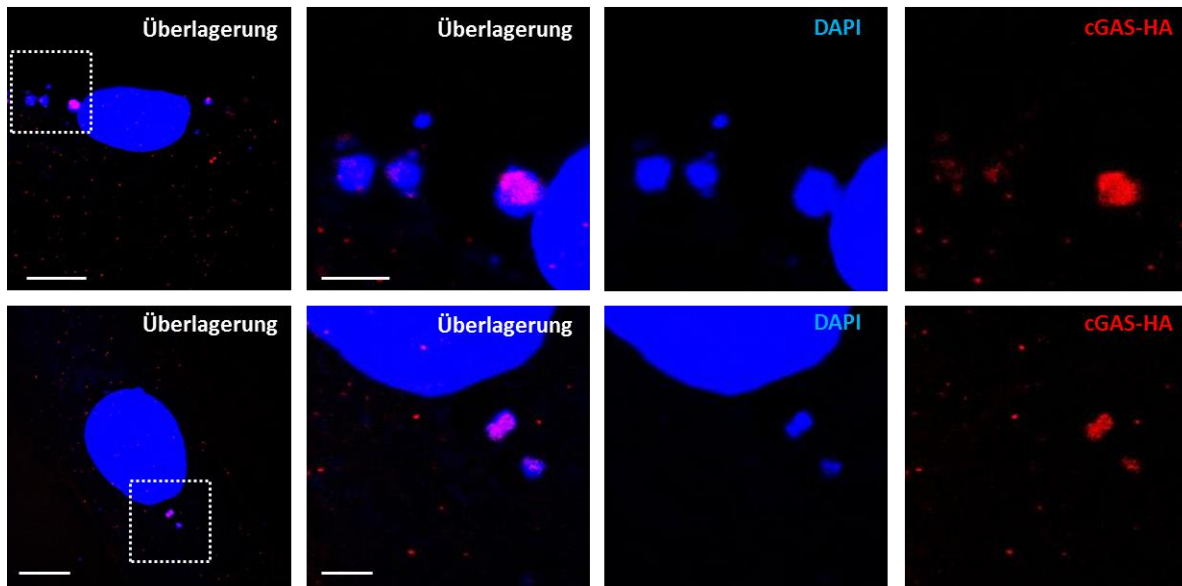


Abb. 21 Bindung des Sensors cGAS an zytoplasmatische dsDNA.

Repräsentative Fluoreszenzfärbung der CreERT^{+/−}-MEFs gegen den HA-Tag des Sensors cGAS (Cy3, rot) mit Gegenfärbung der nukleären dsDNA (DAPI, blau) 3 d post 4-OHT-Induktion und Transfektion mit pUNO1-cGAS-HA3X sowie 2 d post Selektion mit Blastizidin; Kolokalisation von cGAS-HA und zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen; Maßstab 10 µm und in der vergrößerten Darstellung 2,5 µm (Kennzeichnung des vergrößerten Bereiches mittels Viereck).

3.1.12), galt es zu überprüfen, ob diese Strukturen an den Sensor binden und damit ursächlich für die ISG-Erhöhung sind.

Dazu wurden die CreERT^{+/−}-Primärkulturen mit einem 3xHA-getaggten cGAS codierenden Vektor transfiziert und für 2 Tage auf die Resistenz gegen Blastizidin selektioniert. Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung gegen den HA-Tag vorgenommen und die Zellen an einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Dabei zeigte sich grundsätzlich, dass eine Überlagerung der Signale des Sensors cGAS mit denen der zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen sichtbar war. Diese Kolokalisation wurde für 16,33 % ± 3,28 % der perinukleären Körperchen festgestellt (Abb. 21).

3.1.15 Abbau zytoplasmatischer dsDNA durch Autophagie

Ektopische DNA im Zytoplasma gilt als Warnsignal für die Zelle und führt zu einer Immunreaktion, die typischerweise durch die gesteigerte Expression von Typ I Interferonen und ISGs gekennzeichnet ist (Takeuchi und Akira, 2010; Abschnitt 1.4). Gleichzeitig muss der Abbau dieser Nukleinsäuren stattfinden. Für zytoplasmatische dsDNA in DNase2a-defizienten Zellen wurde dieser Vorgang über Autophagie beschrieben (Lan *et al.*, 2014). Da in RNase H2-defizienten Primärzellen auch perinukleäre Körperchen beobachtet werden konnten (Abschnitt 3.1.8), sollte gleichfalls der autophagische Prozess untersucht werden.

Dazu wurden die Zellen für 24 h mit 10 nM Bafilomycin A1 (BafA1) behandelt, einem Inhibitor, der die Azidifizierung des Autolysosoms durch Hemmung der V-ATPase unterbindet sowie die Fusion von Autophagosom und Lysosom durch Hemmung der ER-lokalisierter ATPase Ca-P60A/dSERCA inhibiert und dadurch die Degradierung der Cargo im Lumen verhindert (Mauvezin und Neufeld, 2015). Anschließend wurden die MEFs fixiert und gegen dsDNA immunzytochemisch gefärbt. Die mikroskopische Quantifizierung der zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen ergab unter Kontrollbedingungen (DMSO), wie bereits zuvor beschrieben, eine signifikante Erhöhung der nukleären Knospungen als auch perinukleären Körperchen in den CreERT^{+/-}-Kulturen gegenüber den CreERT^{-/-}-Primärzellen. Durch die Verwendung des Inhibitors wurde die Anzahl der perinukleären dsDNA-Aggregate signifikant in den defizienten Zellen erhöht. Dieser Unterschied konnte für die am Zellkern auftretenden Knospungen nicht festgestellt werden (Abb. 22A/B).

Nachdem die letzte Phase der Autophagie chemisch gehemmt wurde, sollte in einem zweiten experimentellen Ansatz die Bildung des Autophagosoms als erstem Schritt des Abbauprozesses unterbunden werden. Dazu wurde der *Knock-down* des Proteins Atg5 vorgenommen, das im multimeren Komplex mit Atg12 und Atg16L1 essentiell an der Formierung und Elongation der Isolatormembran beteiligt ist (Tanida, 2011; Mizushima *et al.*, 2001). Gleichzeitig wurden die Primärzellen zur Kontrolle mit *non-targeting* siRNA behandelt.

Zunächst wurde die Effizienz des *Knock-downs* drei Tage nach Transfektion der Nukleinsäuren auf RNA-Ebene mittels *real time* PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptmenge des Gens *Atg5* auf ein Niveau von etwa 6 % gegenüber den Kontrollzellen reduziert war (Abb. 22C). Diese Reduktion führte zur signifikanten Erhöhung der ISGs CXCL10 und IFIT1 in den RNase H2-defizienten und nicht defizienten Zellen gegenüber den mit *non-targeting* siRNA behandelten Äquivalenten. Hervorzuheben ist, dass insbesondere in den CreERT^{+/-}-Zellen nach dem *Knock-down* sehr stark erhöhte Konzentrationen an ISG-Transkripten festgestellt wurden (Abb. 22D).

Zusammengefasst konnten unter Nutzung des Inhibitors BafA1 als auch des *Knock-downs* von *Atg5* indirekt Hinweise für den Mechanismus des Abbaus der ektopischen dsDNA gewonnen werden. Um jedoch eine direkte Verbindung zwischen zytoplasmatischer dsDNA und Autophagie aufzuzeigen, wurden die defizienten Zellen mit einem Tandemfluoreszenzkonstrukt transfiziert, das als Marker der autophagischen Strukturen diente und die Unterscheidung der Kompartimente Autophagosom und Autolysosom erlaubte. Es handelte sich bei dem Markerprotein um LC3, das als Fusionsprotein mit mRFP (*monomeric red fluorescent protein*) und eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) exprimiert vorlag. LC3 wird zunächst zytoplasmatisch exprimiert, anschließend C-terminal prozessiert (LC3-I) und letztlich an Phosphatidylethanolamin (PE) als Bestandteil der Membran des sich bildenden Autophors gebunden (LC3-II) (Kabeya *et al.*, 2000). Im Autophagosom kann sowohl eGFP als auch mRFP kolokalisiert detektiert werden, währenddessen der saure pH-Wert im Autolysosom das grüne Fluoreszenzsignal quencht.

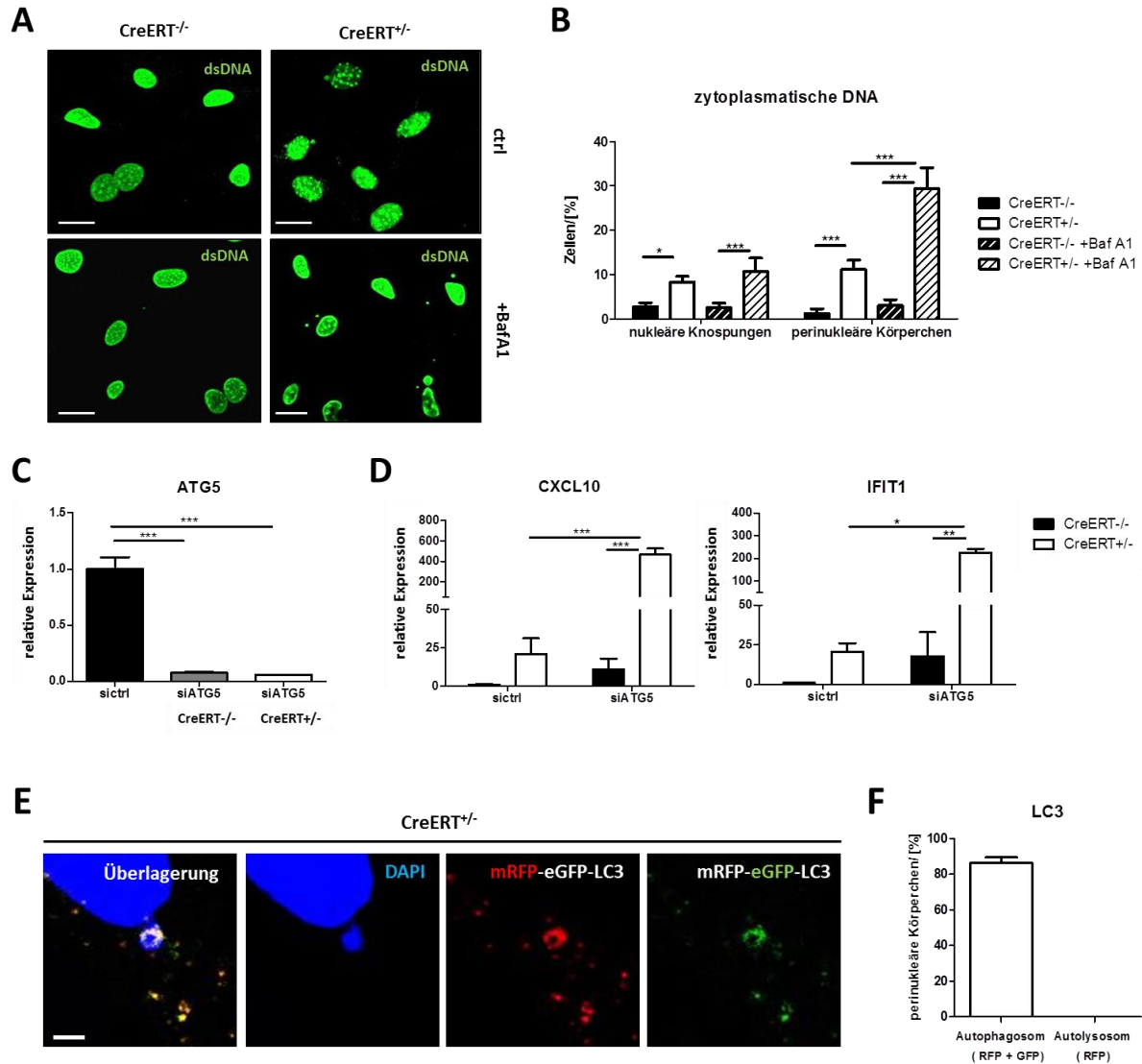


Abb. 22 Abbau extranukleärer, zytoplasmatischer DNA durch Autophagie.

(A) Repräsentative immunzytochemische Färbung gegen dsDNA (Alexa Fluor 488, grün) 3 d post 4-OHT-Induktion und 24 h post der Behandlung von CreERT^{-/-} und CreERT^{+/-}-MEFs mit DMSO (ctrl) bzw. Bafilomycin A1 (BafA1, 10 nM), Maßstab 20 µm. (B) Quantifizierung der dsDNA-Strukturen aus (A), 2-WAY-ANOVA, Bonferri-Posttest, * p < 0,05 und *** p < 0,001 (n = 3, insgesamt 300 Zellen). (C) Analyse der relativen Expression (2^{-ΔΔCp}) von *Atg5* der CreERT^{-/-}-MEFs (x = 1) und CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post Transfektion mit siRNA (*non-targeting* = sictrl, siAtg5) sowie 3 d post Induktion mit 4-OHT via *real time* PCR zur Untersuchung der *Knock-down*-Effizienz; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert ± SEM; 1-WAY-ANOVA, Turkey Posttest; *** p < 0,001 (n = 2). (D) Analyse der relativen Expression (2^{-ΔΔCp}) der ISGs IFIT1 und CXCL10 der transfizierten und induzierten Zellen aus (C); Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert ± SEM; 2-WAY-ANOVA, Turkey-Posttest; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 (n = 2). (E) Mikroskopische Aufnahmen der mit mRFP-eGFP-LC3 transfizierten CreERT^{+/-}-MEFs mit Gegenfärbung der nukleären dsDNA (DAPI, blau) 3 d post 4-OHT-Induktion und Transfektion sowie 2 d post Selektion mit Puromycin; Kolokalisation von perinukleären Körperchen, eGFP und mRFP; Maßstab 2,5 µm. (F) Quantifizierung der perinukleären Körperchen, die mit eGFP/mRFP (Autophagosom) oder nur mit mRFP (Autolysosom) kolokalisieren (n = 3; insgesamt 300 perinukleäre Körperchen).

Die perinukleären Körperchen in RNase H2-defizienten Zellen zeigten eine Umhüllung mit dem Markerprotein LC3-II, die sich in einer Kolokalisation der Fluoreszenzen von eGFP und mRFP darstellte und für den Abbau der dsDNA-Aggregate mittels Autophagosomen sprach. Diese bestand für $86,32\% \pm 3,29\%$ der perinukleären Strukturen. Dennoch konnte keine Kolokalisation der extranukleären DNA einzig mit mRFP detektiert werden.

3.1.16 RNase H2-Defizienz bedingt erhöhte basale Autophagie, aber keinen erhöhten Flux

Nachdem der Abbau zytoplasmatischer dsDNA-Strukturen mittels Autophagie anhand verschiedener Methoden belegt werden konnte (Abschnitt 3.1.15), sollte anschließend begutachtet werden, ob dadurch eine erhöhte basale Autophagie bedingt ist und/oder ein erhöhter autophagischer Umsatz, sog. Flux, besteht. Hierzu wurden die primären MEFs drei Tage nach der Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen mit 100 nM Bafilomycin A1 für 4 h bzw. als Kontrolle mit einem äquivalenten Volumen an DMSO für den gleichen Versuchszeitraum behandelt und anschließend gegen LC3-I und -II im Vergleich zu unbehandelten Zellen geblottet.

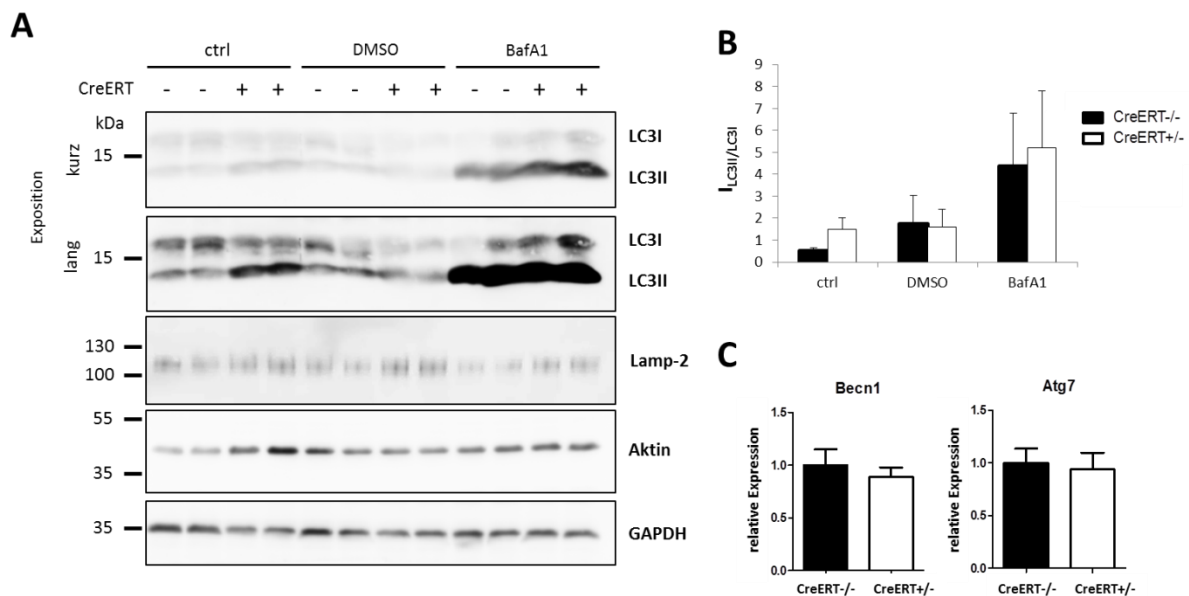


Abb. 23 Erhöhte basale Autophagie in RNase H2 defizienten MEFs.

(A) Repräsentativer Immunblot der CreERT^{-/-} und CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post 4-OHT-Induktion (ctrl) sowie nach Behandlung mit DMSO oder Bafilomycin A1 (BafA1, 100 nM) für 4 h gegen LC3-I/II (kurze und lange Exposition, ~14 kDa/18 kDa), Lamp2 (~110 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) und GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle; RNase H2-Defizienz mit verstärkter, basaler Autophagie, (n = 3). (B) densitometrische Auswertung der LC3-II Banden im Verhältnis zu den LC3-I Signalen der Immunblots aus (A); kein erhöhter Flux sichtbar (n = 3). (A-B) Durchführung in Kooperation mit M. Sc. Sönke Rudnik (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland). (C) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der Autophagiefaktoren *Becn1* und *Atg7* der CreERT^{-/-} (x = 1) gegenüber den CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post 4-OHT-Induktion via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer T-TEST (n = 3).

In den Immunblots wurde eine stärkere Signalgebung bezüglich der lipidierten Form von LC3 (LC3-II) unter Standardbedingungen in den RNase H2-defizienten Kulturen festgestellt, die durch Inhibierung des luminalen Abbaus im Autolysosom mittels Bafilomycin A1 noch stärker hervortrat (Abb. 23A). Analyierte man jedoch das Verhältnis zwischen LC3-II zu -I mittels Densitometrie, ergab sich kein signifikanter Unterschied in den inhibierten Kulturen, der für einen veränderten Flux gesprochen hätte, sodass die Kinetik des autophagischen Prozesses sich nicht zwischen den CreERT^{-/-}- und CreERT^{+/-}-MEFs unterschied (Abb. 23B). Ebenso konnte kein Unterschied auf RNA-Ebene bezüglich der Autophagiegene *Becn1* und *Atg7* festgestellt werden (Abb. 23C).

3.1.17 mTOR-Inhibitoren reduzieren die Expression von ISGs und das Vorkommen zytoplasmatischer dsDNA

In den vorherigen Experimenten konnte das Vorkommen von zytoplasmatischer, doppelsträngiger DNA in RNase H2-defizienten MEFs belegt (Abschnitt 3.1.8), deren immunstimulierende Wirkung aufgezeigt (Abschnitt 3.1.14) und ihr Abbau über Autophagie festgestellt werden (Abschnitt 3.1.15). Um diesen mechanistischen Zusammenhang zu verifizieren und eine Möglichkeit der Reduktion der Immunreaktion im Hinblick auf potenzielle Therapeutika zu erproben, wurden die CreERT^{-/-}- und CreERT^{+/-}-MEFs während der Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen ebenso mit den Hemmstoffen Rapamycin und Torin-1 für 3 Tage behandelt.

Es handelt sich dabei um mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Inhibitoren (Noda und Ohsumi, 1998), durch deren Zusatz die aktivierende Funktion dieses Proteins auf den Initiationsfaktor eIF4F sowie die ribosomale S6Kinase aufgehoben wird. Dadurch sinkt die Translationsrate und ein Übergang von G1- zu S-Phase wird verhindert. Gleichzeitig wird die Erhöhung der Autophagie aufgrund der Dissoziation des ULK-Komplexes von mTORC1 induziert (Saunders *et al.*, 2001; Panwalkar *et al.*, 2004).

Nach dem Zusatz der Inhibitoren konnte eine Reduktion der perinukleären Körperchen sowohl in mit Rapamycin als auch Torin-1 behandelten RNase H2-defizienten MEFs anhand der Quantifizierung immunzytochemischer Färbungen gegen doppelsträngige DNA festgestellt werden. Diese Abnahme war jeweils abhängig von der Konzentration (Abb. 24B). Gleichfalls korrelierte mit diesem Befund die Abnahme der Expression der ISGs *CXCL10* und *IFIT1*, die anhand *real time* PCRs gemessen wurden (Abb. 24A).

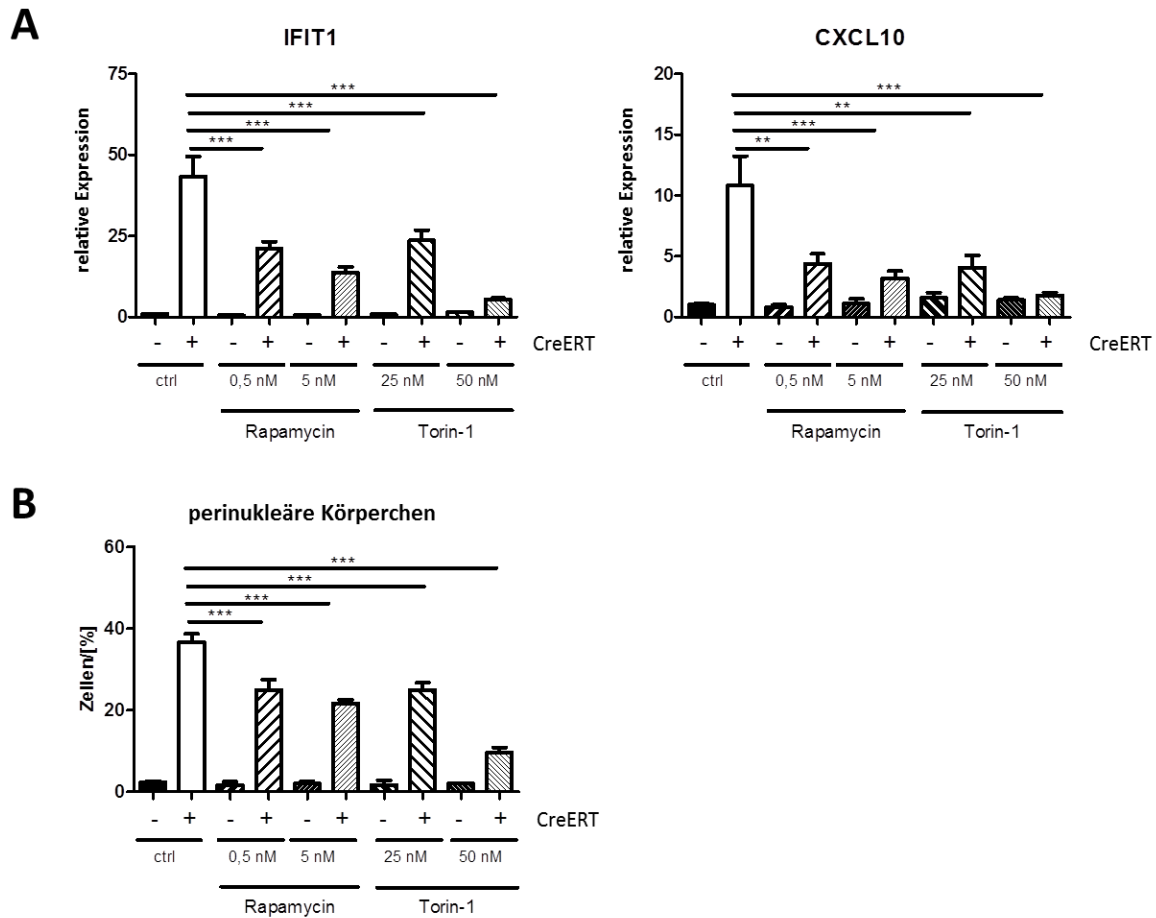


Abb. 24 Einfluss von mTOR-Inhibitoren auf den Phänotyp.

(A) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der ISGs *IFIT1* und *CXCL10* der $CreERT^{-/-}$ ($x=1$) gegenüber den $CreERT^{+/-}$ -MEFs 3 d post 4-OHT Induktion sowie 3 d post mTor-Inhibitorbehandlung (Rapamycin: 0,5 nM oder 5 nM; Torin-1: 25 nM oder 50 nM) via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; 1-WAY-ANOVA, Turkeys Posttest, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ ($n = 2$). (B) Repräsentative Quantifizierung der Kulturen aus (A) bezüglich des Vorkommens perinukleärer Körperchen mittels immunzytochemischer Färbung gegen dsDNA, Mittelwert \pm SEM; 1-WAY-ANOVA, Turkeys Posttest, *** $p < 0,001$ ($n = 2$, insgesamt 300 Zellen).

3.1.18 Keine Vergrößerung des lysosomalen Kompartiments in RNase H2-defizienten MEFs feststellbar

Die Fusion von Lysosom und Autophagosom führt zur Bildung des Autolysosoms, in dem der Abbau der *Cargo* stattfindet (Mizushima, 2007; Damme *et al.*, 2014). Da bereits eine erhöhte basale Autophagie festgestellt wurde (Abschnitt 3.1.16), sollte weiterführend das lysosomale Kompartiment betrachtet werden.

Dazu wurden die primären $CreERT^{+/-}$ -MEFs drei Tage nach Induktion mit 4-OHT auf die Expression der lysosomalen Gene *Lamp1* und *Ctsa* untersucht. Es zeigte sich jedoch im Vergleich zu den $CreERT^{-/-}$ -Zellen kein signifikanter Unterschied (Abb. 25D). Dieser wurde ebenso wenig in einer

immunzytochemischen Färbung gegen das lysosomale Transmembranprotein Lamp1 (Abb. 25C) als auch der Aktivitätsmessung des lysosomalen Enzymes β -Hexosaminidase ersichtlich (Abb. 25B). Stattdessen bestand zwischen beiden Versuchsgruppen eine nahezu identische Expression des lysosomalen Membranproteins Lamp2 unter Standard- als auch serumarmen Bedingungen, die mittels Immunblots analysiert wurden. Zwar führte die Serumarmut zur Erhöhung der Bandenintensität, jedoch in beiden MEF-Kulturen in gleicher Weise (Abb. 23A).

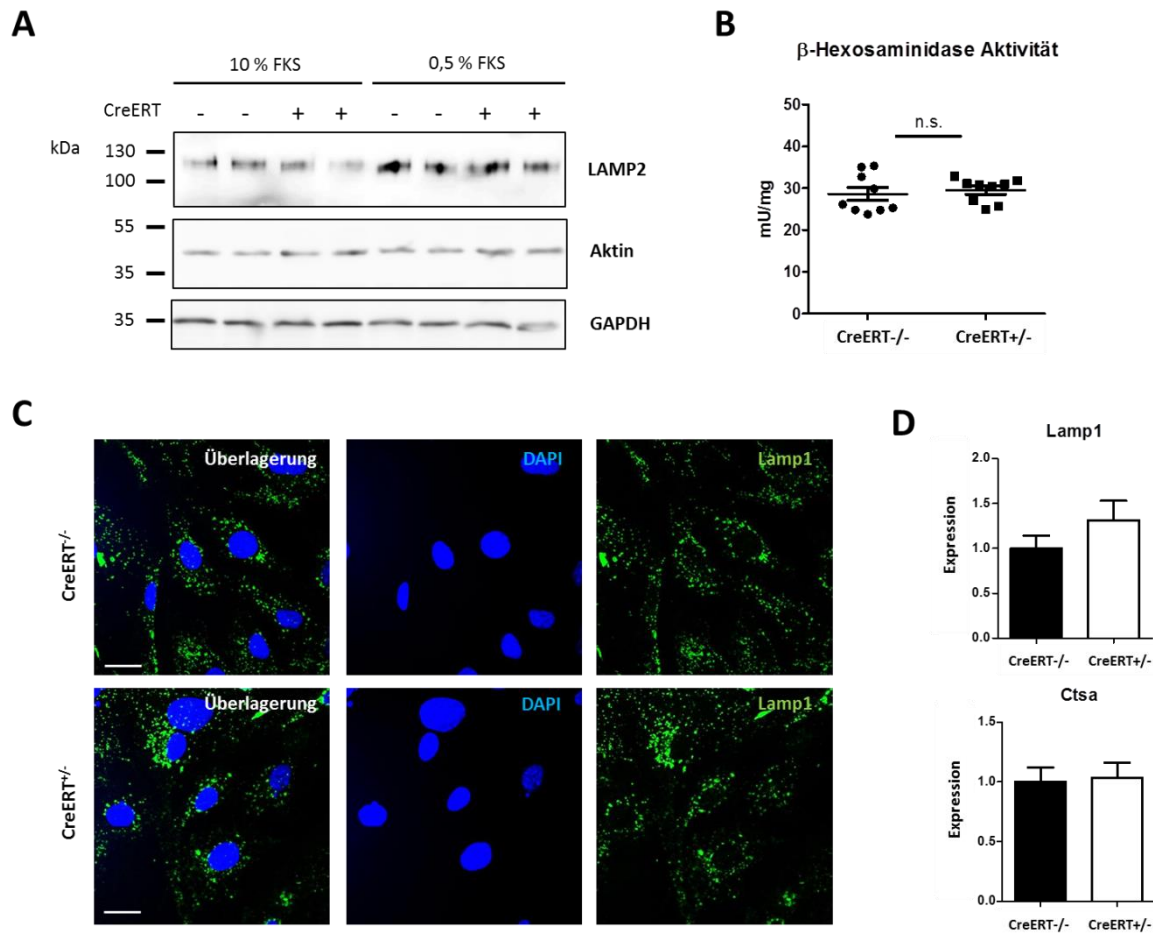


Abb. 25 RNase H2-Defizienz ohne Einfluss auf das lysosomale Kompartiment.

(A) Repräsentativer Immunblot der CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3 d post 4-OHT-Induktion unter Standardbedingungen (10 % FKS) und Serumarmut (0,5 % FKS) gegen Lamp2 (~110 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) und GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle (n = 3). (B) Analyse der Aktivität des lysosomalen Enzymes beta-Hexosaminidase in den der CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3 d post 4-OHT-Induktion; Mittelwert \pm SEM; studentischer T-TEST; n.s. - nicht signifikant (n = 9). (A-B) Durchführung in Kooperation mit M. Sc. Sönke Rudnik (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland). (C) Repräsentative immunzytochemische Färbung der CreERT^{-/-} und ^{+/-}-MEFs 3 d post 4-OHT-Induktion gegen Lamp1 (Alexa Fluor 488, grün) mit Gegenfärbung des Zellkernes (DAPI, blau), Maßstab 20 μ m (n = 2). (D) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der lysosomalen Gene *Ctsa* und *Lamp1* der CreERT^{-/-} (x=1) gegenüber den CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post 4-OHT-Induktion via *real time* PCR; Normalisierung gegen GAPDH, Mittelwert \pm SEM; studentischer T-TEST (n = 3).

3.1.19 Zelluläre Seneszenz in RNase H2-defizienten MEFs

In allen vorangegangenen Experimenten (Abschnitt 3.1.4 bis Abschnitt 3.1.18) wurden nur die direkten Folgen der RNase H2-Defizienz begutachtet. Um jedoch ein Verständnis für die Langzeiteffekte der enzymalen Abwesenheit zu erlangen, sollten in weiterführenden Versuchen spätere Untersuchungszeitpunkte in den Fokus der Analyse gestellt werden.

Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf den Auswirkungen der Aktivierung der DNA-Schadensantwort, die in RNase H2-defizienten MEFs nicht zur Ausprägung eines apoptotischen Phänotyps führte (Abschnitt 3.1.5). Deshalb sollte nun überprüft werden, ob die Zellen stattdessen Merkmale der zellulären Seneszenz aufwiesen. Dieser Zellzustand wird progressiv als Antwort auf genotoxischen Stress ausgebildet und sollte daher anhand zweier Untersuchungszeitpunkte näher betrachtet werden.

Bereits 10 Tage nach der Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen wiesen die RNase H2-defizienten Primärzellen einen Zellzyklusarrest auf, der sich in einer hoch signifikant verringerten prozentualen Rate der CreERT^{+/+}-MEFs in der S-Phase des Zellzykluses äußerte, die nahezu auf 0 % gegenüber dem Kontrollzellniveau von 19,94 % \pm 1,55 % herabgesenkt war (Abb. 26B). Gleichfalls wurde ein verändertes RNA-Profil festgestellt, bei dem die Gene *p19*, *p21* und *IL-6* signifikant höher exprimiert vorlagen (Abb. 26D). Diese erhöhte Expression war ebenso 17 Tage nach der Induktion mit dem Östrogenderivat sichtbar und teilweise stärker ausgeprägt. So bestand für das Gen *Igfbp5* eine 17-fache sowie für *IL-6* eine 5-fache Expressionssteigerung gegenüber den CreERT^{-/-}-MEFs (Abb. 26E), die am davor analysierten Zeitpunkt geringere Zahlenwerte von 1,7 bzw. 3 bezifferten (Abb. 26D). Diese Zunahme über die Zeit wurde auch in der Sekretion des Zytokins in den Zellüberstand deutlich. Während 3 Tage nach der Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen kein Unterschied bezüglich der Interleukin-6 (IL-6)-Konzentrationen zwischen den beiden Zellpopulationen vorlag, nahm die Menge an sekretiertem Interleukin in den RNase H2-defizienten MEFs stetig zu. Dieser Trend wurde auch für das Chemokin KC (auch als CXCL1 bekannt), eine weitere, essentielle Komponente des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP), mit Hilfe von ELISA-Messungen festgestellt (Abb. 26C). Zuletzt wurde die Morphologie der Zellen betrachtet. So zeigte der Vergleich beider Kulturen, dass die RNase H2-defizienten MEFs gegenüber den Kontrollzellen vor allem durch eine stark vergrößerte, abgeflachte Zellform charakterisiert waren (Abb. 26A). Die defiziente Zellpopulation wies außerdem eine stärkere Expression der lysosomalen beta-Galaktosidase auf, welche anhand des Substratumsatzes von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) in einen blauen Farbstoff im sauren Milieu (pH = 6,0) visualisiert wurde (Abb. 26A).

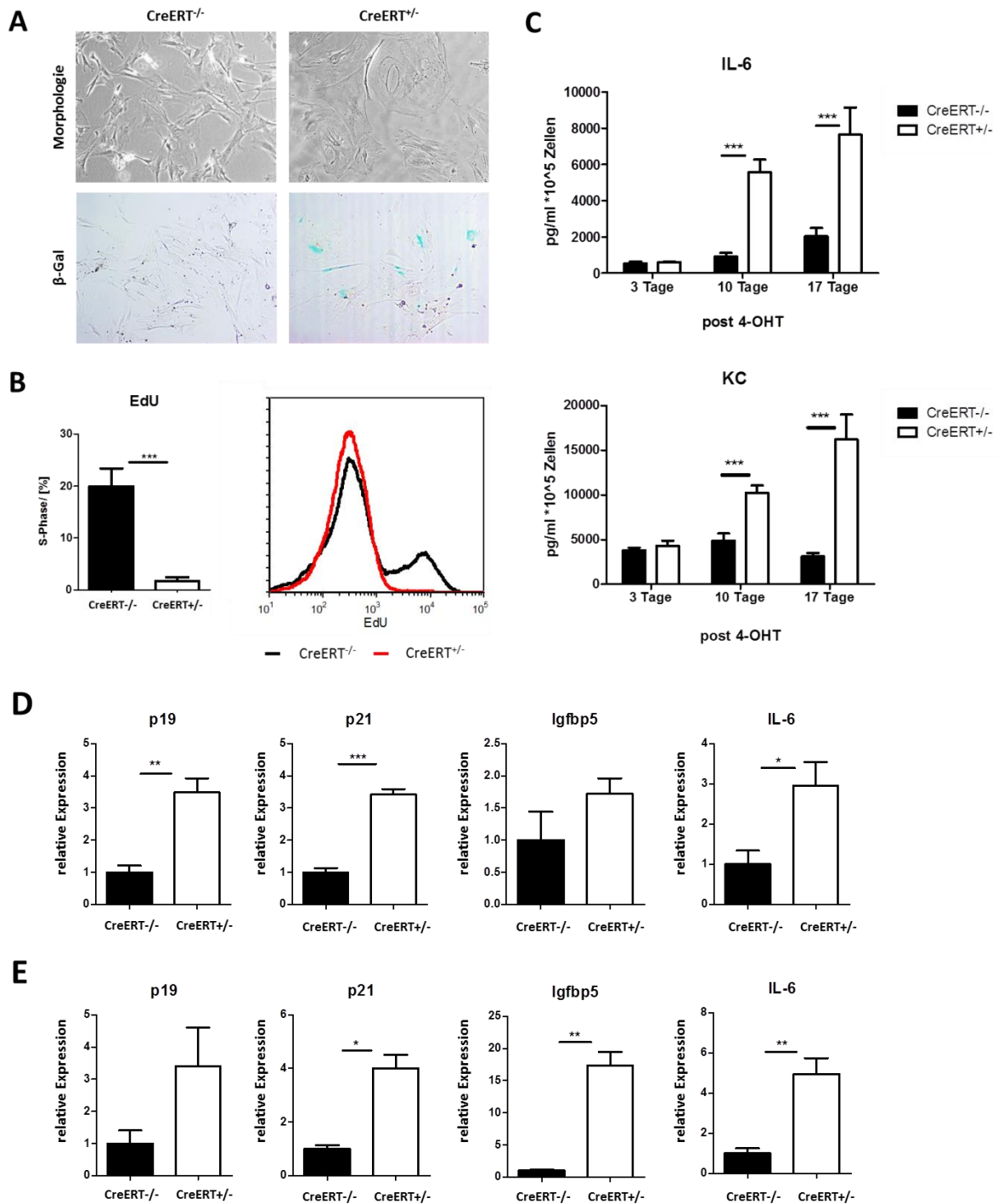


Abb. 26 RNase H2-Defizienz bedingt Seneszenz und SASP.

(A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der CreERT^{-/-}- und ^{+/-}-MEFs 17 d post 4-OHT-Induktion nativ (oben) und nach der Färbung zum Nachweis der sauren β-Galaktosidase (unten, blau), Maßstab 200 μm (n = 3). (B) Analyse der prozentualen Rate an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus mittels EdU-Assay 10 d post 4-OHT-Induktion (n = 3-5). (C) Bestimmung der Konzentration an sekretiertem IL-6 und KC in den Überständen induzierter CreERT^{-/-}- und ^{+/-}-MEFs mittels ELISA an den Untersuchungszeitpunkten 3 d, 10 d und 17 d post 4-OHT-Zusatz; Normalisierung gegen die Zellzahl; Mittelwert ± SEM, 2-WAY-ANOVA, Bonferri-Posttest, *** p < 0,001 (n = 3). (D) Analyse der relativen Expression (2^{-ΔΔC_p}) der Seneszenz-assoziierten Gene *p19*, *p21*, *Igfbp5* und *IL-6* der CreERT^{-/-}- (x=1) gegenüber den CreERT^{+/-}-MEFs 10 d post 4-OHT-Induktion mittels *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert ± SEM; studentischer T-TEST; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 (n = 3). (E) entspricht (D) aber 17 d post 4-OHT-Induktion.

3.1.20 Veränderung des *in-vitro*-Phänotyps der RNase H2-defizienten MEFs in der zellulären Seneszenz

Senescente Zellen sind durch ein vergrößertes, lysosomales Kompartiment und ein erhöhtes Maß an Autophagie gekennzeichnet (Singh *et al.*, 2012). Drei Tage nach der Induktion bestanden bezüglich dieser Merkmale zwischen den CreERT^{-/-}- und CreERT^{+/-}-MEFs keine Unterschiede auf Transkriptionsebene (Abschnitt 3.1.16 und 3.1.18). Daher sollte nun überprüft werden, inwiefern sich dieser Befund 10 Tage nach dem Zusatz von Hydroxytamoxifen geändert hat, da zu diesem Untersuchungszeitpunkt bereits Merkmale der Seneszenz sehr deutlich ausgeprägt waren (Abschnitt 3.1.19).

Dazu wurden *real time* PCRs durchgeführt, die aufzeigten, dass sowohl die Autophagiegene *Becn1* und *Atg7* sowie die lysosomalen Gene *Lamp1* und *Ctsa* signifikant höher in den RNase H2-defizienten MEFs gegenüber ihren 3 d post Induktion analysierten Äquivalenten und in Bezug auf die Kontrollzellen CreERT^{-/-} exprimiert wurden (Abb. 27A/B). Gleichzeitig korrelierte diese Zunahme mit der Abnahme der Expression der ISGs *IFIT1*, *IFIT3*, *CXCL10* und *IRF7* (Abb. 27C).

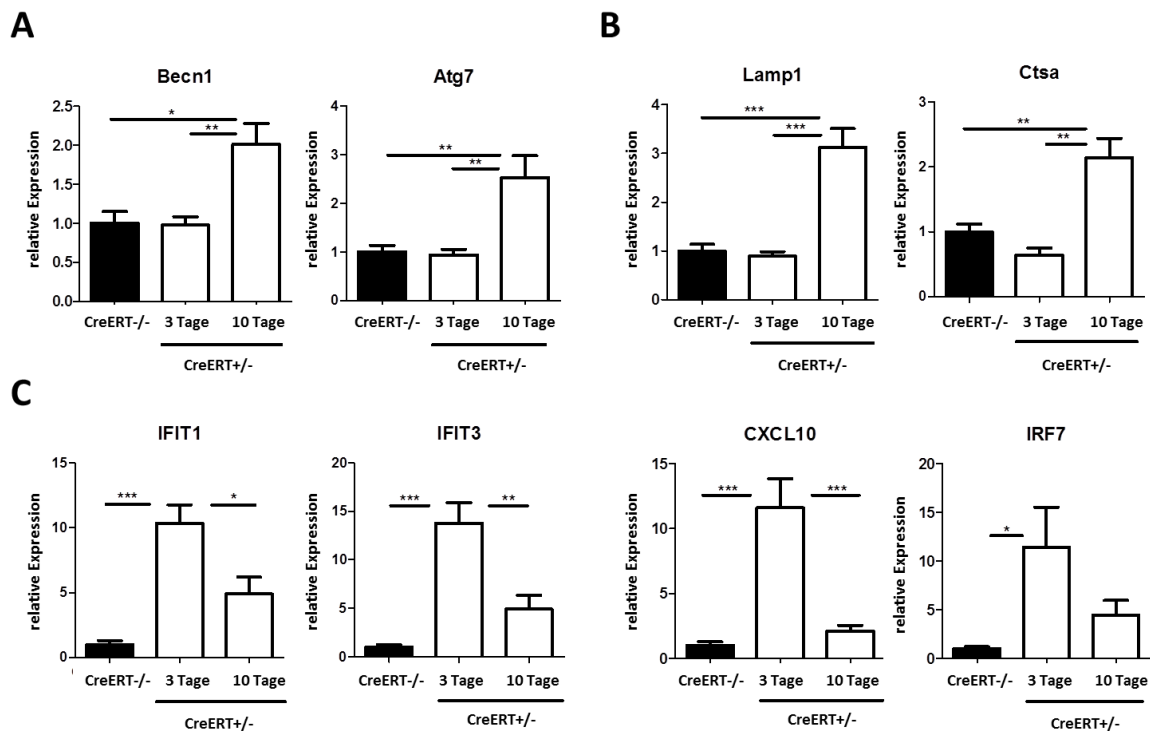


Abb. 27 Langzeiteffekte RNase H2-defizienter Kulturen.

(A-C) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der Autophagiegene *Becn1* und *Atg7* (A), der lysosomalen Gene *Ctsa* und *Lamp1* (B) sowie der ISGs *IFIT1*, *IFIT3*, *CXCL10* und *IRF7* (C) der CreERT^{-/-}- ($x = 1, 3$ d post 4-OHT) gegenüber den CreERT^{+/-}-MEFs 3 d und 10 d post 4-OHT-Induktion via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; 1-WAY-ANOVA; Turkeys Posttest, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ ($n = 3$).

3.1.21 Gleichzeitige p53-Defizienz negiert den seneszenten Phänotyp in RNase H2-defizienten MEFs

Ein zentraler Schlüsselregulator der DNA-Schadensantwort ist der Transkriptionsfaktor p53, der u.a. die Expression von Genen zur Arretierung des Zellzykluses bzw. der Progression zur Seneszenz vermittelt (Helton und Chen, 2007). Daher erlaubt dessen *Knock-out* die Negierung des seneszenten Phänotyps und ermöglicht zugleich eine Trennung der Effekte, die nicht mit diesem assoziiert sind. Bei RNase H2-defizienten Mäusen führt er ferner zur Verzögerung der embryonalen Letalität (Reijns *et al.*, 2012) und erlaubt die Isolierung muriner embryonaler Fibroblasten, die nachfolgend im Vergleich zum induzierbaren *Knock-out* betrachtet wurden.

Zunächst wurden die vorhandenen Linien an murinen, embryonalen Fibroblasten auf den RNaseH2B- und p53-Status analysiert. Im Gegensatz zum loxP-CreERT-basierten System beruht die RNase H2-Defizienz in den p53-defizienten Zellen auf einer *Knock-in*-Mutation im 7. Exon des RNaseH2B-Genes, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt (Reijns *et al.*, 2012). Unabhängig davon wies auch dieses System eine sehr deutlich reduzierte Transkriptmenge der RNaseH2B-Untereinheit auf (Vergleich Abschnitt 3.1.2, Abb. 28B). Im anschließenden Immunblot von Gesamtzelllysaten ergab sich ferner ein dem Genotyp entsprechendes Bandenmuster, bei dem außerdem deutlich wurde, dass durch die Abwesenheit des Transkriptionsfaktors p53 eine verstärkte Expression der Untereinheit B in den p53^{-/-} H2B^{+/+}-Kontrollzellen gegenüber den CreERT^{-/-}-MEFs bestand (Abb. 28A). Diese erhöhte Proteinmenge spiegelte sich auch in einer gesteigerten Aktivität im RNase H Assay wider, bei dem die H2B^{+/+} p53^{-/-} gegenüber den CreERT^{-/-}-Zellen deutlich höhere Umsatzwerte aufwiesen, die bei den RNase H2-defizienten, äquivalenten Zellen bezüglich der RER-Aktivität des Enzymes nahezu nicht vorhanden waren (Abb. 28C).

Nachdem die Abwesenheit der RNase H2 sowie p53 in den Zellen verifiziert wurden, sollten anschließend einige Schlüsselexperimente bezüglich der Ausprägung eines seneszenten Phänotyps durchgeführt werden, die im induzierbaren System klare Unterschiede zwischen Kontroll- und Defizienzgruppe ergeben hatten (Abschnitt 3.1.19 und Abschnitt 3.1.20). Daher wurden zunächst *real time* PCRs durchgeführt, die belegten, dass zwischen den H2B^{+/+} p53^{-/-} und H2B^{-/-} p53^{-/-} MEFs nahezu gleiche Transkriptionsniveaus in Bezug auf die Gene *p19*, *IL-6* und *Igfbp5* vorlagen (Abb. 29A). Ebenso negierte die p53-Defizienz die erhöhte Sekretion des Zytokins IL-6 bei Abwesenheit der RNase H2, dessen Konzentration im Zellüberstand nach 24 h mittels ELISA quantifiziert wurde. Stattdessen lagen die Konzentrationen im Bereich der CreERT^{-/-} MEFs (Abb. 29B).

Zuletzt wurde die Expression der lysosomalen beta-Galaktosidase anhand des Substratumsatzes von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) visualisiert. Es zeigte sich, dass einzig die CreERT^{+/+} MEFs das blau gefärbte Produkt der Substratumsatzreaktion in verstärktem Maße bildeten,

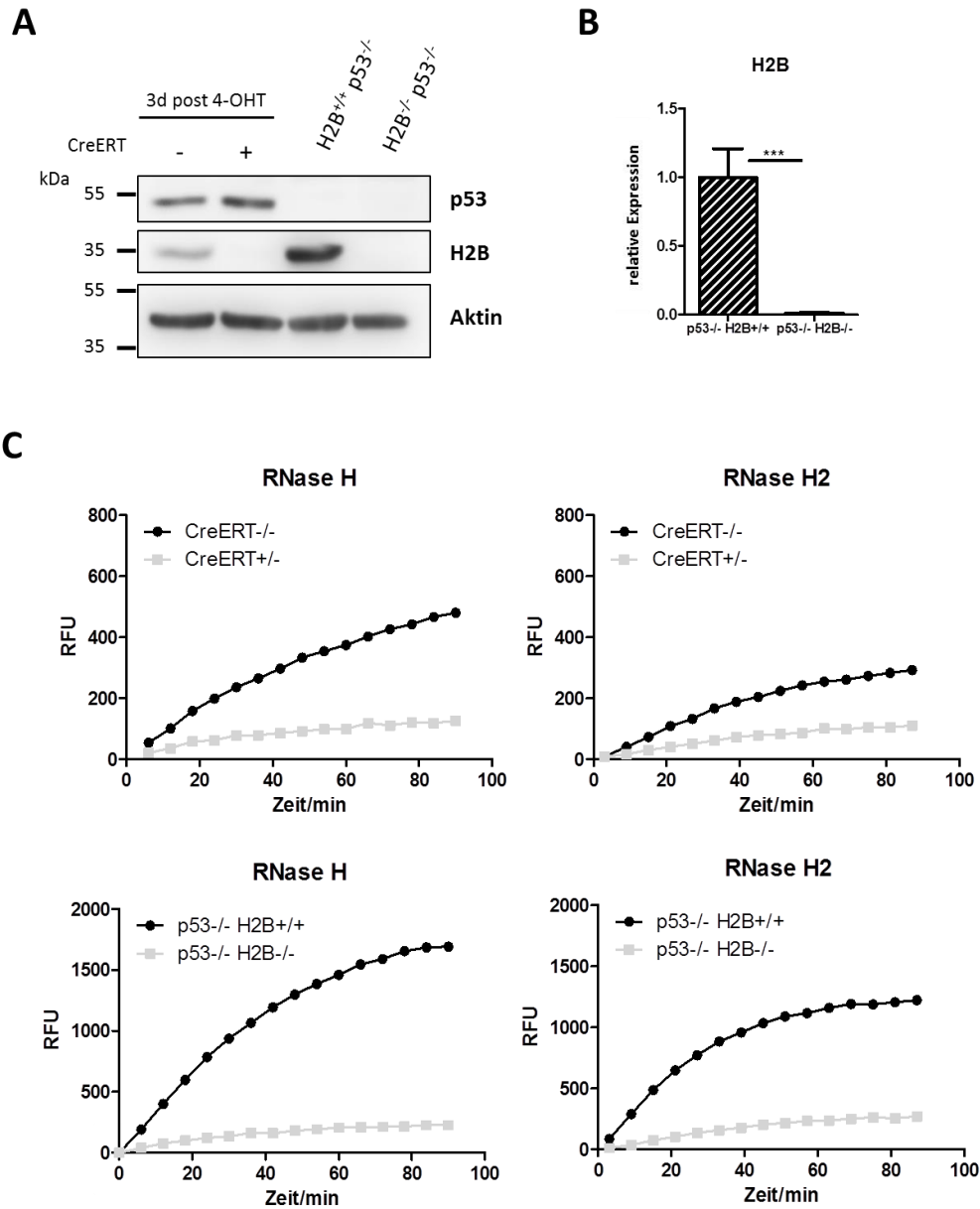


Abb. 28 Initiale Charakterisierung RNase H2/p53-defizienter MEFs.

(A) Repräsentativer Immunblot aller MEF-Kulturen (CreERT^{-/-} bzw. ^{+/-} 3d post 4-OHT; p53^{-/-} H2B^{+/+} bzw. ^{-/-}) auf p53 (53 kDa), RNase H2 (34,7 kDa) und beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n = 2). (B) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der RNaseH2B-Untereinheit der p53^{-/-} H2B^{+/-}- (x=1) gegenüber den p53^{-/-} H2B^{-/-}-MEFs via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM, 2-seitiger studentischer T-TEST, *** p < 0,001 (n= 3). (C) Repräsentative, enzymatische Kinetikmessungen der MEF-Kulturen aus (A) bezüglich der RNase H und H2-Aktivität (n = 1).

während alle weiteren MEF-Linien nahezu keine Blaufärbung im gleichen Versuchszeitraum ausprägten (Abb. 29C). Dieser Befund ist bereits ein Hinweis auf das vergrößerte lysosomale Kompartiment der seneszenten CreERT^{+/-} Primärzellen und steht im Einklang mit den erhöhten Expressionswerten der Gene *Lamp1* und *Ctsa* (Abschnitt 3.1.19). Diese Erhöhung ist jedoch nach dem

Knock-out von p53 sowohl für die lysosomalen Gene als auch Autophagiegene nicht mehr feststellbar (Abb. 29D/E).

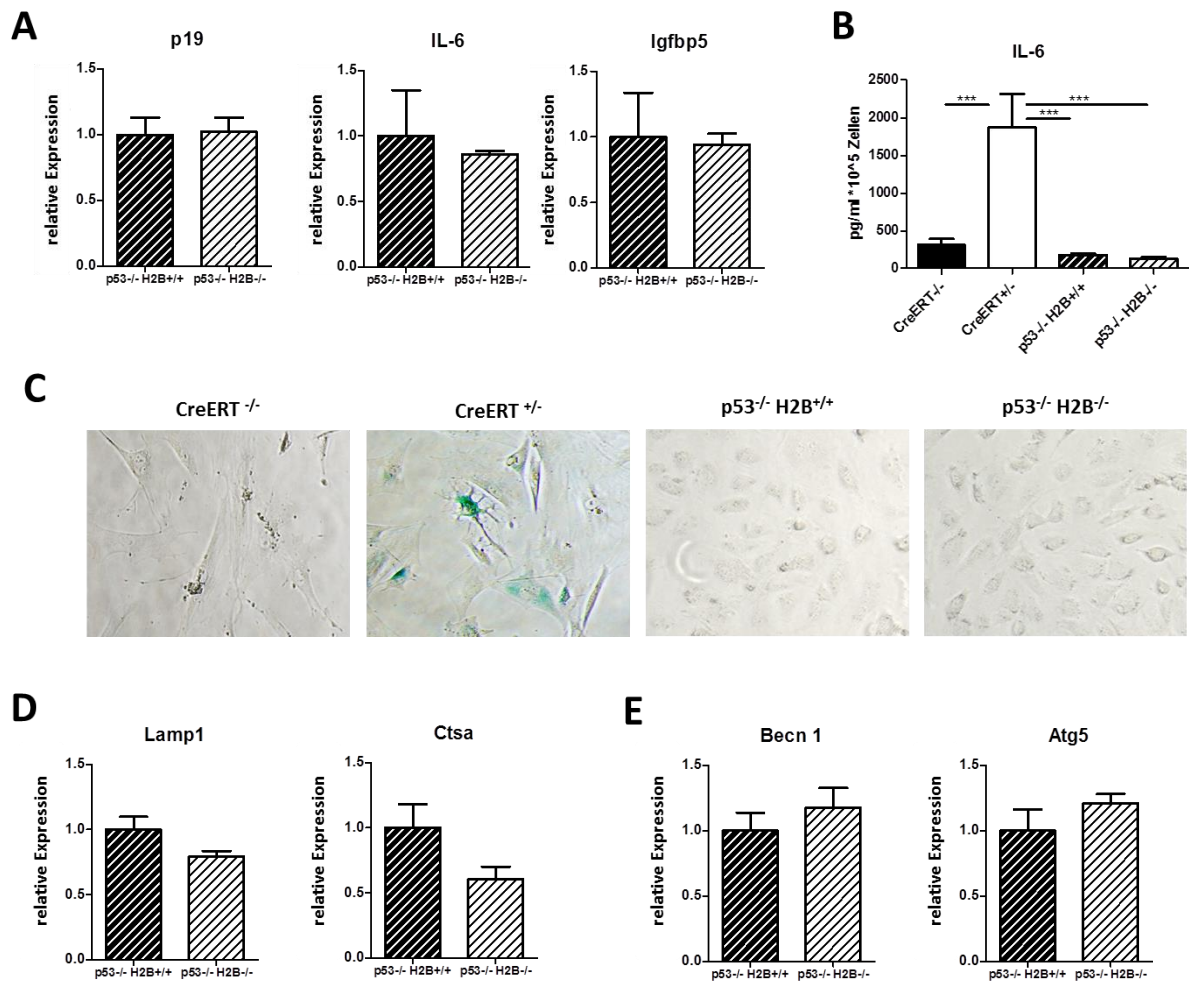


Abb. 29 Gleichzeitige p53-Defizienz rettet den seneszenten Phänotyp RNase H2-defizienter MEFs.

(A) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der Seneszenz-assoziierten Gene *p19*, *Igfbp5* und *IL-6* der p53^{-/-} H2B^{+/+} (x = 1) gegenüber den p53^{-/-} H2B^{-/-}-MEFs via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer T-TEST (n = 3). (B) Bestimmung der Konzentration an sekretiertem IL-6 in den Überständen der MEF-Kulturen (p53^{-/-} H2B^{+/+} bzw. ^{-/-} sowie CreERT^{-/-} bzw. ^{+/-} 17 d post 4-OHT) mittels ELISA; Normalisierung gegen die Zellzahl; Mittelwert \pm SEM, 1-WAY-ANOVA, Turkey-Posttest, *** p < 0,001 (n = 2). (C) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der MEF Kulturen (p53^{-/-} H2B^{+/+} bzw. ^{-/-} sowie CreERT^{-/-} bzw. ^{+/-} 17 d post 4-OHT) nach der Färbung zum Nachweis der lysosomalen β -Galaktosidase (blau) (n = 2). (D/E) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der lysosomalen Gene *Lamp1*, *Ctsa* und der Autophagiegene *Atg5* und *Becn1* der p53^{-/-} H2B^{+/+} (x = 1) gegenüber den p53^{-/-} H2B^{-/-}-MEFs via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer T-TEST (n = 3).

3.2 Folgen der RNase H2-Defizienz im murinen Gehirn

Das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) ist eine erbliche Autoimmunerkrankung, die insbesondere durch eine chronische Entzündung des zentralen Nervensystems (ZNS) resultierend in Kalzifizierungen, Leukoenzephalopathie und zerebraler Atrophie charakterisiert ist (Aicardi und Goutières, 1984; Lanzi *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2007). Des Weiteren zeigt es klinische und subklinische Überschneidungen mit SLE und kongenitalen Virusinfektionen, die ebenso durch erhöhte Interferon-alpha Konzentrationen und dem Vorliegen einer ISG-Signatur gekennzeichnet sind (Rigby *et al.*, 2008; Crow *et al.*, 2009; Ramantani *et al.*, 2010). Als Hauptquelle des Typ I Interferons in AGS-Patienten wurden Astrozyten beschrieben (van Heteren *et al.*, 2008). Damit im Einklang führt die astrogliale Überexpression des Interferons im Mausmodell zur Ausprägung eines AGS-ähnlichen Phänotyps (Akwa *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1999).

Daher sollten nun in weiterführenden Versuchen die Auswirkungen der RNase H2 Defizienz in astroglialen Zellen betrachtet werden um wenn möglich ein *in-vivo* Krankheitsmodell zu etablieren. Gleichfalls galt es einen Teil der vorangegangenen Ergebnisse in einem alternativen System zu überprüfen. Dieses beruhte ebenso auf der Cre-loxP-vermittelten Rekombination, da die vollständige enzymale Abwesenheit zur embryonalen Letalität führt (Reijns *et al.*, 2012; Hiller *et al.*, 2012).

3.2.1 Zucht des konditionalen RNaseH2B *Knock-out* Stammes GFAP_Cre_H2B

Um einen zellspezifischen *Knock-out* in Astrozyten zu erzielen wurde der Stamm GFAP_Cre (FVB-Tg(GFAP-cre)^{25Mes/J}) mit dem RNaseH2B_flox (Rnaseh2b^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/J})-Stamm gekreuzt (Abb. 30A/B). Die homozygoten Nachkommen der F2-Generation der gezüchteten GFAP_Cre_H2B-Linie waren lebensfähig, fertil und phänotypisch unauffällig. Die weitere Zucht der homozygoten Tiere wies des Weiteren keine Besonderheiten bezüglich der Wurfgröße, Anzahl an Totgeburten oder Verteilung der Geschlechter auf (Abb. 30D). Die eindeutige Zuordnung der Genotypen erfolgte anhand von Genotypisierungs-PCRs auf den Lysaten der Schwanzbiopsate, die zwischen der 3. und 6. Woche nach der Geburt der Jungtiere genommen wurden. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einer Agarosematrix erlaubte die Unterscheidung von gefloxtem RNaseH2B-Allel mit einer Bande in Höhe von 390 bp gegenüber einem Wildtyp-Allel von 420 bp. Das GFAP_Cre-Transgen war als Amplifikat von 190 bp eindeutig identifizierbar (Abb. 30C). In allen weiteren Versuchen wurden Versuchstiere als auch aus diesen isolierte Primärkulturen des Genotyps RNaseH2B^{lox/lox} als Kontrollgruppe (abgekürzt als GFAP_Cre^{-/-}) und des Genotyps RNaseH2B^{lox/lox} GFAP_Cre^{+/-} (abgekürzt als GFAP_Cre^{+/-}) als Vergleichs- bzw. Defizienzgruppe verwendet. Um ferner eine maximale Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde mit Geschwisterpaaren (*litter mates*) gearbeitet.

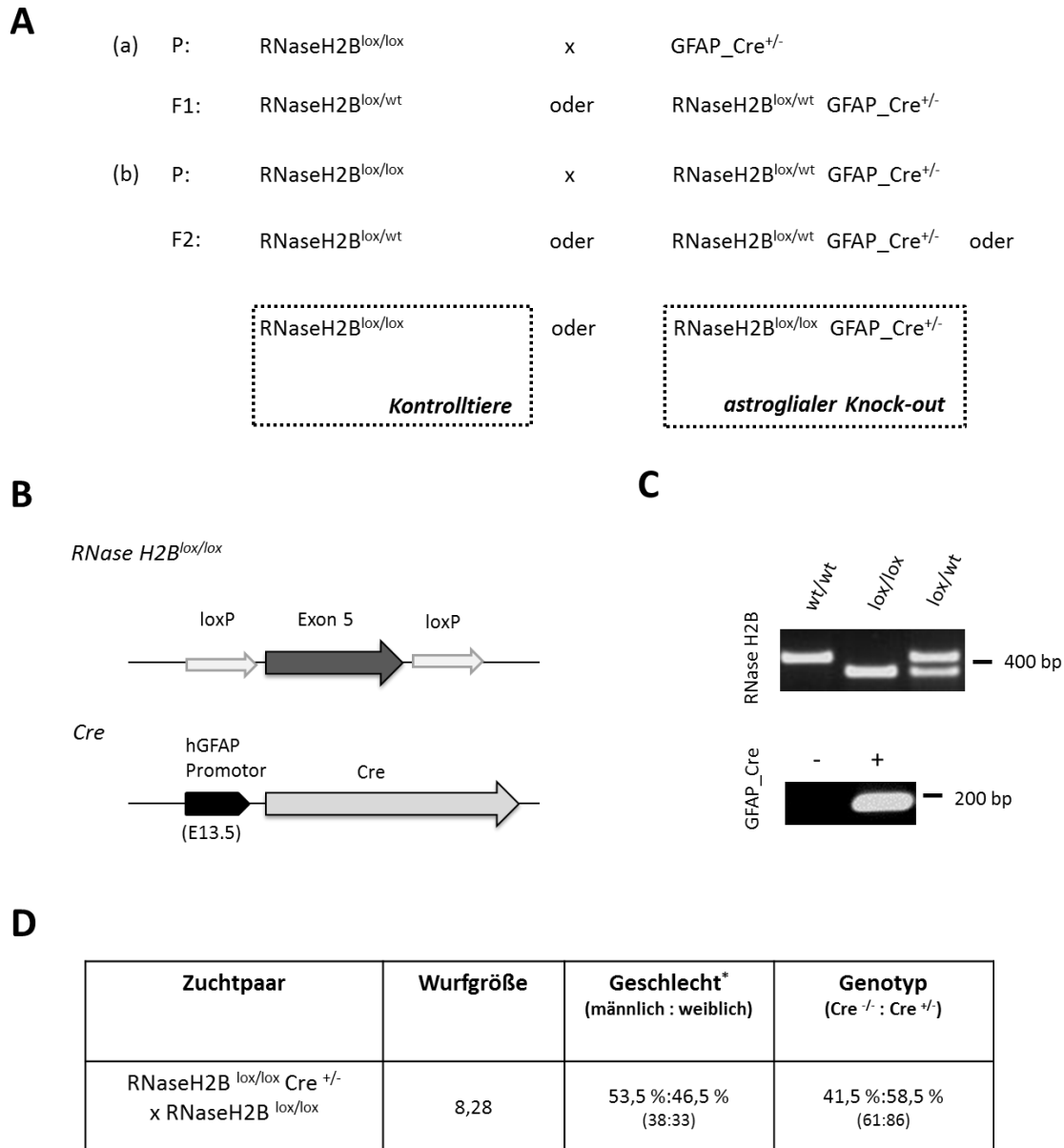


Abb. 30 Zucht des konditionalen *Knock-out*-Stammes GFAP_Cre_H2B.

(A) Verpaarungsschemata zur Zucht des konditionalen RNaseH2B-*Knock-outs* mit Darstellung der Genotypen der Parental- (P) und Filialgenerationen (F1 bzw. F2); alle folgenden Generationen (> F2) basierten auf Geschwisterverpaarungen. (B) Aufbau der transgenen Genbereiche des RNaseH2B_{flox}- sowie GFAP_Cre-Stammes wie unter Abschnitt 2.1.16 beschrieben. (C) Fotografische Dokumentation der Fragmente der Genotypisierungs-PCRs, die mittels Agarosegelelektrophorese (2 % Matrix) aufgetrennt, mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert und bezüglich ihrer Länge (Basenpaar, bp) qualitativ untersucht wurden; RNaseH2B_{flox}-Fragment wt: 420 bp tg: 390 bp; GFAP_Cre-Fragment: 190 bp. (D) Zuchtstatistik der homozygoten Verpaarungen des GFAP_Cre_H2B-Stammes in Bezug auf Wurfgröße, Geschlecht und Genotyp unter Angabe der Verteilungen in % sowie der für die Berechnung zugrunde liegenden Anzahl der Tiere der Klammer; * Einbeziehung aller Tiere > 3 Wochen.

3.2.2 Verifizierung des konditionalen, astroglialen RNase H2-Knock-outs *in-vivo*

Um die Abwesenheit der RNase H2 im GFAP_Cre_H2B-Stamm auf Proteinebene zu belegen wurden immunhistochemische Färbungen gegen das Enzym sowie den astroglialen Marker GFAP in verschiedenen Gehirnarealen durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung der Gehirnschnitte belegte die fehlende Expression der Ribonuklease in Astroglia (Abb. 31A). Jedoch wurde auch ersichtlich, dass eine unspezifische Ausschaltung in neuronalen Zellen erfolgte. Um diesen Sachverhalt zu klären wurden vergleichende Färbungen gegen die RNase H2 mit Gehirnschnitten des EMX1_Cre_H2B-Stammes durchgeführt, bei denen die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion in den Neuronen des Cortex und Hippocampus stattfindet (Abschnitt V.IV, Anhang A4).

Der Vergleich beider Stämme in der Immunhistochemie belegte, dass es keinen Unterschied in Bezug auf die Expression der RNase H2 zwischen den GFAP_Cre^{+/-} und EMX1_Cre^{+/-} Tieren im Bereich des Zerebralcortex und Hippocampus gab (Abb. 32A). Demzufolge beschränkte sich die Defizienz des GFAP_Cre_H2B Stammes nicht nur auf astrogliale Zellen, sondern schloss auch neuronale Zellen ein. Ferner verdeutlichten die Immunfluoreszenzen der Kontrolltiere, dass die höchste Expression des Enzymes in Neuronen und hoch proliferativen Ki67⁺ Zellen der subgranulären Zone des *Gyrus dentatus* vorlag (Abb. 32B). Als weiteren Nachweis der enzymalen Reduktion im Gehirn wurden Gesamtgeweblysate des Organs gegen die Untereinheit A geblottet, in denen eine starke Expressionsminderung zu erkennen war (Abb. 31B).

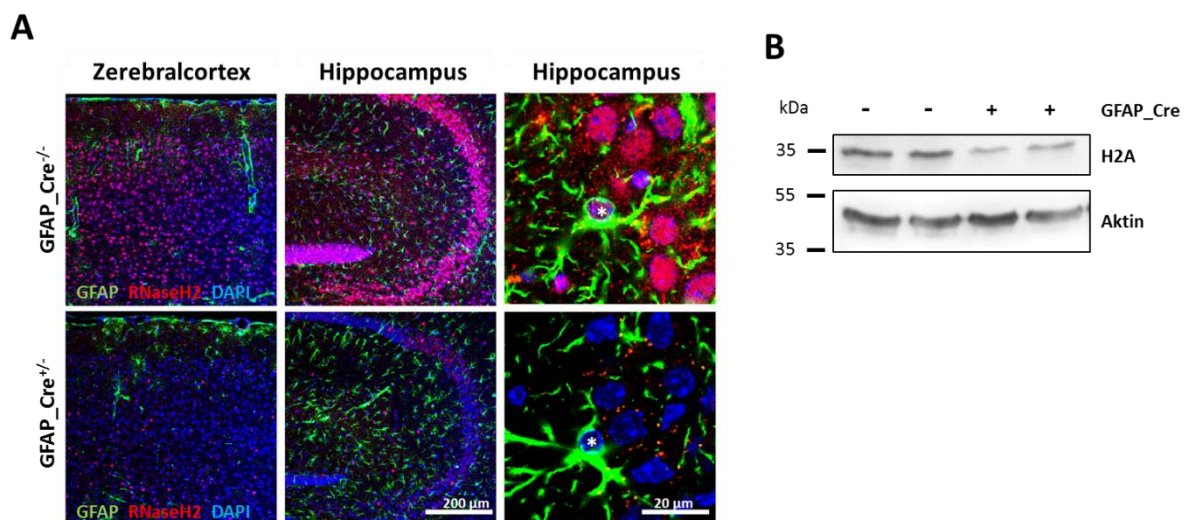


Abb. 31 Verifizierung des konditionalen *Knock-outs* im GFAP_Cre_H2B-Stamm.

(A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten des GFAP_Cre_H2B-Stammes (3 Monate alt) im Bereich des Zerebralcortex und Hippocampus gegen die RNase H2 (Cy3, rot) sowie den astroglialen Marker GFAP (Alexa 488, grün) mit Gegenfärbung der Zellkerne (DAPI, blau); Maßstab wie angegeben, Durchführung durch Dr. Markus Damme (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). (B) Repräsentativer Immunblot von Gehirnllysaten von GFAP_Cre^{-/-}- bzw. ^{+/-}-Tieren (8 Wochen alt) gegen die RNaseH2A-Untereinheit (~35 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle.

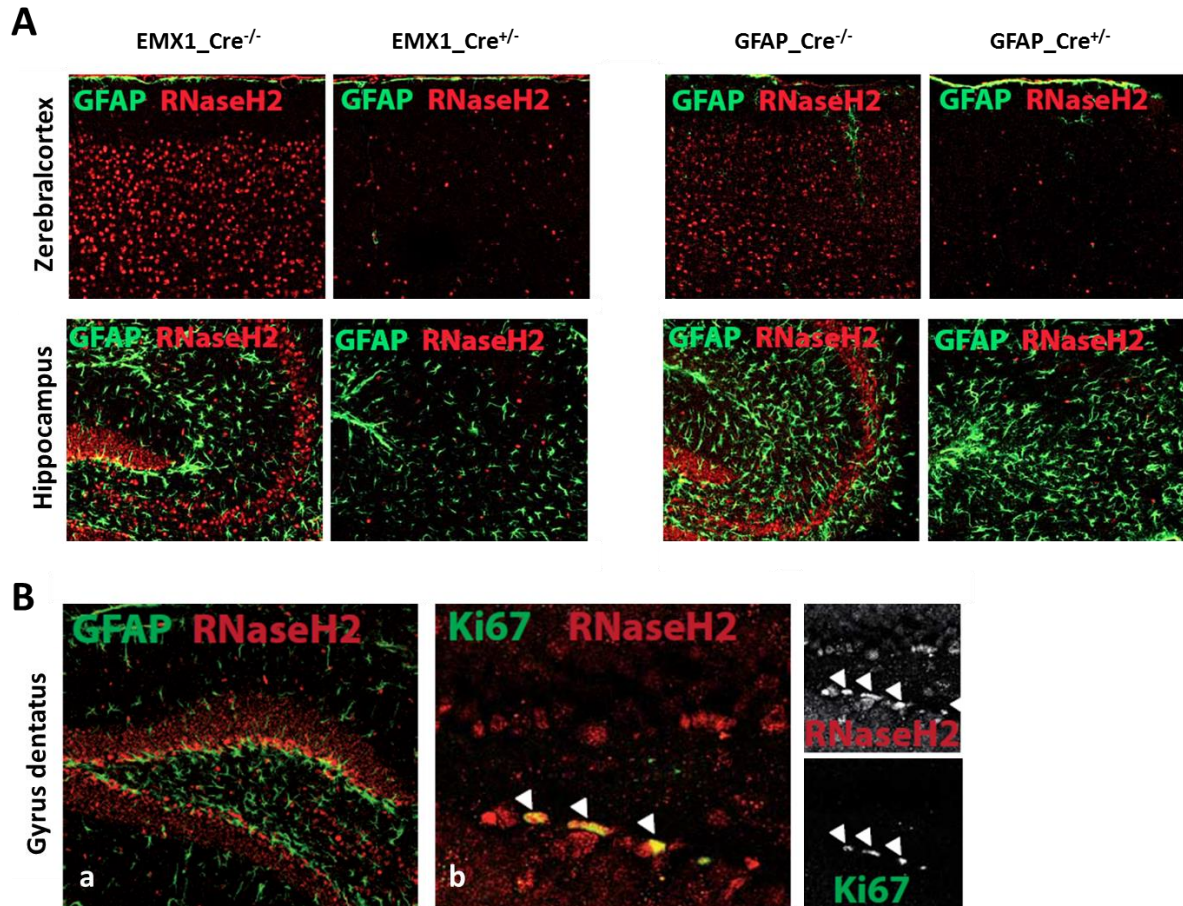


Abb. 32 RNase H2-Expression in Gehirnen der Stämme EMX1_Cre_H2B und GFAP_Cre_H2B.

(A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Kryogehirnschnitten des EMX1_Cre_H2B- (6 Wochen alt) und GFAP_Cre_H2B-Stammes (3 Monate alt) im Bereich des Zerebralcortex und Hippocampus gegen die RNase H2 (Cy3, rot) sowie den astroglialen Marker GFAP (Alexa 488, grün) mit Gegenfärbung der Zellkerne (DAPI, blau). (B) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten der EMX1_Cre^{-/-} Kontrolltiere (6 Wochen alt) im Bereich des Gyrus dentatus gegen die RNase H2 (Cy3, rot) sowie (a) den astroglialen Marker GFAP (Alexa 488, grün) bzw. (b) den Proliferationsmarker Ki67 (Alexa 488, grün) mit Gegenfärbung der Zellkerne; Kolokalisation in den proliferierenden Zellen der subgranulären Zone. (A-B) Durchführung in Kooperation mit Dr. Markus Damme (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland).

3.2.3 RNase H2-Defizienz im Gehirn ohne auffälligen Phänotyp

Patienten, die am Aicardi-Goutières-Syndrom leiden, weisen starke Veränderungen in der Morphologie des Gehirnes auf. Diese äußern sich in Kalzifizierungen, Leukoenzephalopathie und/oder zerebraler Atrophie. Gleichzeitig besteht eine Neuroinflammation, die mit der erhöhten Sekretion der Zytokine CXCL10 und Interferon- α einhergeht (Aicardi und Goutières, 1984; Lanzi *et al.*, 2002; van Heteren *et al.*, 2008).

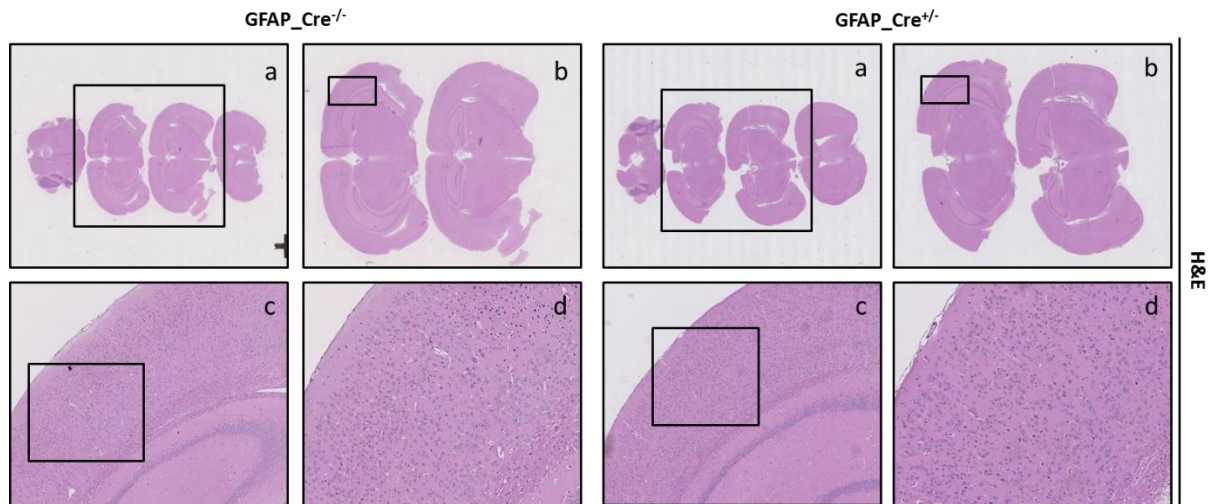


Abb. 33 RNase H2-Defizienz im Gehirn ohne morphologischen Phänotyp.

Repräsentative, histologische Untersuchungen an 8 Monate alten $GFAP_Cre^{-/-}$ und $GFAP_Cre^{+/-}$ -Tieren bezüglich der Morphologie des Gehirnes anhand von H&E-Färbungen ($n = 3$); a-d in steigender Vergrößerung mit schwarz gerahmter Kennzeichnung des vergrößerten Bereiches; Durchführung in Kooperation mit Prof. Dr. Markus Glatzel (Institut für Neuropathologie, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland).

Um zu überprüfen, inwiefern Tiere des $GFAP_Cre_H2B$ -Stammes eine Ausprägung dieser Merkmale aufwiesen, wurden zunächst histologische Untersuchungen an zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die morphologische Begutachtung der Übersichts- und Detailaufnahmen von H&E-gefärbten Sagittalschnitten 8 Monate alter, perfundierter Tiere ergab keine Unterschiede in Bezug auf die Gliederung, zelluläre Strukturierung oder Größe der Gehirne zwischen den $GFAP_Cre^{-/-}$ und $GFAP_Cre^{+/-}$ -Mäusen (Abb. 33). Da anhand dieser Färbung jedoch nur sehr starke morphologische oder zelluläre Veränderungen in Geweben sichtbar werden, sollten anschließend zur detaillierten Charakterisierung des Phänotyps Zell-spezifische Analysen angewendet werden.

Zur Visualisierung der Mikroglia und Astroglia wurden die Markerproteine Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*) und GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) angefärbt. Die mikroskopische Auswertung belegte wiederum, dass sich ebenso das Expressionsmuster dieser Zellarten beim Vergleich beider Versuchstiergruppen an den Untersuchungszeitpunkten 3 und 8 Monate post Geburt nicht unterschied (Abb. 34B/C), sodass keine Mikro- oder Astroglie als Zeichen einer Neuroinflammation vorlag.

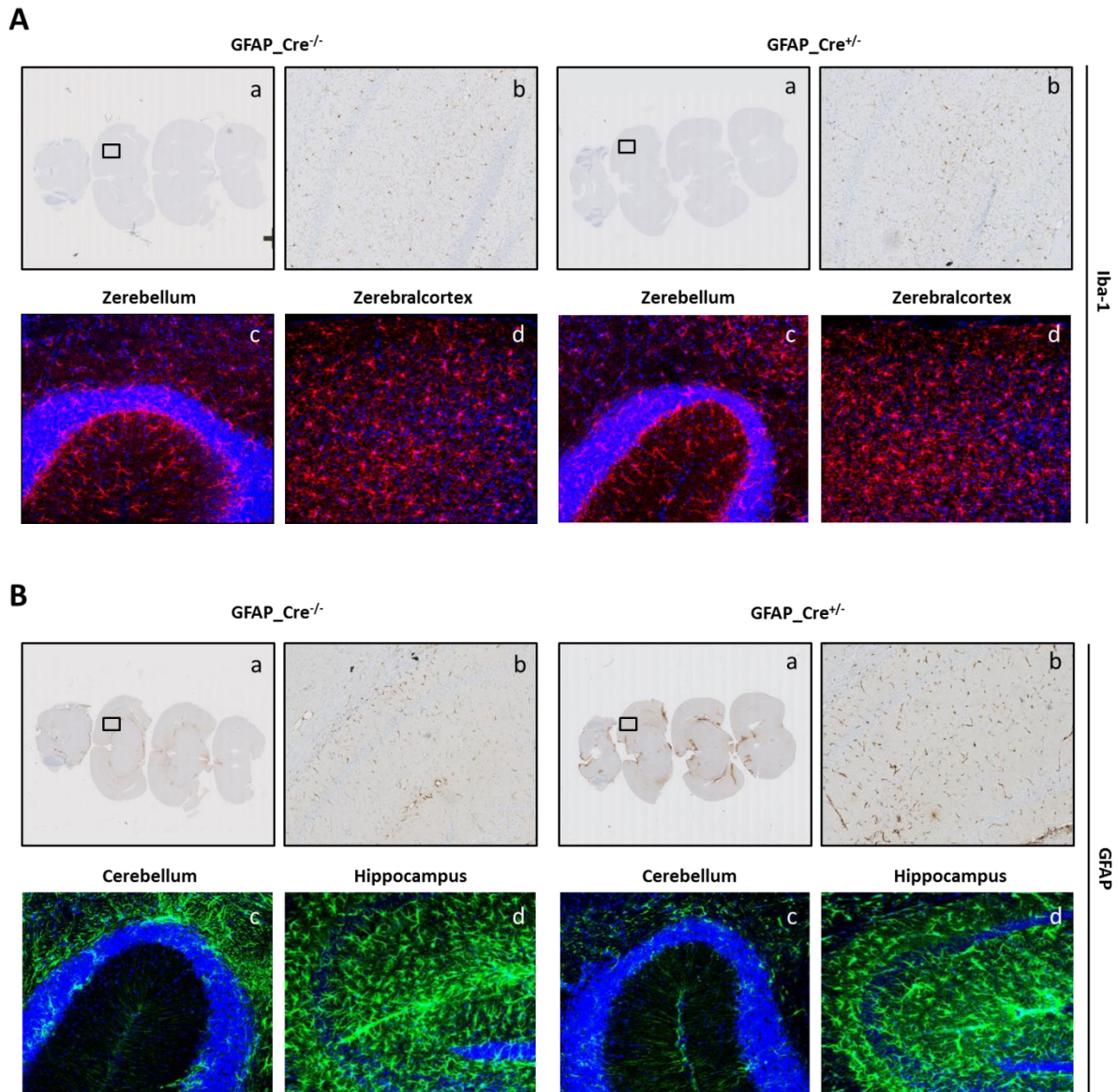


Abb. 34 RNase H2-Defizienz im Gehirn ohne inflammatorischen Phänotyp.

(A) Repräsentative, immunhistologische Färbungen auf Mikroglia anhand des Markers Iba-1 (a-b: braun; c-d: Cy3, rot) von 3 Monate (c-d) und 8 Monate (a-b) alten Tieren des GFAP_Cre-H2B Stammes; Darstellung in steigender Vergrößerung (a-b) mit schwarz gerahmter Kennzeichnung des vergrößerten Bereiches, (n = 3). (B) repräsentative, immunhistologische Färbungen auf Astroglia anhand des Markers GFAP (a-b: braun; c-d: Cy3, rot) von 3 Monate (c-d) und 8 Monate (a-b) alten Tieren des GFAP_Cre-H2B Stammes; Darstellung in steigender Vergrößerung (a-b) mit schwarz gerahmter Kennzeichnung des vergrößerten Bereiches, (n = 3). (A-B) Durchführung der DAB-Färbungen (a-b) in Kooperation mit Prof. Dr. Markus Glatzel (Institut für Neuropathologie, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) und der Fluoreszenzfärbungen (c-d) in Kooperation mit Dr. Markus Damme (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland).

3.2.4 RNaseH2-Defizienz im Gehirn ohne DNA-Schäden und ISG-Signatur

Trotz fehlender klinischer Indikation der Ausprägung einer AGS-ähnlichen Gehirnveränderung (Abschnitt 3.2.3) sollte auf subklinischer Ebene überprüft werden, ob die RNase H2-Defizienz zum Auftreten von DNA-Schäden und den daraus resultierenden Effekten der Seneszenz und Interferon-Signatur führte.

Dazu wurden Gesamtgewebslysate der Gehirne von 8 Wochen alten *GFAP_Cre^{-/-}*- und *GFAP_Cre^{+/-}*-Tieren gegen den DNA-Schadenmarker pH2A.X geblottet. Jedoch konnte in der Höhe des zu erwarteten Molekulargewichtes kein spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 35B). Gleichfalls ergab sich bei der Untersuchung der Expression der Interferon-stimulierten Gene (ISGs) *IFIT1*, *IRF7* und *CXCL10* in den Gehirnen von P3- bis P4-Tieren mittels *real time* PCR kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 35A), die auch in der Färbung von Kryoschnitten 8 Wochen alter Mäuse auf den Seneszenzmarker beta-Galaktosidase das gleiche, negative Resultat aufwiesen (Abb. 35C).

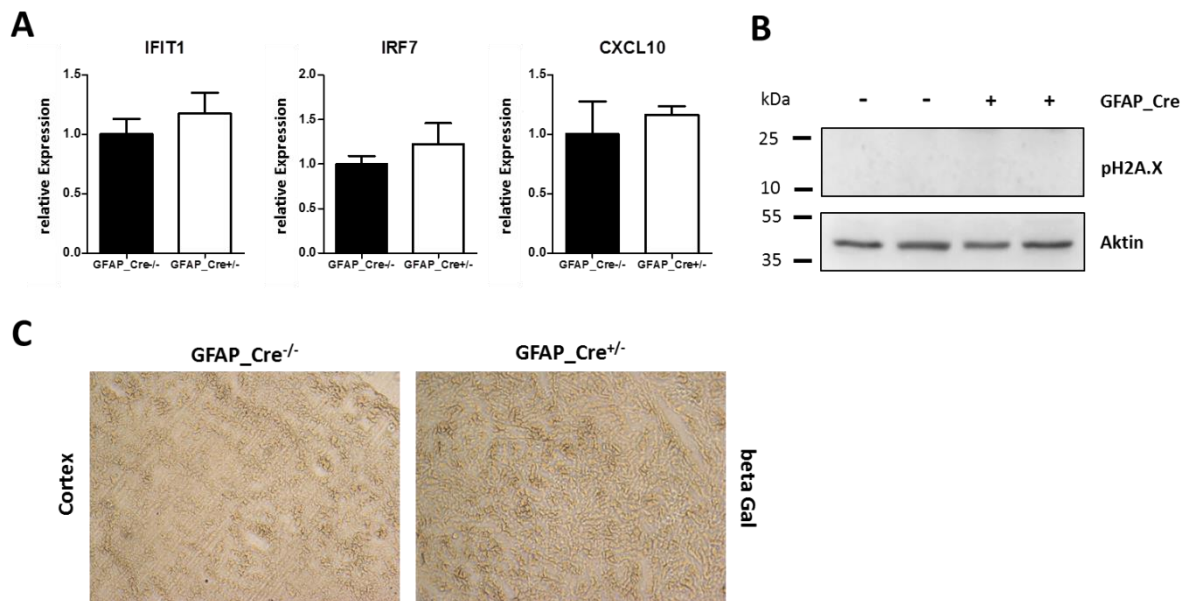


Abb. 35 Abwesenheit eines subklinischen Phänotyps in *GFAP_Cre^{+/-}*-Tieren.

(A) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der ISGs *IFIT1*, *IRF7* und *CXCL10* in den Gehirnen von *GFAP_Cre^{-/-}* ($x = 1$) gegenüber *GFAP_Cre^{+/-}*-Tieren (P3-4) via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST ($n = 5$). (B) Repräsentativer Immunblot von Gehirnllysaten der *GFAP_Cre^{-/-}*- bzw. *GFAP_Cre^{+/-}*-Tiere (8 Wochen alt) gegen den Doppelstrangbruch (DSB)-Marker pH2A.X (15 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle. (C) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von *GFAP_Cre^{-/-}*- bzw. *GFAP_Cre^{+/-}*-Gehirnschnitten (8 Wochen alt) im Bereich des Cortex nach der Färbung zum Nachweis der lysosomalen β -Galaktosidase.

3.2.5 Astrogliale, RNase H2-defiziente Primärkulturen mit ISG-Signatur und Proliferationsdefizit mit vorzeitiger, zellulärer Seneszenz

Das Auftreten perinukleärer Körperchen als Substrat des cGAS-STING-Signalweges ist abhängig vom Proliferationsstatus der Zelle (Abschnitt 3.1.10 und 3.1.11). Jedoch proliferieren Astrozyten im adulten Organismus unter physiologischen Bedingungen nicht, sondern werden erst durch Induktion von Gewebsschäden zur Hyperproliferation angeregt. Dieser pathologische Prozess wird als reaktive Astroglieose bezeichnet und umfasst ein Spektrum potentieller molekularer, zellulärer und funktionaler Veränderungen in astroglialen Zellen als Antwort auf alle Formen und Schweregrade von ZNS-Verletzungen und -Erkrankungen (Sofroniew und Vinters, 2010).

Um daher zu überprüfen, ob die Änderung des Proliferationsstatus zur Ausprägung eines Phänotyps führt, wurden astrogliale Primärkulturen angelegt. Diese verifizierten zusätzlich den *Knock-out* der RNase H2, die weder im Immunblot noch in der Immunzytochemie in den GFAP_Cre^{+/-}-Zellen zu detektieren war (Abb. 36A/B). Die Reinheit der Kulturen wurde zusätzlich durch Färbungen gegen den astroglialen Marker GFAP belegt (Abb. 36A), der des Weiteren beim Vergleich beider Versuchsgruppen keinen Unterschied in der Expressionsstärke im Immunblot aufwies (Abb. 36B).

Die Analyse der Primärkulturen sieben Tage nach der Isolierung belegte zudem, dass eine ISG-Signatur in den RNase H2-defizienten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorlag. Dazu wurden die Transkriptmengen der ISGs *IFIT1*, *IRF7* und *IFIT2* mittels *real time* PCR quantifiziert (Abb. 37A).

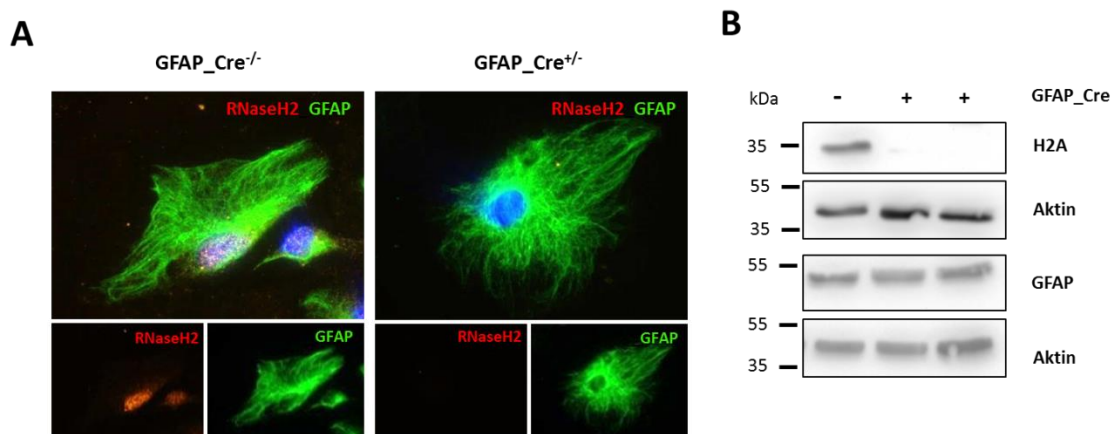


Abb. 36 Verifizierung des astroglialen *Knock-outs* im *in-vitro*-System.

(A) Repräsentative, immunzytochemische Färbungen der GFAP_Cre^{-/-} und ^{+/-}-Primärzellen 7 d post Isolierung gegen die RNase H2 (Cy3, rot) sowie den astroglialen Marker GFAP mit Gegenfärbung der Zellkerne (DAPI, blau), (n = 3). (B) Repräsentativer Immunblot von GFAP_Cre^{-/-} bzw. ^{+/-}-Primärzellen 7d post Isolierung gegen die RNaseH2A-Untereinheit (~35 kDa), den Astroglia-Marker GFAP (50 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n = 2).

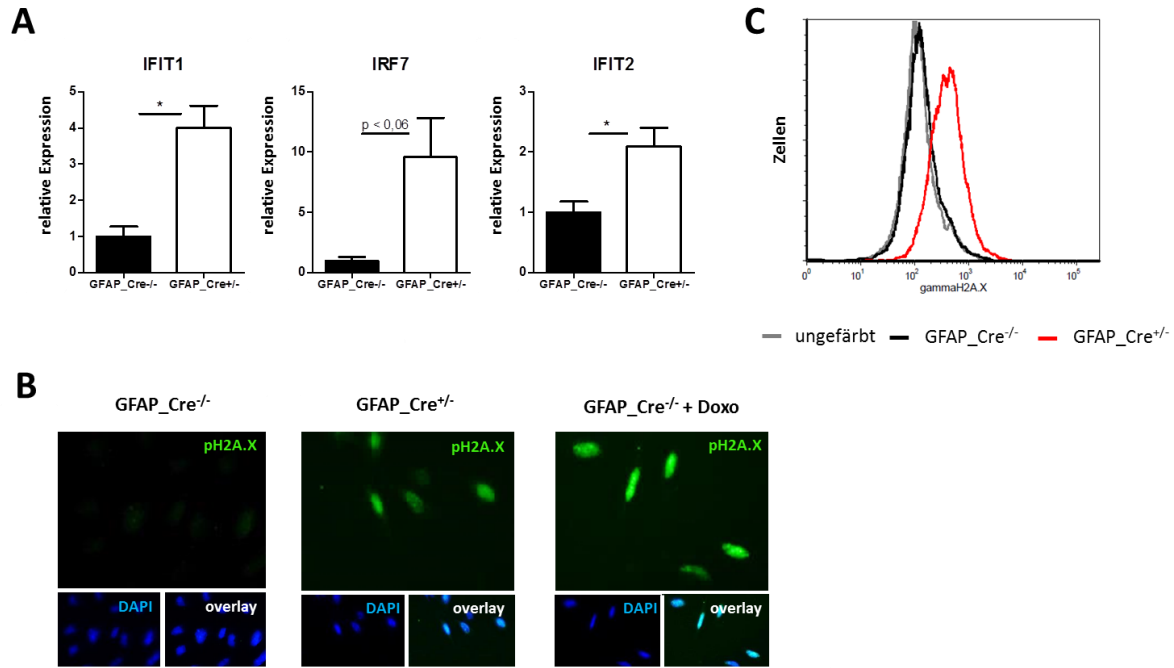


Abb. 37 Vorliegen einer ISG-Signatur und Vorkommen von DNA-Schäden in RNase H2-defizienten primären Astrozyten.

(A) Analyse der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) der ISGs *IFIT1-2* und *IRF7* der GFAP_Cre^{-/-} ($x=1$) gegenüber den GFAP_Cre^{+/-}-Astrozyten 7 d post Isolierung via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert \pm SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST; * $p < 0,05$ ($n=3$). (B) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von ungefärbten (grau) und gegen pH2A.X gefärbten CreERT^{-/-} (schwarz) bzw. ^{+/-} (rot)-Astrozyten 7 d post Isolierung ($n=3$). (C) Repräsentative immunzytochemische Färbung der GFAP_Cre^{-/-}- bzw. ^{+/-}-Astrozyten sowie mit 1 μ M Doxorubicin (Doxo) für 24 h behandelter Kontrollzellen gegen pH2A.X (Alexa Fluor 488, grün) 7 d post Isolierung mit Gegenfärbung des Nukleus (DAPI, blau) ($n=3$).

Ferner wiesen die GFAP_Cre^{+/-}-Kulturen verstärkt DNA-Schäden auf, die mittels immunzytochemischer Färbungen sowie durchflusszytometrischer Analysen gegen den Marker pH2A.X visualisiert wurden (Abb. 37B/C). Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurden zudem GFAP_Cre^{-/-} Zellen mit dem Topoisomerase-Inhibitor Doxorubicin behandelt, der zur Induktion starker DNA-Schadenmuster im Nukleus führte (Abb. 37B).

Die Schädigung der DNA war mit einer reduzierten Proliferationsrate assoziiert, die sich in der verringerten Anzahl von Zellen in der S-Phase des Zellzykluses äußerte. Diese wurden anhand des EdU-Assays durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 38A). Jedoch führte die Beeinträchtigung der genomischen Integrität nicht zum Auftreten von Apoptose, die sich in einem Spaltungsprodukt des Markers PARP-1 im Immunblot geäußert hätte. Einzig in der Positivkontrolle, bei der GFAP_Cre^{-/-}-Zellen für 24 h mit Doxorubicin in letaler Konzentration behandelt wurden, war dies ersichtlich (Abb. 38B). Andererseits zeigten die primären, defizienten Astrozyten gegenüber den unter äquivalenten

Bedingungen kultivierten Kontrollzellen sieben Tage nach der Isolierung bereits eine vergrößerte, abgeflachte Morphologie (Abb. 38C), jedoch keine messbare Sekretion des Interleukins 6 (Abb. 38D).

Um daher zu testen, ob es zur Ausbildung von Seneszenz kam, die bereits in den induzierbaren MEFs beobachtet werden konnte (Abschnitt 3.1.19), wurden die Primärzellen auf die Veränderung der Expression der Gene *p21*, *p53* und *Igfbp5* zehn Tage nach der Isolierung untersucht. Zusätzlich wurden zum Vergleich Kontrollzellen mit der mutierten Form des H-Ras-Onkogens transduziert, dessen Überexpression zur Ausbildung von Seneszenz führt (Serrano *et al.*, 1997) und damit als Positivkontrolle genutzt werden kann. Die erhöhte Expression der H-Ras^{G12V}-Mutante wurde mittels Immunblot verifiziert (Abb. 39A). Sowohl in den GFAP_Cre^{+/-}- als auch in den transduzierten Zellen war eine Erhöhung der analysierten Transkripte gegenüber den GFAP_Cre^{-/-}-Kulturen ersichtlich (Abb. 39B/D).

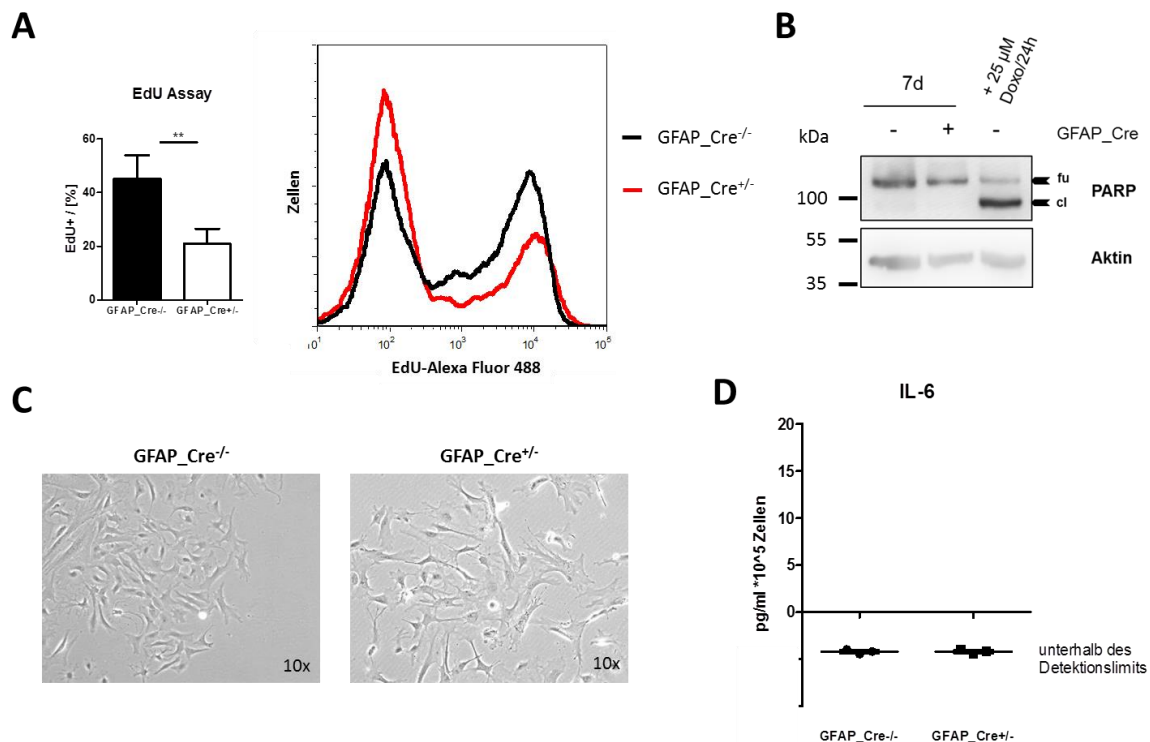


Abb. 38 Astrogliale RNase H2-Defizienz ohne apoptotischen Phänotyp.

(A) Prozentuale Bestimmung der Zellen in S-Phase mittels EdU Assay (4 h Puls) von GFAP_Cre^{-/-}- und ^{+/-}-Astrozyten 7 d nach der Isolation; repräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Messungen von GFAP_Cre^{-/-}- (schwarz) und ^{+/-}- (rot)-Astrozyten aufgetragen gegen die logarithmische Fluoreszenzintensität des EdU-Analogons; studentischer, zweiseitiger T-TEST; ** p < 0,01 (n = 4). (B) Repräsentativer Immunblot der GFAP_Cre^{-/-}- und ^{+/-}-Astrozyten 7 d post Isolation sowie mit 25 μM Doxorubicin (Doxo) für 24 h behandelter Kontrollzellen als Positivkontrolle gegen den Apoptose-Marker PARP (cl – *cleaved* mit 89 kDa, fu - *full length* mit 116 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n = 2). (C) Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahmen von GFAP_Cre^{-/-}- und ^{+/-}-Astrozyten 7 d nach der Isolation (n = 3). (D) Bestimmung der Konzentration an sekretiertem IL-6 in den Überständen der primären Astrozyten mittels ELISA am Untersuchungszeitpunkt 7 d post Isolation; Normalisierung gegen die Zellzahl (n = 3).

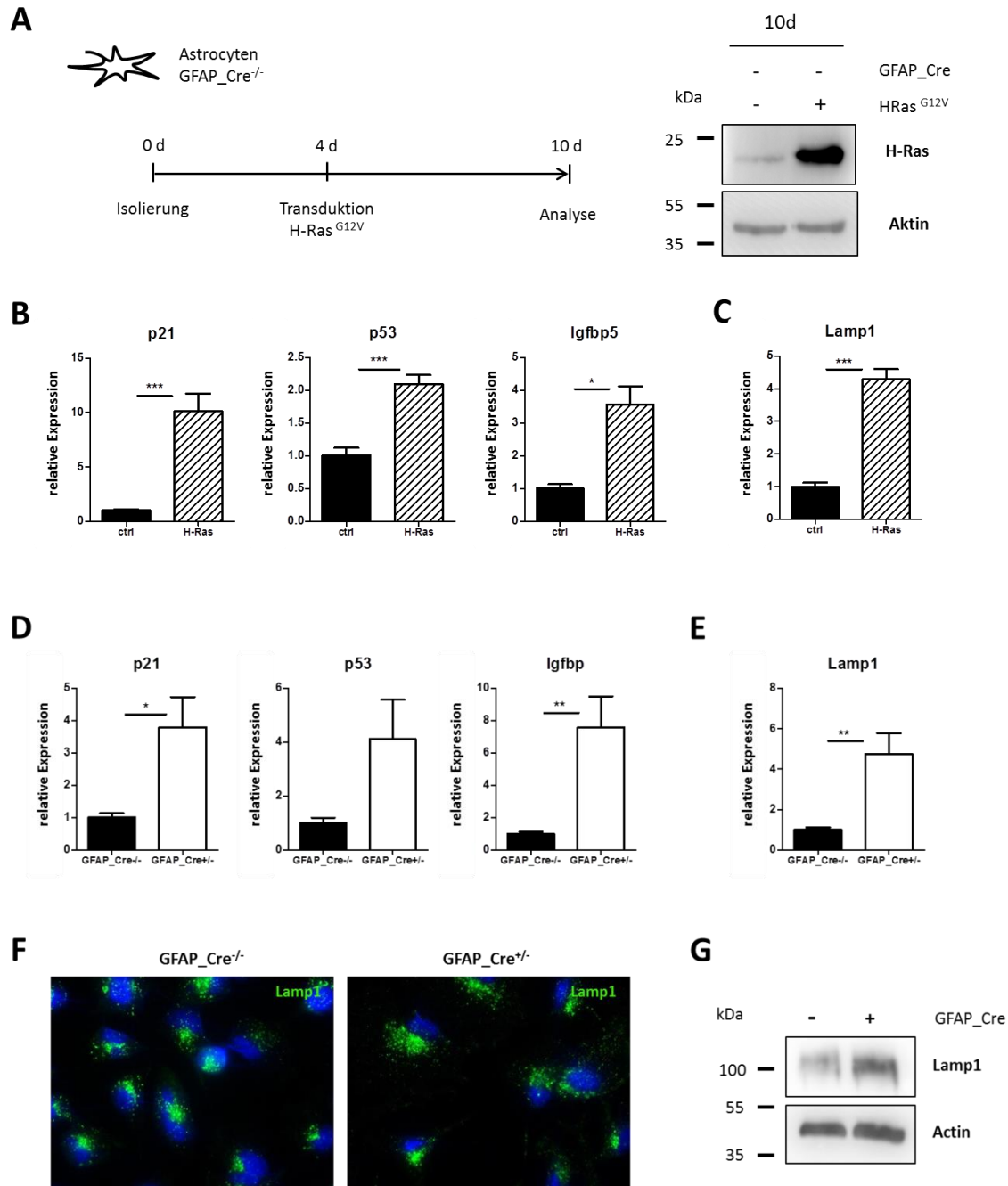


Abb. 39 Astrogliale RNase H2-Defizienz mit Zeichen von zellulärer Seneszenz.

(A) Durchführungsschemata zur Generierung der seneszenten Positivkontrolle: 4 Tage nach der Isolierung primärer GFAP_Cre^{-/-}-Astrozyten wurden diese mit dem H-Ras^{G12V} Onkogen transduziert und bis zum Tag 10 unter Selektionsdruck durch Antibiotikazusatz kultiviert und anschließend für Experimente genutzt; repräsentativer Immunblot zur Kontrolle der Transduktionseffizienz gegen H-Ras (21 kDa) sowie beta-Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle (n = 1). (B-E) Analyse der relativen Expression (2^{-ΔΔCp}) der Gene *p21*, *p53*, *Igfbp5* und *Lamp1* der GFAP_Cre^{-/-} (x = 1) gegenüber den GFAP_Cre^{-/-}-HRas^{G12V} (B-C) oder GFAP_Cre^{+/-}-Astrozyten (D,E) 10 d post Isolierung via *real time* PCR; Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert ± SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (n = 3). (F) Repräsentative, immunzytochemische Färbung der primären Astrozyten (GFAP_Cre^{-/-} bzw. ^{+/-}) 7d post Isolierung gegen Lamp1 (Alexa Fluor 488, grün) mit Kernfärbung (DAPI, blau) (n = 2). (G) Repräsentativer Immunblot der primären Astrozyten (GFAP_Cre^{-/-} bzw. ^{+/-}) 7d post Isolierung gegen Lamp1 sowie beta-Aktin als Ladekontrolle (n = 2).

Diese Expressionssteigerung beschränkte sich nicht nur auf Seneszenz-assoziierte Gene, sondern konnte auch für das lysosomale Gen *Lamp1* gemessen werden (Abb. 39C/E). Damit im Einklang wurde für die defizienten Primärzellen eine stärkere Bande im Immunblot gegenüber der Kontrolle detektiert, die dem Molekulargewicht des lysosomalen Membranproteins Lamp1 entsprach (Abb. 39G). Auch in der immunzytochemischen Färbung gegen das Markerprotein wurde ersichtlich, dass vermutlich eine höhere Anzahl an Lysosomen bei der Abwesenheit der RNase H2 vorlag (Abb. 39F).

3.2.6 DNA-Schäden erhöhen Immunantwort

Das angeborene Immunsystem muss schnell und effizient auf das Eindringen von Pathogenen reagieren um eine Ausbreitung im Organismus zu verhindern. Dabei wurde gezeigt, dass die Schädigung des Genoms einen positiven Effekt auf die Effizienz der Immunantwort ausübt und die Zelle dadurch in einen Zustand versetzt wird, in dem bereits eine Grundaktivierung des Nukleinsäuredetektionssystems vorliegt. Dieser Vorgang wird als *Priming* bezeichnet (Härtlova *et al.*, 2015). Da die primären GFAP_Cre^{+/-}-Astrozyten bereits DNA-Schädigungen im Nukleus sowie eine leichte ISG-Signatur aufwiesen (Abschnitt 3.2.5), lag die Vermutung nahe, dass diese ebenso stärker auf PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) reagieren könnten.

Daher wurden unbehandelte als auch mit Doxorubicin vorbehandelte Kontrollzellen sowie RNase H2-defiziente Astrozyten mit Lipopolysacchariden (LPS) inkubiert bzw. mit polyI:C transfiziert und deren Immunreaktion anhand der Transkriptionsraten der Gene *IFNbeta* und *IFIT1* bewertet (Abb. 40A). Die erhaltenen Messdaten wurden auf GFAP_Cre^{-/-}-Zellen bezogen, die keinem Immunstimulanz ausgesetzt waren. Poly I:C als klassischer TLR3-Ligand diente hierbei der Imitation einer viralen Infektion (Junt und Barchet, 2015), während LPS als TLR4-Ligand einen bakteriellen Infekt nachahmte (Lu *et al.*, 2008).

Grundsätzlich führte der Einsatz der Stimulanzen zur Erhöhung der Transkriptmenge von IFIT1 und IFNbeta in den Kontrollzellen. Unterlagen diese jedoch zuvor einem *Priming* durch Schädigung der genomischen DNA mittels Inkubation mit Topoisomerase-Inhibitoren, erreichten die zuvor aktivierten GFAP_Cre^{-/-}-Primärzellen höhere Expressionsniveaus, die mit denen der GFAP_Cre^{+/-}-Astrozyten vergleichbar waren. Dieser Trend konnte unabhängig vom jeweiligen Stimulanz beobachtet werden, wobei die Effekte deutlich schwächer beim bakteriellen PAMP ausfielen (Abb. 40B/C).

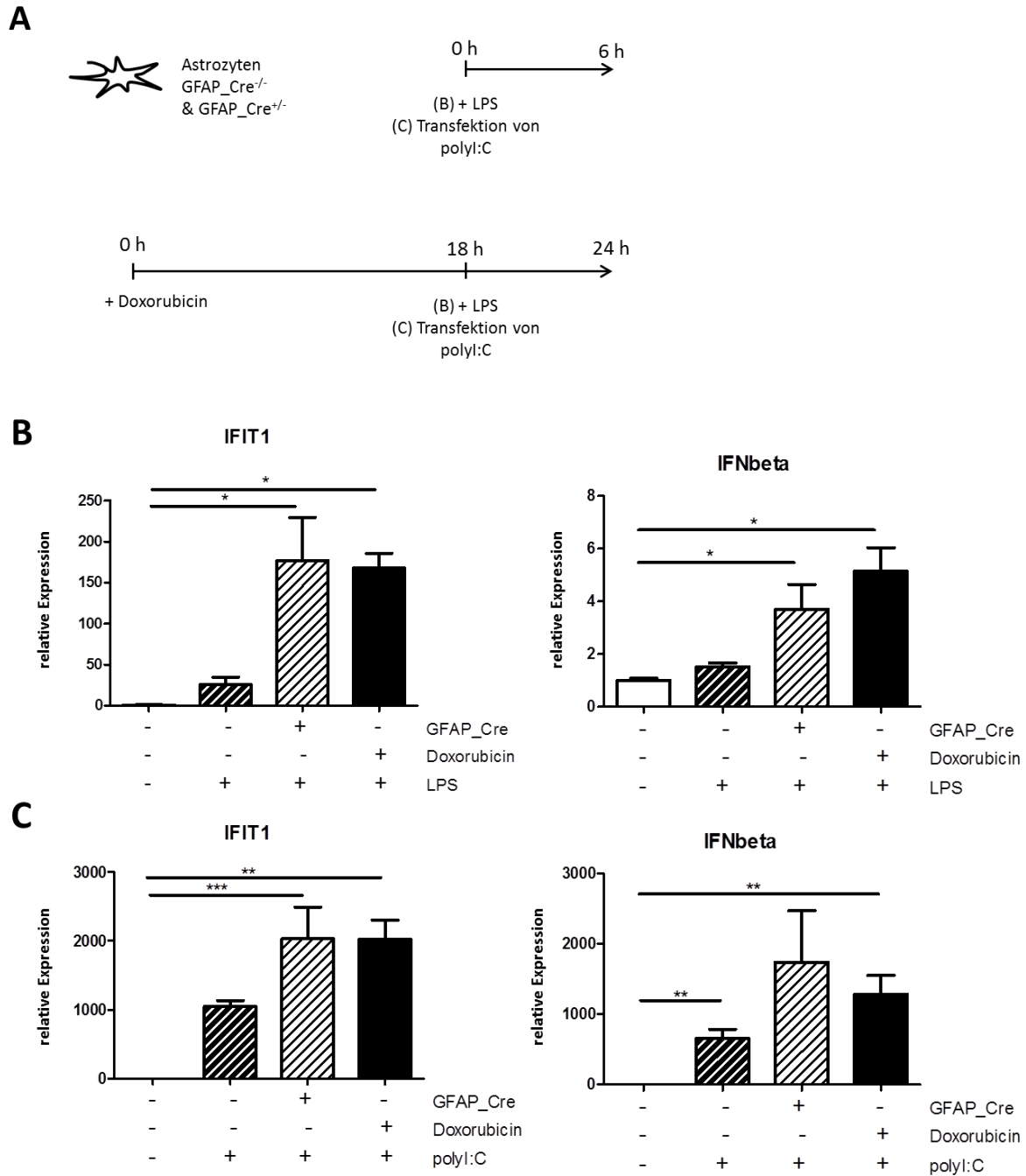


Abb. 40 Priming-Effekte.

(A) Schemata der Versuchsdurchführung: GFAP_Cre^{-/-} bzw. ^{+/-}-Astrozyten wurden mit Doxorubin (1 μM), polyI:C (5 μg) und/oder LPS (500 ng/ml) gemäß den angegebenen Zeiten behandelt; die Zellernte erfolgte 7 d post Isolierung (B/C) Auswertung der Versuche aus (A) anhand *real time* PCRs für die Gene *IFNbeta* und *IFIT1* 7d post Isolierung, wobei GFAP_Cre^{-/-} Bezugsgruppe ist (x =1); Normalisierung gegen *GAPDH*, Mittelwert ± SEM; studentischer, zweiseitiger T-TEST; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (n = mind. 3).

4. DISKUSSION

Nukleinsäuren sind zentrale Biomoleküle der Zelle, deren Synthese, Modifizierung, Degradierung und Detektion streng reguliert werden müssen. Kommt es zur Dysfunktion in einem dieser Prozesse, ergeben sich daher für die betroffene Zelle als auch den gesamten Organismus verheerende Folgen, die zur Ausprägung eines Krankheitsbildes führen. Zu diesen Nukleinsäure-vermittelten Erkrankungen zählt das Aicardi-Goutières-Syndrom, das aufgrund einer Vielzahl an Mutationen in Genen, die für Proteine des Nukleinsäurestoffwechsels kodieren, auftritt (Crow *et al.*, 2015). Die Mehrzahl dieser chemischen Alterationen der DNA befindet sich in den Genen der Untereinheiten der RNase H2, einer trimeren Ribonuklease (Rice *et al.*, 2007a). Das Enzym kann sowohl den RNA-Anteil von RNA:DNA-Hybriden abbauen als auch einzelne Ribonukleotide aus DNA-Duplexen entfernen (Cerritelli und Crouch, 2009; Reijns *et al.*, 2012). Die enzymatische Abwesenheit führt im murinen Modell zur embryonalen Letalität (Reijns *et al.*, 2012; Hiller *et al.*, 2012), sodass geeignete Systeme etabliert werden müssen, die die Untersuchung der Defizienz im Hinblick auf die Krankheitsentstehung erlauben. Dafür wurden in dieser Arbeit konditionale *Knock-out* Modelle etabliert, die auf der Cre-Rekombinase vermittelten Deletion des von loxP-Sequenzen eingerahmten Locus basierten und eine zellspezifische Defizienz ermöglichten.

4.1 RNase H2-Defizienz in murinen, embryonalen Fibroblasten

Alle bisherigen molekularen Erkenntnisse über die Folgen der RNase H2 Defizienz basieren größtenteils auf Arbeiten mit dem Einzeller *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus, da dieser im Gegensatz zu höheren Eukaryoten keine Letalität bei enzymaler Abwesenheit aufweist (Arudchandran *et al.*, 2000; Wahba *et al.*, 2011). Diese liegt jedoch im murinen Organismus vor, kann aber durch den zusätzlichen *Knock-out* von p53 teilweise überwunden werden und erlaubt damit die Isolierung muriner, embryonaler Fibroblasten zur *in-vitro*-Analyse (Reijns *et al.*, 2012). Diese zusätzliche Defizienz verhindert aber die p53-abhängige Aktivierung der DNA-Schadensantwort und den daraus resultierenden Effektormechanismen, sodass deren Untersuchung in diesem System nicht möglich ist. Gleichzeitig bedingt sie eine erhöhte genomische Instabilität und begünstigt die Entartung der Zellen (Donehower *et al.*, 1992; Harvey *et al.*, 1993; Donehower, 1997). Vergleichbare Probleme bieten eine Vielzahl an Zelllinien, deren p53-Defizienz zwar den gezielten *Knock-out* erlaubt (Lim *et al.*, 2015), aber die Nachstellung der zellulären AGS-Pathogenese aufgrund unphysiologischer Bedingungen behindert.

Daher sollte ein alternatives, primäres Zellkultursystem etabliert werden, das einen zeitlich definierten *Knock-out* der RNase H2 ermöglichte. Dazu wurde der Stamm CreERT_H2B gezüchtet und zur

Isolierung muriner embryonaler Fibroblasten genutzt (Abb. 7), bei denen die Ausschaltung der RNase H2 durch den Zusatz des Östrogenderivates 4-Hydroxytamoxifen induziert werden konnte (Abb. 8). Die Effizienz des Systems wurde anhand unterschiedlicher Methoden verifiziert (Abb. 9). Dabei genügte die Entfernung des fünften Exons der RNaseH2B Untereinheit um eine vollständige, enzymale Abwesenheit des trimeren Enzymes zu erzielen (Abb. 9B, Abb. 28C). Dieses Phänomen wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben, in denen sowohl der *Knock-out* der Untereinheit C (Hiller *et al.*, 2012) sowie die Einführung eines vorzeitigen Stopp-Codons im siebten Exon der Untereinheit B (Reijns *et al.*, 2012) denselben Effekt erzielten. Demzufolge ist die enzymale Aktivität aber auch Expression der einzelnen Untereinheiten voneinander abhängig.

4.1.1 RNase H2-Homöostase

Die Untereinheit B der murinen RNase H2 wird durch 11 Exone auf dem Chromosom 14 kodiert. Die induzierte Deletion des fünften Exons führte zu einem Versatz des Leserahmens und dem verfrühten Auftreten eines Stopp-Codons. Dadurch würde ein verkürztes, nicht-funktionales Protein entstehen. Um diesem Prozess entgegenzuwirken besitzen eukaryotische Zellen einen Kontrollmechanismus der als *nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) bezeichnet wird. Im Zuge des NMD werden mRNAs mit vorzeitigem Stopp-Codon erkannt und von ihrer 5'-Cap-Struktur befreit, was einen schnellen Abbau durch 5'-3'-Exonukleasen zur Folge hat. Damit im Einklang wurde nach der Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen eine stark verringerte Expression der Untereinheit B der Ribonuklease H2 mittels *real time* PCR in den CreERT^{+/+}-MEFs gemessen (Abb. 9A und Abb. 10B). Aufgrund der verringerten Anzahl an funktionalen RNaseH2B-Transkripten, die für die vollständige Untereinheit des Komplexes kodieren, ergibt sich demzufolge eine Abnahme der Proteinkonzentration, die durch Analysen im Immunblot bestätigt wurde (Abb. 10 A).

In weiterführenden Experimenten wurde zudem der proteolytische Abbau der Untereinheit B analysiert, der über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) erfolgt. Dies konnte durch die Hemmung dieses Prozesses unter der Verwendung des proteasomalen Inhibitors MG 132 belegt werden. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibition des lysosomalen Abbaus keinen Effekt (Abb. 10A). Generell erkennt das UPS abzubauen Proteine anhand ihrer Polyubiquitinierung. Dazu wird die Aminosäure Lysin posttranslational modifiziert (Ciechanover, 2005). Im Einklang mit dem identifizierten Abbauweg stehen massenspektrometrische Analysen der humanen Untereinheit B, bei denen diese Modifizierung identifiziert wurde (Wagner *et al.*, 2011; Mertins *et al.*, 2013). Die proteasomale Degradation ist essentiell für viele zelluläre Prozesse und wirkt regulierend auf den Zellzyklus, die Genexpression oder die Antwort auf oxidativen Stress. Im ersten Fall dient das UPS dem Abbau der Cycline, die Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, *cyclin-dependent kinase*) komplexieren und dadurch

deren Kinasefunktion aktivieren (Benanti, 2012). Die RNase H2 zeigt jedoch kein differentielles Expressionsmuster in den verschiedenen Phasen des Zellzykluses (Reijns *et al.*, 2012).

Jedoch konnte im Zuge dieser Arbeit ein besonders starker Gehalt der Ribonuklease in p53-defizienten MEFs im Vergleich zu primären CreERT^{-/-}-MEFs festgestellt werden (Abb. 28A/C). Hierbei handelt es sich um ein Schlüsselprotein der Zellzykluskontrolle, dessen *Knock-out* mit einer gesteigerten Proliferation assoziiert ist (Harvey *et al.*, 1993). Damit im Einklang wird das Enzym ebenso im adulten Organismus verstärkt von hochproliferativen Zellen, insbesondere Stammzellen, exprimiert (Reijns *et al.*, 2012; Aden, Bartsch *et al.*, unveröffentlicht). In Bezug auf das murine Gehirn zählen dazu die Zellen der subgranulären Zone des *Gyrus dentatus*, die ebenso eine erhöhte RNase H2-Expression aufwiesen, wie anhand immunhistochemischer Färbungen in der vorliegenden Arbeit belegt werden konnte (Abb. 32B). Da diese Zellart der Gewebshomöostase und Regeneration dient, ist die Gewährleistung ihrer genomischen Integrität essentiell (Qin *et al.*, 2015). Bedroht kann sie beispielsweise durch in genomische DNA während der Replikation eingebaute Ribonukleotide (rNMPs) werden, die die häufigste endogene Basenschädigung der DNA darstellen. Diese Inkorporationen sind in erhöhter Anzahl mit der Schädigung der DNA assoziiert (Reijns *et al.*, 2012). Dem entgegen wurde aber auch eine sehr starke Expression in Neuronen in dieser Arbeit aufgezeigt (Abb. 32A, Anhang Abb. A4), die sich im post-mitotischen Zustand befinden, sodass die Reparaturfunktion der RNase H2 hier nicht erklärend herangezogen werden kann. Vielmehr kann in dieser Zellart über die Bedeutung der klassischen Funktion als Degradationsenzym des RNA-Anteils von RNA:DNA-Hybriden spekuliert werden (Cerritelli *et al.*, 2009). Demzufolge übt das Enzym möglicherweise abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Hauptfunktionen aus.

4.1.2 Identifizierung des akkumulierenden Substrates in RNase H2-defizienten Zellen

Der klinische als auch subklinische Phänotyp des Aicardi-Goutières-Syndroms ähnelt kongenitalen Virusinfektionen. In beiden Erkrankungen kann die erhöhte Expression einer Vielzahl an Interferon stimulierten Genen beobachtet werden (Rigby *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2013). Während diese ISG-Signatur im zuletzt genannten Krankheitsbild auf der Detektion viraler Nukleinsäuren beruht, ist der molekulare Auslöser in den Zellen von AGS-Patienten unbekannt. Da jedoch alle von einer Mutation betroffenen Gene, die mit AGS assoziiert sind, für Proteine kodieren, die am Nukleinsäurestoffwechsel beteiligt sind, wird die Hypothese der Akkumulation endogener, unprozessierter Nukleinsäuren postuliert, die von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems detektiert werden (Crow *et al.*, 2009). Für die ER-assoziierte DNase TREX1 konnte anhand von *Knock-out*-Mäusen und -MEFs bereits das Vorkommen zytoplasmatischer DNA-Spezies aufgezeigt (Yang *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2014) und eine konstitutive Aktivierung des cGAS-STING-Signalweges identifiziert werden (Ablasser *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2015). Für Zellen mit einer

Beeinträchtigung der RNase H2 fehlten zu Beginn dieser Arbeit diese essentiellen mechanistischen Erkenntnisse. Um daher das akkumulierende Substrat zu identifizieren wurden induzierbare RNaseH2B-*Knock-out*-MEFs genutzt (Abb. 8, Abb. 9), die aufgrund des Vorliegens einer ISG-Signatur als geeignetes *in-vitro*-Modell insbesondere in Bezug auf die Pathogenese von AGS angesehen wurden (Abb. 13A).

In den primären RNase H2 defizienten-MEFs konnten distinkte zytoplasmatische, einzel- und doppelsträngige DNA-Spezies identifiziert werden (Abb. 14, Abb. 15). Die dsDNA-Strukturen wurden gemäß ihrer Lokalisation als nukleäre Knospungen oder perinukleäre Körperchen bezeichnet (Abb. 15), die vor allem geschädigte DNA enthielten und die Stadien eines nukleären Exportprozesses darstellten (Abb. 16). Dieser Vorgang wurde bereits für DNase2a-defiziente Zellen beschrieben (Lan *et al.*, 2014). Als Ursache des verstärkten Vorkommens von DNA-Doppelstrangbrüchen (Abb. 11) kann die erhöhte Anzahl inkorporierter rNMPs in die neu-replizierte, genomische DNA aufgrund der Abwesenheit eines funktionalen RER-Signalweges angesehen werden (McElhinny *et al.*, 2010; Reijns *et al.*, 2012). Damit im Einklang stehen Komplementationsexperimente, bei denen die Wiederherstellung der RER-Aktivität durch Überexpression der RNase H2 zur Negierung des Phänotyps von H2B^{-/-} p53^{-/-}-MEFs führte. Dies konnte im Gegensatz dazu nicht durch die Überexpression der nukleären Isoform der RNase H1 als Degradationsenzym für RNA:DNA-Hybride beobachtet werden (Mackenzie *et al.*, 2016). Dennoch kann damit das Auftreten immunogener Hybride in Anbetracht spezifisch von der RNase H2 degradiert RNA:DNA-Strukturen nicht vollkommen ausgeschlossen werden (Chon *et al.*, 2013). So postulieren weitere Studien deren Akkumulation in Form von *R-Loops* (Chon *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2015), die vor allem in intergenen Bereichen vorzufinden und nicht-kanonischer Herkunft sind (Lim *et al.*, 2015). Alternativ zur kotranskriptionellen Entstehung dieser Strukturen wird die Möglichkeit der Reparatur von DSBs mittels RNA-Transkripten, die via Rad52 an DNA binden, angeführt (Keskin *et al.*, 2014).

Grundsätzlich erhöht die Ribose-2'-hydroxylgruppe der inkorporierten Ribonukleotide die Zugänglichkeit der Phosphodiesterbindung zur Hydrolyse und bedingt damit eine erhöhte Instabilität. Des Weiteren ist die massive Inkorporation von rNMPs mit einer gesteigerten UV-Sensitivität assoziiert, die sich in der verstärkten Formierung von Cyclobutan-pyrimidindimeren (CPDs) manifestiert, deren Bildung aufgrund der veränderten dihedralen Winkel zwischen den Pyrimidinringebenen sowie ihrer kovalenten C5-C6-Bindungen erleichtert wird (Günther *et al.*, 2015). Somit begünstigen rNMPs die Bildung von DNA-Schäden und behindern gleichzeitig bei ihrem Verbleib in der DNA die Basenfehlpaarungsreparatur (MMR, *mismatch repair*), bei der die entfernten rNMPs als Initiationsstellen des Reparaturprozesses genutzt werden (Ghodgaonkar *et al.*, 2013; Lujan *et al.*, 2013). Dadurch erfolgt in der Konsequenz die Aktivierung der DNA-Schadensantwort, die anhand der erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p21 und einer verringerten Proliferation der CreERT^{+/-}-Zellen belegt wurde (Abb. 12).

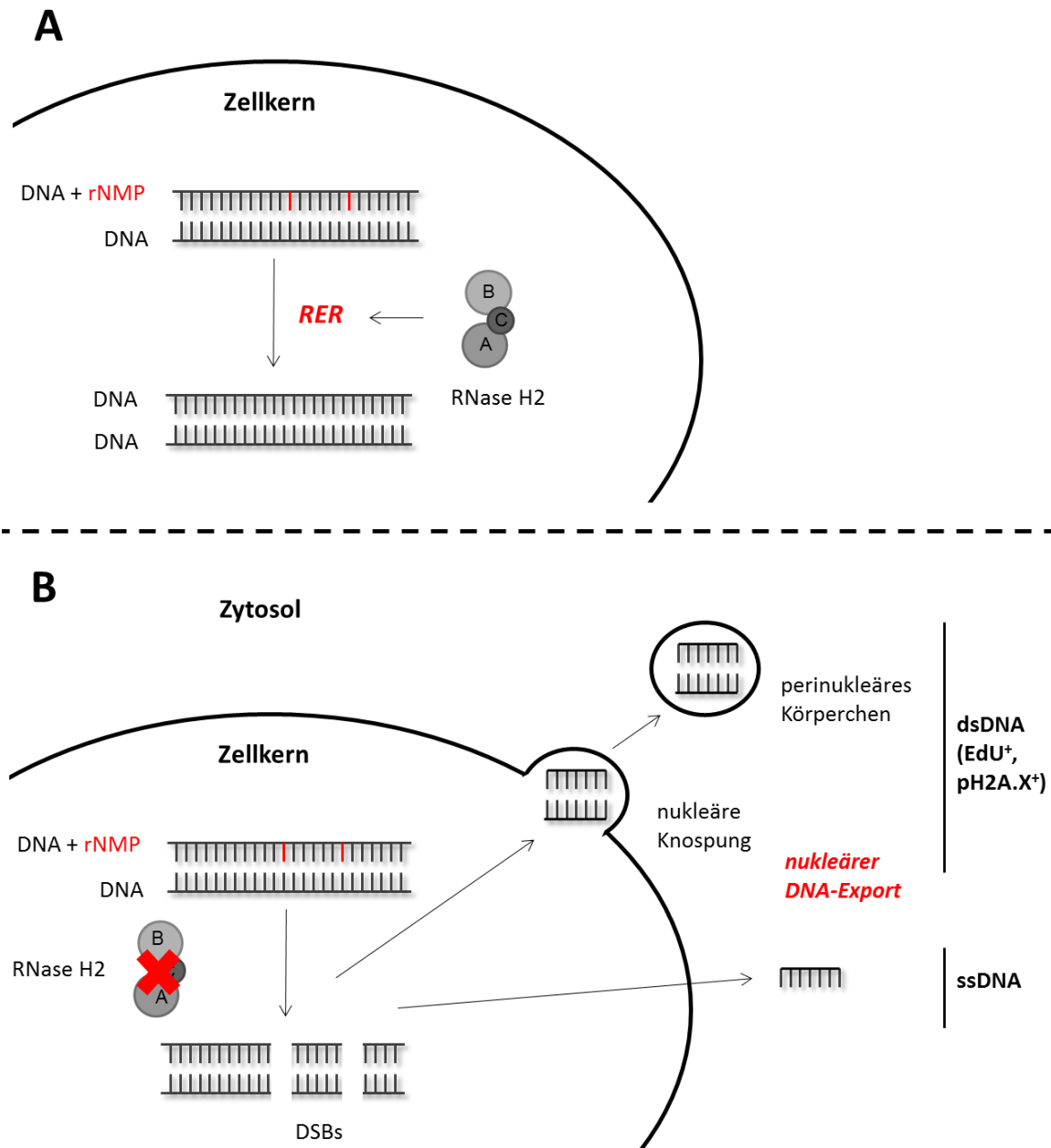


Abb. 41 Graphischer Vergleich der auf ins Genom inkorporierte Ribonukleotide folgenden Prozesse unter physiologischen und RNase H2-defizienten Bedingungen.

(A) Unter physiologischen Bedingungen werden ins zelluläre Genom inkorporierte rNMPs von der RNase H2 im Zuge der Ribonukleotidentfernungsreparatur (RER) beseitigt. (B) Theoretisches Modell: Die fehlende RNase H2-Aktivität führt zum Auftreten von Doppelstrangbrüchen (DSBs) und dem Export von ssDNA sowie geschädigter (pH2A.X⁺), neu-synthetisierter (EdU⁺) dsDNA ins Zytoplasma durch einen nukleären Knospungsprozess und der damit verbundenen Entstehung von vesikulären Strukturen, den sog. perinukleären Körperchen.

Die Abhängigkeit des hier beschriebenen Exportmechanismus für geschädigte DNA vom Proliferationsstatus unterstreicht zudem die Beeinträchtigung der RER-Aktivität, einer mit der DNA-Replikation assoziierten Funktion des Enzymes (Chon *et al.*, 2009; Bubeck *et al.*, 2011). So zeigen unter serumarmen Bedingungen kultivierte CreERT^{+/-}-MEFs gegenüber ihren unter

Standardbedingungen gehaltenen Äquivalenten weniger perinukleäre Körperchen (Abb. 18B) bei artifiziell erniedrigter Zellteilungsrate (Abb. 18A). Ferner exportieren RNase H2-defiziente Zellen auch neu-synthetisierte DNA ins Zytoplasma (Abb. 17A/B), die eine Kolokalisation mit dem DNA-Schadenmarker pH2A.X aufweist (Abb. 17C/D).

Fasst man die experimentell in dieser Arbeit beobachteten Merkmale der perinukleären Körperchen schließlich zusammen, stellt man eine deutliche Übereinstimmung mit Mikronuklei (MNi) fest, die ebenso nukleären Ursprunges sind, eine Abhängigkeit von der Replikationsrate aufweisen und geschädigte DNA beinhalten (Fenech *et al.*, 2011). Mikronuklei stellen distinkte zytoplasmatische dsDNA-Strukturen dar, die von einer Membran nukleärer Herkunft umgeben sind. Sie wurden insbesondere in entarteten sowie genotoxischem Stress ausgesetzten Zellen beschrieben (Sabharwal *et al.*, 2015). Initial wurden MNi als Biomarker genomischer Instabilität angesehen, die ganze oder fragmentierte Chromosomen enthielten, die aufgrund einer gestörten Segregation in der Anaphase nicht in die Zellkerne der sich bildenden Tochterzellen eingeschlossen wurden (Fenech *et al.*, 2011). Dass diese Beschreibung der *Cargo* und des Entstehungsprozesses differenzierter betrachtet werden muss, belegten weiterführende Studien, in denen verschiedene Unterklassen an MNi und unterschiedliche Mechanismen ihrer Bildung aufgezeigt wurden (Yasui *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011). Eine dieser Unterklassen beschreibt MNi, die aufgrund replikativen Stresses entstehen und geschädigte DNA in der Form pH2A.X markierter DSBs enthalten. Diese DNA-Aggregate knospen von der Oberfläche von Interphasekernen und stellen damit möglicherweise einen Beseitigungsmechanismus für geschädigte genomische DNA dar (Xu *et al.*, 2011). Zu dieser Unterklasse können vermutlich auch die in RNase H2-defizienten CreERT^{+/+}-MEFs beobachteten perinukleären Körperchen gezählt werden.

Inwiefern diese zytoplasmatischen DNA-Strukturen immunstimulierend wirken, wurde bisher nicht aufgezeigt. Dass es jedoch einen deutlichen Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und der erhöhten Expression von Interferon-stimulierten Genen gibt, wurde vielfach beobachtet und auch in dieser Arbeit gezeigt (Abb. 19). So wiesen Zellen, die mit Topoisomerase-Inhibitoren (Etoposid, Doxorubicin, Ara-C, *etc.*) oder ionisierender Strahlung behandelt wurden, eine ISG-Signatur auf (Abb. 19A; Härtlova *et al.*, 2015). Ebenso wurde verdeutlicht, dass daraus resultierend zytoplasmatische DNA-Strukturen auftreten (Abb. 19C; Lan *et al.*, 2014) und der Nukleinsäuredetektionsweg aktiviert ist (Abb. 19B; Kim *et al.*, 1999).

Da auch die TREX1- und SAMHD1-Defizienz mit einem erhöhten Grad geschädigter genomischer DNA assoziiert ist, könnte das hier postulierte auftretende Substrat nicht nur auf die enzymale Abwesenheit der RNase H2 beschränkt sein (Yang *et al.*, 2007; Clifford *et al.*, 2014; Kretschmer *et al.*, 2015). So wurden beispielsweise für TREX1-*Knock-out*-MEFs vergleichbare zytoplasmatische dsDNA-Strukturen beschrieben (Ahn *et al.*, 2014). Auch in Systemen, die nicht auf der Ausschaltung AGS-assoziiierter Gene beruhen, sondern auf weitere Komponenten des Nukleinsäurestoffwechsels

abzielten (DNase2a, ATM, *etc.*), wurden ähnliche Effekte beobachtet (Lan *et al.*, 2014; Härtlova *et al.*, 2015).

Gleichzeitig ist aber auch hervorzuheben, dass die in dieser Arbeit analysierten CreERT^{-/-}-Kontrollzellen, sowohl nukleäre Knospungen als auch perinukleäre Körperchen aufwiesen. Die prozentuale Anzahl dieser Strukturen war im Vergleich zu den CreERT^{+/-}-MEFs jedoch äußerst gering (Abb. 15). Dennoch kann über eine natürliche Grundaktivierung des Nukleinsäuredetektionssystems (*natural Priming*) durch diese Strukturen spekuliert werden, die eine effizientere und schnellere Immunantwort bei Infektionen ermöglicht. Die Effizienz der induzierten Grundaktivierung wurde bereits für Zellen, die zuvor mit genotoxischen Substanzen behandelt wurden, dargestellt und auch in dieser Arbeit erprobt (Abb. 39; Härtlova *et al.*, 2015). Demzufolge könnte das RNase H2-Defizienzmodell auch als ein System mit übersteigerter Grundaktivierung angesehen werden, die wiederum zu einer besseren Immunantwort gegen Pathogene viraler oder bakterieller Natur führt (Abb. 39). Im Einklang damit wurde für TREX1-defiziente MEFs die bessere Abwehr gegen die Viren Influenza NS1, VSV (*vesicular stomatitis virus*), Westnilvirus und Sendavirus aufgezeigt (Hasan *et al.*, 2013).

Zusammengefasst postulieren die Experimente ein von der Reparaturaktivität der RNase H2 abhängiges Szenario, bei dem die massive Inkorporation von einzelnen Ribonukleotiden in das zelluläre Genom und dem daraus resultierenden Auftreten von DNA-Schäden zum Ausstoß geschädigter DNA aus dem Nukleus und darauffolgender Anhäufung im Zytoplasma führt (Abb. 41).

4.1.3 Signaltransduktion über cGAS-STING in RNase H2-defizienten MEFs

Das Vorkommen zytoplasmatischer dsDNA-Strukturen wurde in einer Vielzahl an Systemen beobachtet, die ebenso mit einer ISG-Signatur assoziiert waren (Ahn *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2014; Härtlova *et al.*, 2015). Zu diesen Systemen zählen auch RNase H2-defiziente Zellen. So wurde unabhängig voneinander und unter Nutzung verschiedener Zellkulturmodelle in dieser Arbeit als auch in bereits veröffentlichten Publikationen die Akkumulation von MNi, einer endogenen Nukleinsäurespezies, im Zytoplasma von RNase H2-defizienten Zellen beschrieben (Reijns *et al.*, 2012; Pizzi *et al.*, 2015). Jedoch fehlte bisher deren genaue Charakterisierung (Abschnitt 4.1.2) sowie der mechanistische Zusammenhang bezüglich der erhöhten Expression anti-viraler Gene.

Diese transkriptionelle Erhöhung der ISGs konnte in der vorliegenden Arbeit auf die Aktivierung des cGAS-STING-Signalweges zurückgeführt werden (Abb. 20). Diese Abhängigkeit wurde auch in zwei weiteren Studien beobachtet, in denen Mausmodelle untersucht wurden, die AGS-Mutationen in den Untereinheiten der RNase H2 trugen (Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016). Da die ISG-Transkriptmenge nach dem *Knock-down* des Rezeptors cGAS als auch des Adaptorproteins STING

nahezu auf dem Kontrollzellniveau lagen (Abb. 20C), scheint die Aktivierung weiterer möglicher Sensoren oder Adaptoren unwahrscheinlich. Die cGAS-abhängige ISG-Erhöhung wurde auch für TREX1- als auch DNase2a-defiziente Mäuse experimentell bewiesen (Gao *et al.*, 2015), sodass möglicherweise ein vergleichbarer molekularer Mechanismus besteht. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Visualisierung der Bindung des Sensors cGAS an die extranukleären DNA-Strukturen aufgedeckt (Abb. 21). Diese Anlagerung an die zytosolische DNA wurde auch für das Genom des Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben, das der autophagosomalen Degradation durch Entweichen ins Zytoplasma entgeht (Watson *et al.*, 2015). Da jedoch nur etwa 16 % der MNi eine Kolokalisation mit dem HA getaggenen cGAS in den CreERT^{+/−}-Zellen aufwiesen (Abb. 21), scheint nur ein begrenztes Zeitfenster für die Bindung zu bestehen. Dieses könnte einerseits durch die Auflösungsgeschwindigkeit der umhüllenden Membran nukleärer Herkunft (Hatch *et al.*, 2013) und andererseits die Bildungsgeschwindigkeit der autophagosomalen Membran (Abb. 22E) beschränkt sein.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch weitere Nukleinsäurespezies an den zytosolischen DNA-Rezeptor cGAS binden, da dieser nicht nur durch dsDNA, sondern auch DNA:RNA-Hybride aktiviert werden kann (Sun *et al.*, 2012; Mankan *et al.*, 2014; Paludan, 2015).

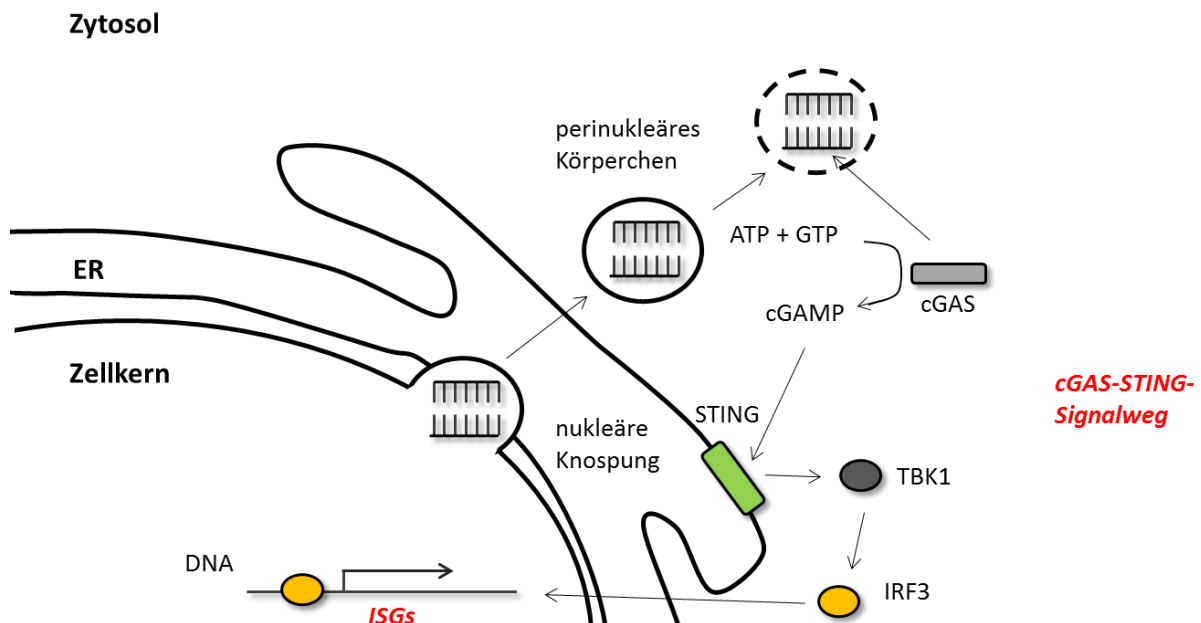


Abb. 42 Aktivierung des cGAS-STING-Signalweges in RNase H2-defizienten MEFs.

Theoretisches Modell: Die Membran der perinukleären Körperchen löst sich auf und ermöglicht dadurch die Erkennung der dsDNA durch den Sensor cGAS, der den sekundären Botenstoff cGAMP aus den Ausgangsstoffen ATP und GTP bildet. Dieser Botenstoff wird vom Adaptor STING gebunden, der nach Dimerisierung wiederum TBK1 aktiviert. Die Kinase phosphoryliert ihrerseits den Transkriptionsfaktor IRF3, der in den Zellkern transloziert und die Expression von ISGs induziert.

Inwiefern auch die in dieser Arbeit im Zytoplasma identifizierte ssDNA bindet, muss in weiterführenden Studien aufgezeigt werden. Generell wurde jedoch die Erkennung dieses Liganden durch cGAS, wenn auch äußerst schwach, bereits publiziert (Kranzusch *et al.*, 2013). Gleichfalls wurden Hinweise dazu in einem Rad51/RPA-abhängigen Modell zur Verhinderung der Akkumulation von ssDNA im Zytoplasma aufgezeigt. Dieses postuliert ebenso den Abbau dieser Spezies durch TREX1 und erklärt damit möglicherweise, warum in der vorliegenden Arbeit erhöhte Transkriptlevel dieser DNase in den RNase H2-defizienten Zellen gemessen wurden (Abb. 14C, Wolf *et al.*, 2016).

Zusammengefasst kann anhand der Experimente ein Mechanismus auf molekularer Ebene aufgestellt werden, der zur erhöhten Expression der ISGs in RNase H2-defizienten MEFs führt. Dieser beruht auf der Detektion zytoplasmatischer dsDNA anhand des Sensors cGAS. Gleichzeitig wird das immunstimulierende Potenzial der MNi belegt und eine potenziell in Zellen von AGS-Patienten auftretende Nukleinsäurespezies postuliert (Abb. 42).

4.1.4 Autophagie als Abwehrmechanismus des Immunsystems gegenüber zytoplasmatischen DNA-Spezies in RNase H2-defizienten Zellen

Autophagie wurde primär als metaboler Prozess zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle der intrazellulären Biomasse und der Organellen angesehen. Dieses Verständnis muss jedoch um die bedeutende Rolle dieses Abbauweges in der Immunabwehr erweitert werden. In diesem Zusammenhang wurde auch der Begriff „Immunophagie“ geprägt (Deretic, 2011). Im Hinblick auf ektopische DNA im Zytoplasma wurde beispielsweise der Abbau der DNA des Erregers *Mycobacterium tuberculosis* durch Bildung von autophagosomalen Strukturen beschrieben (Watson *et al.*, 2015; Collins *et al.*, 2015). Dass jedoch nicht nur exogene, sondern auch endogene, zytoplasmatische DNA diesem Vorgang unterliegt, wurde für pH2A.X⁺ dsDNA-Aggregate in DNase2a-defizienten MEFs aufgezeigt (Lan *et al.*, 2014). In beiden Fällen bestand eine cGAS-abhängige ISG-Signatur (Watson *et al.*, 2015; Collins *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015). Aufgrund der Gemeinsamkeiten zum in dieser Arbeit genutzten induzierbaren Zellsystem wurde der autophagische Prozess zum Abbau von perinukleären Körperchen untersucht.

Zwar konnte keine erhöhte Anzahl an Lysosomen belegt werden (Abb. 25), dafür aber eine gesteigerte basale Autophagie, die sich in der erhöhten Expression des Markerproteins LC3-II äußerte (Abb. 23A). Diese kann sowohl für eine zahlen- als auch volumenmäßige Erhöhung der Autophagosomen sprechen. Gleichfalls konnte der erwähnte Marker in Koloalisation mit den MNi visualisiert werden (Abb. 22E), sodass ein direkter Beleg für den Abbau dieser ektopischen Nukleinsäurespezies via Autophagie erbracht wurde. Dieser Mechanismus wurde außerdem indirekt bestätigt, da die Blockierung des autolysosomalen Abbaus der Cargo durch Zusatz von Bafilomycin A1 zur Erhöhung der Anzahl perinukleärer Körperchen führte (Abb. 22A/B). Im Einklang damit steigerte sich die Expression der ISGs CXCL10 und IFIT1 durch die Unterdrückung der Bildung von Autophagosomen

deutlich (Abb. 22C/D). Auf der anderen Seite führte der entgegengesetzte Prozess, die Induktion von Autophagie durch mTOR-Inhibitoren, zur Senkung dieser Signatur (Abb. 24). Da diese pharmakologischen Zusätze jedoch auch auf die Proliferation wirken, indem sie die aktivierende Funktion des mTORC1-Komplexes auf den Initiationsfaktor eIF4F sowie die ribosomale S6Kinase aufheben und dadurch die Senkung der Translationsrate bedingen und den Übergang von der G1- zur S-Phase verhindern (Saunders *et al.*, 2001; Panwalkar *et al.*, 2004), kann der beschriebene Effekt nicht klar auf die verstärkte Autophagie bezogen werden. Dennoch verdeutlicht das durchgeführte Experiment die Korrelation zwischen der Anzahl an Zellen mit perinukleären Körperchen und der Transkriptionsrate an ISGs (Abb. 24).

In Übereinstimmung mit den hier durchgeführten Untersuchungen wurden außerdem vergleichbare Beobachtungen für Zelllinien beschrieben, die mit Zellzyklusinhibitoren (Nocodazol, Cytochalasin D, Hydroxyurea, SP600125) behandelt wurden, aufgrund derer es zur Ausbildung von DNA-Schäden kam. Die daraus resultierenden MNi zeigten eine Kolokalisation mit LC3, p62 und Lamp2 (Rello-Varona *et al.*, 2012). Hervorzuheben ist hierbei die Nutzung von Hydroxyharnstoff als MNi-Induktor, der zur Reduktion der zellulären dNTP-Konzentration durch Inhibition der Ribonukleotidreduktase führt und dadurch die Inkorporationsrate von rNMPs in die genomische DNA erhöht. Dieser Effekt entspricht jenem bei enzymaler Abwesenheit der RNase H2 (Reijns *et al.*, 2012).

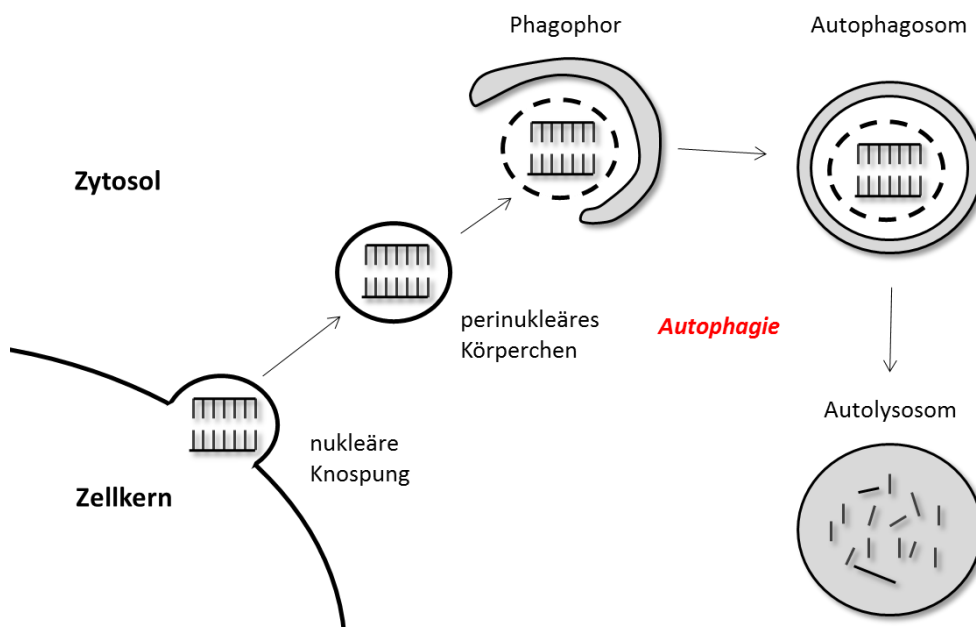


Abb. 43 Graphisches Modell des Abbauweges von zytoplasmatischer dsDNA.

Theoretisches Modell: Zytoplasmatische dsDNA-Strukturen werden von einer Membran (Autophor) zur Bildung eines Autophagosoms umschlossen, das anschließend durch lysosomale Fusion in ein Autolysosom umgewandelt wird, in dem die enzymale Degradierung der Cargo unter saurem pH-Wert stattfindet.

Durch den *Knock-down* von ATG5 wurde nicht nur eine starke Erhöhung der untersuchten Interferon-stimulierten Gene in den RNase H2-defizienten Zellen beobachtet, sondern auch ein leichter Anstieg in den Kontrollzellen gemessen (Abb. 22C/D). Diese Steigerung kann als weiterer Hinweis auf ein natürliches *Priming* angesehen werden und unterstützt die Theorie einer übersteigerten Grundaktivierung des Nukleinsäuredetektionssystems in RNase H2-defizienten Zellen (Abb. 43).

Zusammengefasst untermauern die durchgeführten Analysen im induzierbaren Primärkultursystem, dass MNi durch Autophagie abgebaut werden. Gleichzeitig vervollständigen sie das mechanistische Bild der molekularen Prozesse in RNase H2-defizienten Zellen.

4.1.5 Seneszenz als Abwehrmechanismus des Immunsystems

Die Abwesenheit der Ribonuklease H2 führte zur embryonalen Letalität im murinen Modellorganismus (Reijns *et al.*, 2012; Hiller *et al.*, 2012). Die Analyse des embryonalen Transkriptom zeigte dabei die gesteigerte Expression von Zielgenen des Transkriptionsaktivators p53, einem Schlüsselprotein der DNA-Schadensantwort (Abschnitt 1.6). Vergleichbare Effekte konnten für Embryonen gemessen werden, deren Muttertier mit Hydroxyharnstoff behandelt wurde (El Hussein *et al.*, 2016). Die verstärkte Expression von p21 und Cyclin G1 auf Proteinebene begründete das Postulat eines p53-abhängigen Zellzyklusarrestes in Folge von DNA-Schädigungen. Damit im Einklang führte der zusätzliche *Knock-out* von p53 zur Verzögerung des embryonal-letalen Phänotyps bei RNase H2^{null}-Mäusen (Reijns *et al.*, 2012).

Diese Beobachtungen konnten mit dem in dieser Arbeit etablierten Induktionssystem reproduziert und im Hinblick auf das finale Schicksal der defizienten Zellen erweitert werden. So führte die RNase H2-Defizienz zur Ausprägung von Schädigungen des nukleären Genoms (Abb. 11) und einer darauf begründeten Erniedrigung der Zellproliferation (Abb. 12D-F). Dies ging mit einer erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p21 einher (Abb. 12A/B). Jedoch lag keine erhöhte Apoptoserate vor (Abb. 12C), sondern die Ausbildung eines seneszenten Phänotyps. Dieser zeichnete sich durch eine veränderte zelluläre Morphologie, verstärkte Expression der beta-Galaktosidase, dem Vorliegen eines Zellzyklusarrestes sowie der Expression p53-assoziiierter Gene aus (Abb. 26A/B/D/E). Ebenso lag ein Seneszenz-assoziiertes, sekretorisches Phänotyp vor, der sich in der verstärkten Sekretion der Zytokine IL-6 und KC äußerte (Abb. 26C). Das veränderte Zytokinprofil der RNase H2-defizienten Zellen ist ebenso ein Merkmal des Aicardi-Goutières-Syndroms und besitzt damit klinische Implikation (Takanohashi *et al.*, 2013). Diesen Aspekt unterstützend wurden für Fibroblasten von AGS-Patienten mit Mutationen in den Genen von SAMHD1 als auch den Untereinheiten der RNase H2 Anzeichen von Seneszenz aufgezeigt (Kretschmer *et al.*, 2015; Günther *et al.*, 2015).

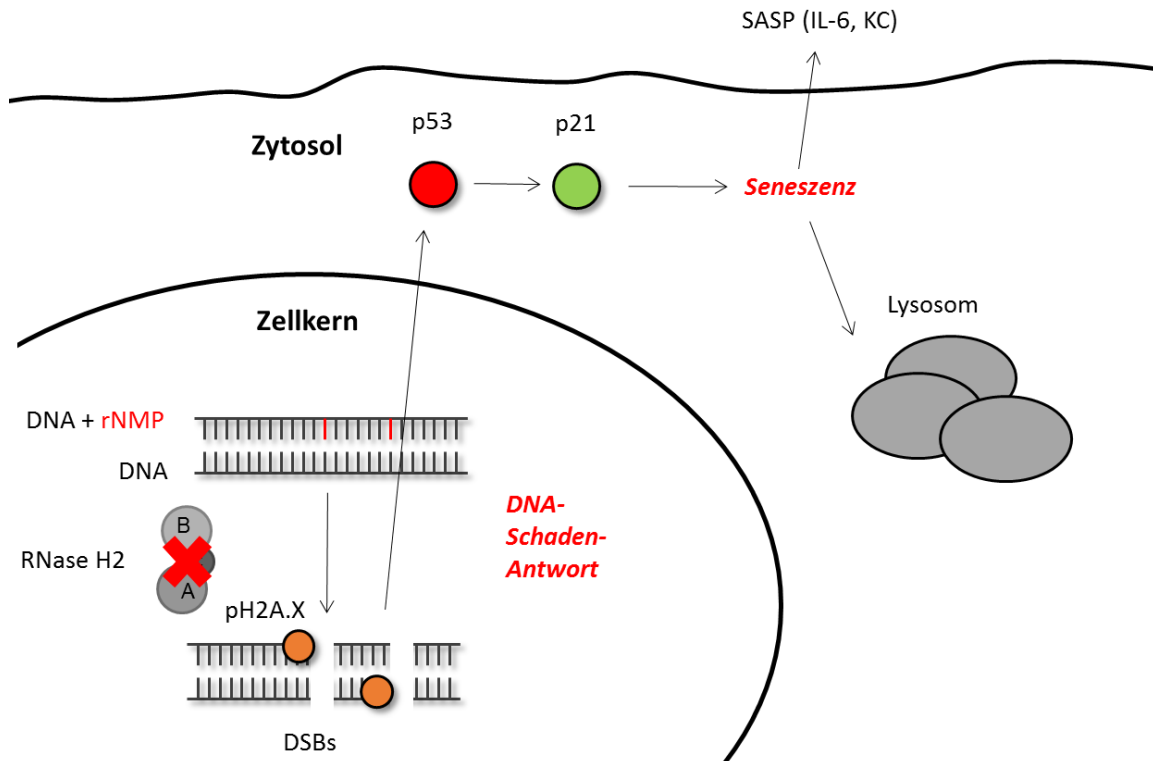


Abb. 44 DNA-Schadensantwort und Langzeiteffekte in RNase H2-defizienten MEFs.

Theoretisches Modell: In das Genom von RNase H2-defizienten MEFs eingebaute, einzelne Ribonukleotide führen zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) aufgrund eines fehlenden RER-Mechanismus. Der DNA-Schaden wird von der Zelle durch Phosphorylierung des Histons H2A.X markiert und aktiviert eine persistente DNA-Schadensantwort, die über p53-p21 zur Ausbildung der Seneszenz führt, die durch eine erhöhte Anzahl Lysosomen und einem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) charakterisiert ist.

Die zelluläre Seneszenz hat sowohl förderliche als auch schädliche Effekte für den Organismus (Abschnitt 1.6). Sie wirkt u.a. als Antitumormechanismus, wie auch in einem konditionalen RNase H2-*Knock-out*-Modell, bei dem die intestinalen Stamm- und Epithelzellen die Ribonuklease nicht mehr exprimierten, beobachtet werden konnte (Aden, Bartsch *et al.*, unveröffentlicht). Des Weiteren kann Seneszenz als ein Abwehrmechanismus des Immunsystems angesehen werden, bei dem beispielsweise SASP-Komponenten die Rekrutierung von Immunzellen unterstützen (Campisi, 2013). In der vorliegenden Arbeit stellte sie möglicherweise einen Zustand dar, der zur Reduktion des RNase H2-abhängigen Phänotyps etabliert wurde. So führte der Proliferationsstopp in seneszenten Zellen zur Abschwächung der ISG-Signatur (Abb. 27C), was im Einklang mit der Abhängigkeit des Auftretens perinukleärer Körperchen von der Replikationsrate steht (Abb. 18) und vermuten lässt, dass dadurch deren Bildung vermindert wurde.

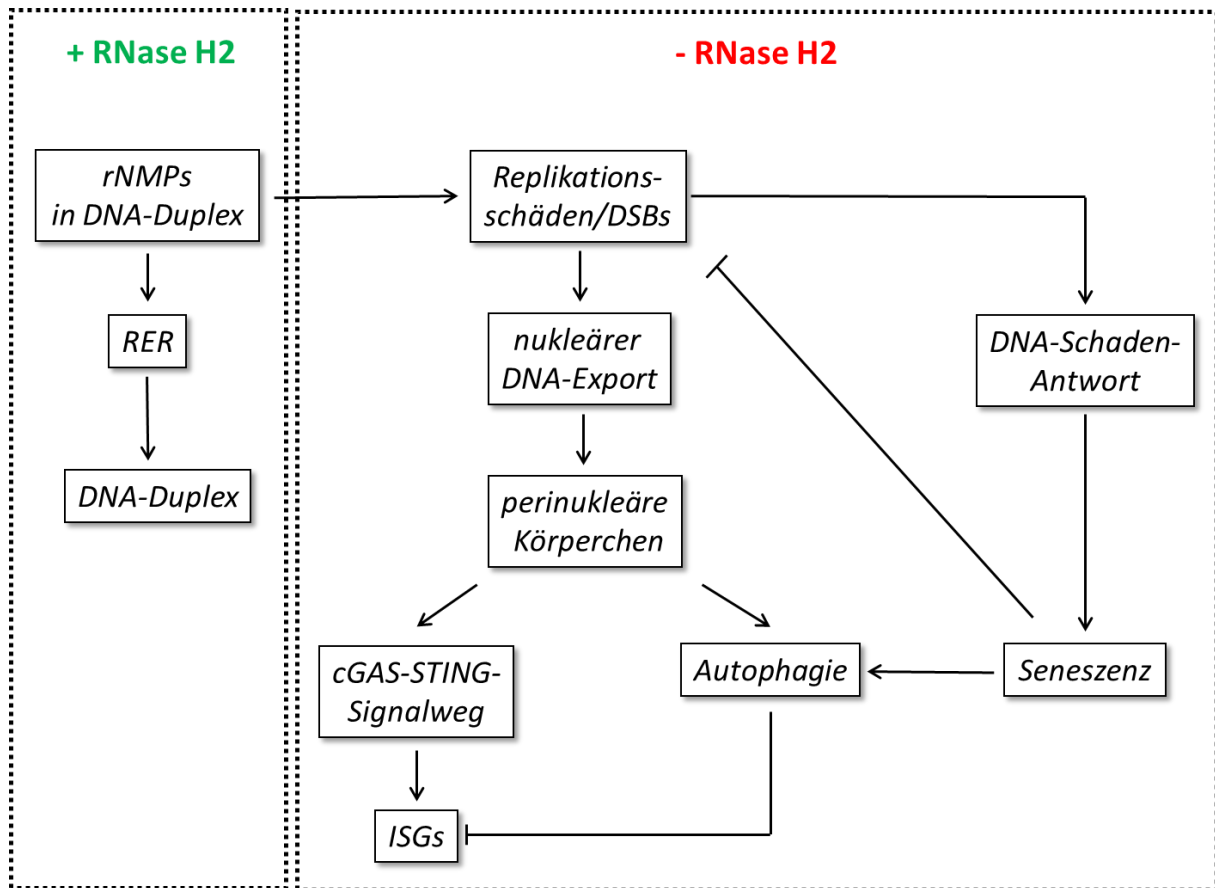


Abb. 45 Graphische Zusammenfassung der molekularen Prozesse in RNase H2-defizienten MEFs.

Übersicht aller Schlüsselprozesse und ihrer Beziehung zueinander in RNase H2-kompetenten (grün) und -defizienten (rot) MEFs. theoretisches Modell: Unter physiologischen Bedingungen werden rNMPs aus dem Genom über die Ribonukleotidentfernungsreparatur (RER) beseitigt, ein von der RNase H2 katalysierter Prozess. Ohne RNase H2 führen die inkorporierten Ribonukleotide zu Doppelstrangbrüchen (DSB). Die geschädigte, nukleäre DNA wird daraufhin in Form perinukleärer Körperchen ins Zytoplasma exportiert. Hier werden die Strukturen einerseits von cGAS erkannt und führen zur erhöhten ISG-Expression und werden andererseits über Autophagie abgebaut und reduzieren die Immunantwort. Die DNA-Schäden führen ebenso zur Ausbildung von Seneszenz, die mit einer verstärkten Autophagie einhergeht.

Gleichzeitig zeichnen sich seneszente Zellen durch verstärkte Autophagie aus, deren gesteigerte Rate anhand der erhöhten Expression lysosomaler und autophagischer Gene in CreERT^{+/+}-MEFs verdeutlicht wurde (Abb. 27A/B). Da dieser Abbauweg auch MNi einbezieht (Abb. 22), kann außerdem angenommen werden, dass der Abbau der zytoplasmatischen dsDNA-Strukturen in seneszenten Zellen effizienter abläuft.

Insgesamt konnte unter Nutzung des murinen, induzierbaren *in-vitro-Knock-out*-Modells das Zellschicksal RNase H2-defizienter MEFs näher charakterisiert werden (Abb. 44). Dieses bestand in der Ausprägung der zellulären Seneszenz, die neben der Ausbildung eines inflammatorischen Phänotyps (Abb. 26C) auch zur Minderung der ISGs führte.

4.1.6 Therapeutische Optionen

Fasst man alle in dieser Arbeit experimentell abgeleiteten Prozesse zusammen, die auf molekularer Ebene in RNase H2 defizienten murinen, embryonalen Fibroblasten ablaufen, erhält man eine Grundlage zum Verständnis der Pathogenese des Aicardi-Goutières-Syndroms (Abb. 45; Anhang Abb. A5). Gleichzeitig bieten die identifizierten Mechanismen aber auch Ansatzpunkte zur Entwicklung kausaler Therapien, die bisher für AGS nicht existierten.

Vor allem die Detektion der zytoplasmatischen DNA-Spezies über den cGAS-STING-Signalweg eröffnet vielversprechende Optionen zur Modulierung der Immunantwort. So führte der zusätzliche *Knock-down* bzw. *-out* des DNA-Sensors zur Linderung des Phänotyps in verschiedenen, murinen AGS-relevanten Systemen, bei denen AGS-assoziierte Gene im Fokus standen (Ablasser *et al.*, 2014; Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016). Insbesondere ist dabei die Tatsache hervorzuheben, dass selbst die heterozygote Ausschaltung in TREX1-defizienten Mäusen zur signifikanten Erhöhung der Lebensspanne führte (Gao *et al.*, 2015). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass möglicherweise auch die Nutzung von Inhibitoren gegen cGAS positive Effekte erzielen würde. Solche Hemmstoffe nutzen auch Viren zur Umgehung der Immunantwort, die daher als Grundlage zur Entwicklung der Therapeutika genutzt werden könnten. Einer der bekanntesten natürlichen Inhibitoren für cGAS ist KicGAS (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibitor of cGAS*), das als Tegumentprotein vom humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) exprimiert wird (Wu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Dieses Virus produziert auch einen weiteren Hemmstoff namens vIRF1 (*viral interferon regulatory factor 1*), der jedoch STING blockiert und dadurch die Interaktion mit TBK1 unterbindet (Ma *et al.*, 2015).

Neben der Erkennung bietet auch der Abbau der ektopischen, zytoplasmatischen DNA über Autophagie Ansatzpunkte zur Therapie. Zu diesen Modulatoren des Abbauweges zählen mTOR-Inhibitoren, wie Rapamycin und Torin-1, deren immunsuppressive Wirkung im Zuge dieser Arbeit aufgezeigt wurde (Abschnitt 3.1.17). Gleichzeitig sei aber auch noch einmal deren anti-proliferativer Effekt hervorgehoben, der zusätzlich zur Unterdrückung des Vorkommens von perinukleären Körperchen führen kann (Abschnitt 4.1.4).

Rapamycin, das auch unter dem Namen Sirolimus bekannt ist, wurde aus dem Pilz *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und im Jahre 1999 von der FDA (*Federal Drug Association*) in den USA als Immunsuppressivum zugelassen. Seit 2001 gilt diese Zulassung ebenso in der Europäischen Union (EU) durch Erteilung der Europäischen Arzneimittelbehörde EMA (*European Medicines Agency*). Der Wirkstoff wird unter dem Handelsnamen Rapamune® insbesondere zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen vertrieben (Lamming, 2016). Interessanterweise konnte ferner die Langzeitanwendung in verschiedenen Modellorganismen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*) mit einer Verlängerung der

Lebensspanne assoziiert werden (Kaeberlein *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2009; Bjedov *et al.*, 2010). Als Ursache dieses Effektes werden unterschiedliche Szenarien diskutiert. Dazu zählen die erhöhte Qualitätskontrolle der Proteine durch gesteigerte Autophagie, die verminderte Tumorraten durch Senkung der Proliferation sowie die Verhinderung von Seneszenz (Lamming, 2016). Insbesondere das zuletzt genannte Postulat zur Wirkung von Rapamycin ist im Hinblick auf den seneszenten Phänotyp RNase H2-defizienter MEFs (Abschnitt 3.1.19) sowie AGS-Fibroblasten (Günther *et al.*, 2015) hervorzuheben. Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der seneszente Zellzustand zur Minderung der ISG-Expression führt (Abb. 27C), jedoch mag dieser Effekt auf der erhöhten Autophagie sowie dem Proliferationsstopp beruhen. Beide Charakteristika der zellulären Seneszenz stellen das Immunsuppressivum nach, da es auch zur Erhöhung des autophagischen Prozesses führt, der bedeutend für den Abbau ektopischer Nukleinsäuren ist (Abschnitt 4.1.4), und die Proliferationsrate mindert, sodass weniger zytosolische DNA-Strukturen auftreten sollten (Abb. 18B). Ein weiterer Vorteil und Gegensatz zum seneszenten Phänotyp besteht in der Minderung der Sekretion inflammatorischer Zytokine durch Rapamycin (Lalberg *et al.*, 2015).

Insgesamt können die oben aufgeführten potenziellen Therapeutika jedoch nur zur Linderung des zellulären Phänotyps beitragen, da die fehlende Funktionalität der RNase H2 als RER-Enzym weiterhin zum Auftreten der immunogenen, zytoplasmatischen DNA führt.

4.2 RNase H2-Defizienz im murinen Gehirn

Das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) zeigt eine klare phänotypische Ausprägung im humanen Gehirn, die sowohl durch morphologische als auch biochemische Veränderungen gekennzeichnet ist. Zu den häufigsten Leitsymptomen des ZNS zählen Kalzifizierungen, Leukoenzephalopathien, Mikrozephalien und zerebrale Atrophien, die von einer chronischen Entzündung mit verändertem Zytokinprofil begleitet werden (Aicardi und Goutières, 1984; Lanzi *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2007; Takanohashi *et al.*, 2013). Ebenso bestehen deutlich erhöhte Interferon- α -Konzentrationen in der zerebrospinalen Flüssigkeit und dem Serum, die mit dem Auftreten einer ISG-Signatur einhergehen und als diagnostischer Marker genutzt werden (Rigby *et al.*, 2008; Crow *et al.*, 2009; Ramantani *et al.*, 2010).

Als Hauptquelle des Typ I Interferons wurden Astrozyten in Gehirnschnitten von AGS-Patienten identifiziert (van Heteren *et al.*, 2008). Damit im Einklang führte die astrogliale Überexpression des Interferons im Mausmodell zur Ausprägung eines AGS-ähnlichen Phänotyps (Akwa *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1999). Demzufolge besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression von Interferon-alpha und der Ausprägung der AGS-Krankheitsmerkmale (Cuadrado *et al.*, 2013)

Dieser *in-vivo*-Phänotyp konnte jedoch nicht durch den konditionalen *Knock-out* der RNase H2 in Astrozyten sowie Neuronen unter Nutzung des GFAP_Cre_H2B-Stammes (Abschnitt 3.2.1 und Abschnitt 3.2.2) im Zuge dieser Arbeit nachgestellt werden. Stattdessen wiesen die murinen Gehirne keinerlei Übereinstimmung mit den klinischen und subklinischen AGS-Merkmalen auf (Abb. 33,34 und Abb. 35). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen verschiedener *Knock-in*-Mausmodelle, bei denen AGS-Mutationen in den Untereinheiten der Ribonuklease H2 eingeführt wurden (Mackenzie *et al.*, 2016; Pokatayev *et al.*, 2016). So wiesen die untersuchten Gehirne im Gegensatz zu anderen Organen (Herz, Nieren) keine ISG-Signatur auf (Mackenzie *et al.*, 2016). Diese fehlende Ausprägung der Krankheitsmerkmale in Bezug auf das ZNS trifft jedoch nicht nur auf die RNase H2 zu, sondern kann auch in weiteren AGS-relevanten Mausmodellen beobachtet werden. So ist bei TREX1-defizienten Mäusen insbesondere das Herz betroffen (Morita *et al.*, 2004), während SAMHD1-defiziente Tiere bis auf eine leichte ISG-Signatur in wenigen Geweben phänotypisch unauffällig sind (Rehwinkel *et al.*, 2013).

Im klaren Gegensatz dazu zeigen die Zellkultursysteme deutliche Effekte, wie sie auch bei den primären RNase H2-defizienten Astrozyten beobachtet werden konnten (Abschnitt 3.2.5 und Abschnitt 3.2.6). Als Ursache dieses Unterschiedes zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-System könnte der Proliferationsstatus angesehen werden, dessen Einfluss als zentraler Schlüsselfaktor bereits in den induzierbaren RNase H2-*Knock-out*-MEFs herausgestellt wurde (Abb. 18 und Abschnitt 4.1.2). So teilen sich Astrozyten im adulten Organismus unter physiologischen Bedingungen nicht, sondern werden erst durch Induktion von Gewebsschäden zur Hyperproliferation angeregt (Sofroniew und Vinters, 2010). In den astroglialen Primärkulturen hingegen findet die Zellproliferation statt und wird durch Zusatz des Wachstumsfaktors EGF (*epidermal growth factor*) ins Gliamedia zusätzlich verstärkt. Die RNase H2 nimmt in diesem Prozess eine entscheidende Rolle in der Entfernung fehlerhaft eingebauter Ribonukleotide aus der genomischen DNA ein (Reijns *et al.*, 2012), sodass einzig in replikativ aktiven Zellen Folgen der enzymalen Abwesenheit sichtbar werden sollten. Diese Hypothese wird durch ein weiteres Mausmodell unterstützt, bei dem die RNase H2 in den intestinalen Stammzellen ausgeschaltet wurde. Diese Mäuse zeigen bereits unter homöostatischen Bedingungen sowohl im Dünndarm als auch Dickdarm starke morphologische und biochemische Veränderungen, die im Zuge des Alterungsprozesses sowie einer induzierten Colitis noch stärker hervortreten (Aden, Bartsch *et al.*, unveröffentlicht).

Grundsätzlich unterscheiden sich die Folgen der RNase H2-Defizienz zwischen den MEFs und den Astrozyten nicht. In beiden Primärkultursystemen sind Schädigungen der DNA, das Vorliegen einer ISG-Signatur sowie Anzeichen von zellulärer Seneszenz zu beobachten. Zusätzlich wurden in den astroglialen Defizienzsystemen *Priming*-Effekte aufgezeigt (Abb. 39), wie sie bereits für ATM-defiziente Zellen beschrieben wurden (Härtlova *et al.*, 2015). Diese gesteigerte Immunantwort beruht auf einem externen Auslöser zur Aktivierung des Immunsystems und weist auf einen möglichen

Einfluss von Umweltfaktoren auf das klinische Bild von AGS hin. So wurden beispielsweise Fälle aufgezeichnet, in denen es erst durch die Impfung von gesunden Menschen zur Manifestation der AGS-Merkmale kam (Ramantani *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang wurde auch eine erhöhte Photosensitivität von SLE-Patienten mit RNase H2-Mutationen beschrieben und mechanistisch aufgeklärt (Günther *et al.*, 2015).

Im Widerspruch zur Hypothese der Bedeutung der RNase H2 einzig für proliferativ aktive Zellen, steht die hohe Expression des Enzymes in Neuronen, die ebenso als Ziel des konditionalen *Knock-outs* im GFAP_Cre_H2B-Stamm identifiziert wurden (Abb. 31). Jedoch schien auch die Genausschaltung in diesem Zelltyp nicht zur Ausprägung phänotypischer Merkmale beizutragen. In diesen postmitotischen Zellen könnte die Funktion der Ribonuklease H2 im Abbau des RNA-Anteils von RNA:DNA-Hybriden bestehen. Da dieser Abbau aber auch von der nukleären Isoform der RNase H1 durchgeführt werden kann (Cerritelli *et al.*, 2009), mag hier ein kompensatorischer Prozess stattfinden, sodass insgesamt keine eindeutige Aussage über die Bedeutung des Enzymes in teilungsinaktiven Zellen möglich ist.

Zusammengefasst wurde ein weiteres primäres Zellkultursystem etabliert, das die Ergebnisse der CreERT-MEFs stützt. Ebenso wurde aufgezeigt, dass der konditionale RNase H2-*Knock-out* unter Verwendung des GFAP_Cre-Treiberstammes nicht als AGS-Modell genutzt werden kann, da die transgenen Mäuse keines der Leitsymptome aufwiesen.

5. AUSBLICK

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Folgen der RNase H2-Defizienz auf molekularer Ebene unter Nutzung eines induzierbaren, murinen *Knock-out*-Systems analysiert um Rückschlüsse auf die Pathogenese des Aicardi-Goutières-Syndroms ziehen zu können. Anhand experimenteller Ansätze konnten grundlegende mechanistische Zusammenhänge geschlussfolgert werden, die in zukünftigen Studien vertieft, ausgebaut und hinsichtlich therapeutischer Optionen ausgetestet werden sollten.

Schwerpunkte dieser vertiefenden Untersuchungen liegen in der weiteren Charakterisierung der immunstimulierenden Substrate, der Betrachtung des möglichen Zusammenhanges zwischen DNA-Detektion, Autophagie und Seneszenz, der Etablierung weiterer konditionaler *Knock-out* Systeme sowie der Analyse von humanem Patientenmaterial.

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits das Vorkommen einzel- und doppelsträngiger DNA belegt, ohne eine Akkumulation von RNA:DNA-Heteroduplexen auszuschließen. Da diese Nukleinsäurespezies ein Substrat der RNase H2 darstellt und in einigen Studien als Auslöser der Interferon-Antwort postuliert wird (Chon *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014; Keskin *et al.*, 2014; Lim *et al.*, 2015), sollte auch diese Theorie überprüft werden. Methodisch wäre hier wichtig insbesondere die Aufreinigung der Nukleinsäuren des Zytoplasmas zu etablieren um konkrete Aussagen über die Länge, Spezies und Sequenz dieser Biomoleküle zu treffen zu können. Des Weiteren sollte gleichfalls die genomische DNA in den Fokus gerückt und bezüglich der Inkorporation von rNMPs sowie daraus resultierenden Deletionen aufgrund des alternativen RER-Mechanismus über die Topoisomerase 1 analysiert werden (Kim *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2013; Sparks *et al.*, 2015). Ergänzend wären außerdem Komplementationsexperimente von Interesse, bei denen die RNase H1 und/oder H2 sowie ausgewählte Mutanten in die induzierbaren *Knock-out*-Zellen eingebracht werden. Anhand dieser Ergebnisse ließen sich konkrete Rückschlüsse darüber ziehen, ob einzelne oder aufeinanderfolgende Ribonukleotide im Genom zur Ausprägung des in dieser Arbeit beschriebenen Phänotyps führten. Zur genaueren Klärung dieses Sachverhaltes wäre auch die in *Saccharomyces cerevisiae* beschriebene Mutation zur Entkopplung der beiden Funktionen der RNase H2 informativ (Chon *et al.*, 2013). Vergleichbare Experimente wurden bereits für p53^{-/-} H2B^{-/-} Zellen durchgeführt (Mackenzie *et al.*, 2016) und dienten in dieser Arbeit als Grundlage zur Diskussion des Mechanismus (Abschnitt 4.1.2).

Ein weiterer Schwerpunkt neben der akkumulierenden Nukleinsäurespezies und deren Ursprung sollte in der mechanistischen Kopplung der Prozesse Detektion und Autophagie liegen. Dazu bestehen bereits einige Studien insbesondere im Zusammenhang mit Pathogenen wie dem *Mycobacterium tuberculosis* (Watson *et al.*, 2015) oder dem *Herpes simplex virus* (HSV; Liang *et al.*, 2014). Diese zeigten die direkte Kolokalisation des Sensors cGAS mit dem Faktor Beclin-1, der Bestandteil des

PI3KC3 (*phosphatidyl inositol 3 kinase class III*)-Komplexes ist. Dadurch wurde nicht nur die Initiation der Autophagie induziert, sondern gleichzeitig auch die Aktivität des Sensors vermindert (Liang *et al.*, 2014). Außerdem wurden Abhängigkeiten zwischen dem Adaptor STING und LC-3 II bzw. zwischen STING und Atg9a beschrieben (Saitoh *et al.*, 2009; Watson *et al.*, 2015). Funktionell wird dabei die Regulation der angeborenen Immunantwort diskutiert, da eine konstitutive Aktivierung des Adaptors zur Autoimmunerkrankung SAVI (*STING-associated vasculopathy with onset in infancy*) führt (Liu *et al.*, 2014; Crow und Casanova, 2014). So transloziert STING im Komplex mit TBK1 nach der Aktivierung vom ER über den Golgi Apparat als Autophagosomen-ähnliches Vesikel ins Zytoplasma. Diese ATG9a-positiven, vesikulären Strukturen fusionieren mit Endosomen, die spezifische Transkriptionsfaktoren enthalten und von TBK1 aktiviert werden (Saitoh *et al.*, 2009; Ishikawa *et al.*, 2009; Barber, 2011). Anschließend wird STING ULK1-abhängig phosphoryliert und degradiert (Konno *et al.*, 2013). Damit ergibt sich ein nicht-kanonischer Autophagie-verwandter Prozess. Inwiefern diese Mechanismen auch in RNase H2 defizienten Zellen greifen, muss experimentell geklärt werden.

Des Weiteren sollte auch das Vorkommen zytoplasmatischer DNA-Spezies in der zellulären Seneszenz begutachtet werden, da hier aufgrund der gesenkten ISG-Signatur in den induzierten MEFs nur Vermutungen bezüglich einer reduzierten Anzahl an MNi aufgestellt wurden.

Doch nicht nur auf *in-vitro*-, sondern auch *in-vivo*-Ebene sind neue Versuchsansätze sinnvoll. So wurden bereits weitere konditionale RNase H2-*Knock-out*-Stämme gezüchtet und charakterisiert, die jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, aber einen deutlichen *in-vivo*-Phänotyp aufwiesen (Aden, Bartsch *et al.*, unveröffentlicht). Anhand dieser Mauslinien können die identifizierten molekularen Mechanismen verifiziert, ergänzt oder korrigiert, im Kontext eines Organismus interpretiert und bezüglich der Validierung potenzieller, therapeutischer Ansätze genutzt werden. Ferner können diese *Knock-outs* durch die Ausschaltung weiterer Gene, die möglichst Schlüsselfaktoren in den identifizierten Prozessen wie DNA-Schadensantwort oder Autophagie sind (p53, ATG5, ATG16L1, *etc.*), ergänzt und untersucht werden. Sinnvoll sind dabei auch Cre-unabhängige Systeme, da die Aktivität der Rekombinase ebenso mit der Induktion von DNA-Schäden assoziiert ist. Zur Vermeidung dieses Effektes wurde in dieser Arbeit ein induzierbares System unter Nutzung geringer Hydroxytamoxifen-Konzentrationen und kurzer Induktionsdauer genutzt (Loonstra *et al.*, 2001).

Zuletzt muss natürlich die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den humanen Organismus und insbesondere an AGS erkrankten Personen erbracht werden. Diese Studien sollten daher an verschiedenen humanen Zellarten durchgeführt und auf *in-situ*-Proben von Patienten ausgeweitet werden. Da das Postulat, welche Zellart im Gehirn Interferon-alpha sekretiert, nur auf einer Studie beruht (van Heteren *et al.*, 2008), in der auch keine Unterscheidung der Patientenproben nach der bestehenden Mutation vorgenommen wurde, wären außerdem erneute Färbungen, insbesondere an Gehirnschnitten von AGS-Patienten mit RNase H2-Mutationen wünschenswert.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Nucleinsäurestoffwechsel ist ein streng reguliertes Netzwerk, dessen Integrität durch eine Vielzahl an Proteinen geschützt wird, die verschiedene Aufgaben in der Synthese, Modifizierung, Degradation und Detektion der unterschiedlichen Nucleinsäurespezies einnehmen. Daher führen Mutationen in diesen Regulatoren zu Erkrankungen wie dem Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS), einer entzündlichen Autoimmunerkrankung. Nahezu die Hälfte aller betroffenen Patienten trägt dabei hypomorphe Mutationen in den drei Untereinheiten der RNase H2, einem Enzym, das sowohl den RNA-Anteil von RNA:DNA-Hybriden abbauen als auch einzelne Ribonukleotide aus DNA-Duplexen entfernen kann. Als Ursache des aktivierten Immunsystems bei AGS wird die Akkumulation von unprozessierten Nucleinsäuren aufgrund der enzymalen Dysfunktion postuliert. Dennoch konnte dieses immunstimulierende Substrat bisher nicht identifiziert werden.

Unter Nutzung eines induzierbaren, murinen RNase H2-*Knock-out*-Systems wurde nun in der vorliegenden Arbeit auf *in-vitro*-Ebene das Auftreten von einzel (ss)- und doppelsträngiger (ds) DNA im Zytoplasma aufgezeigt. Es handelte sich dabei um geschädigte und neu-synthetisierte dsDNA, die sich durch einen nukleären Exportprozess im extranukleären Kompartiment als perinukleäre Körperchen anreicherten und hier vom Sensor cGAS erkannt wurden. Die direkte Kollokalisierung dieser Nucleinsäurespezies mit dem detektierenden Protein erklärte zudem mechanistisch die erhöhte Expression der ISGs, einem Hauptmerkmal des Aicardi-Goutières-Syndroms. Neben der Aktivierung des cGAS-STING-Signalweges wurde des Weiteren experimentell aufgezeigt, dass gleichzeitig der Abbau der ektopischen DNA über Autophagie erfolgte und unter Nutzung pharmakologischer mTOR-Inhibitoren zusätzlich verstärkt werden konnte und damit therapeutische Optionen eröffnete. Zuletzt wurde der Zellzustand der zellulären Seneszenz als Antwort auf die Schädigung des Genoms aufgezeigt und dessen Funktion zur Unterdrückung der Akkumulation zytoplasmatischer DNA postuliert.

Die im Zuge dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse wurden durch ein alternatives, astrogliales Primärkultursystem zusätzlich unterstützt sowie die Bedeutung der Proliferation anhand des fehlenden AGS-Phänotyps des konditionalen GFAP_Cre-H2B-Stammes untermauert, dessen vom *Knock-out* betroffene Zellen sich im adulten Mausgehirn nicht mehr teilten.

Zusammengefasst konnten die molekularen Prozesse als Reaktion auf den funktionalen Verlust der RNase H2 teilweise aufgeklärt und damit eine Grundlage zum Verständnis der Pathogenese des Aicardi-Goutières-Syndroms geschaffen werden.

7. SUMMARY

The nucleic acid metabolism is a strictly regulated network protected by a number of proteins mediating in synthesis, modification, degradation and detection of different nucleic acids. Thus mutations in these regulators can lead to pathogenic conditions, like the Aicardi-Goutières syndrome (AGS), an inflammatory autoimmune disease. Nearly half of the patients have hypomorphic mutations in the three subunits of the RNase H2 complex, an enzyme able to cleave the RNA strand of RNA:DNA hybrids and to excise rNMPs from DNA duplexes. It has been proposed that a build-up of unprocessed nucleic acids underlies activation of the immune system in AGS, although the exact immunostimulatory substrate has not been identified yet.

In this study the usage of an inducible, murine RNase H2 knock-out *in-vitro* system enabled the detection of single (ss) and double stranded (ds) DNA in the cytoplasm. Closer characterisation revealed the nuclear export of damaged and newly synthesized dsDNA which accumulated in form of perinuclear bodies (PNBs) in the extranuclear compartment. The ectopic dsDNA structures are recognized by the cytosolic sensor cGAS. Moreover, direct colocalisation of PNBs and cGAS mechanistically explained the interferon stimulatory gene (ISG) upregulation, a hallmark of AGS. Besides activation of the cGAS-STING-pathway, degradation of the ectopic dsDNA via autophagy was experimentally shown and increased by pharmacological mTOR inhibition, giving rise to therapeutical options. Finally, development of premature senescence was established as a consequence of genomic damage and postulated to suppress the accumulation of cytoplasmic DNA.

In addition, these findings were supported by an astroglial primary cell culture system. Furthermore, the absence of an AGS-like phenotype in GFAP_Cre_H2B mice highlights the relevance of proliferation in this *in-vivo* system.

Alltogether, the molecular processes following genetic ablation of RNase H2 were partially elucidated, which can be used now to help understanding AGS pathogenesis.

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADAR1	<i>adenosine deaminase acting on RNA 1</i>
AGS	Aicardi-Goutieres-Syndrom
AIM2	absent in melanoma protein 2
ANOVA	<i>analysis of variances</i>
AP	alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AraC	Cytosin- β -D- Arabinofuranosidhydrochlorid
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATG	<i>autophagy-related gene</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
BafA	Bafilomycin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>

CDR	<i>cytosolic DNA receptor</i>
cGAMP	<i>cyclic GMP-AMP</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
CH25H	Cholesterol-25-Hydroxylase
CHK	<i>checkpoint kinase</i>
CMA	<i>chaperon-mediated autophagy</i>
CMV	Cytomegalievirus
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i>
ctrl	<i>control</i>
DAB-Färbung	3,3'-Diaminobenzidin-Färbung
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA-Schadensantwort, <i>DNA damage response</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleotide acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotid
Doxo	Doxorubicin
ds	doppelsträngig, <i>double-stranded</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
DVP	Dauerverpaarung
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>

engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i>
EU	Europäische Union
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FDA	<i>Federal Drug Association</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FIP200	<i>focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kD</i>
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein, <i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
HE-Färbung	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHV-8	humanes Herpesvirus 8
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HS	Pferdeserum, <i>horse serum</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
IB	Immunblot
Iba-1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
ICC	Immunzytochemie
IFIH1	<i>interferon induced with helicase C domain protein 1</i>
IFI16	<i>interferon inducible gene 16</i>
IFIT	<i>IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
IFITM	IFN-induzierbare Transmembranproteine
IFN	Interferon

IFNAR	Interferon-alpha-Rezeptor
IHC	Immunhistochemie
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	<i>interferon-stimulated gene</i>
IVC	individually ventilated cage
JAK	Januskinase
Kat.nr.	Katalognummer
KicGAS	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibitor of cGAS</i>
KVI	kongenitale Virusinfektion
Lamp2a	<i>lysosomal associated membrane proteine 2a</i>
LC3	<i>microtubule associated protein 1 light chain 3</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
max.	maximal
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MEF	murine, embryonale Fibroblasten
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MMR	<i>mismatch-repair</i>
MNi	Mikronuklei
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mt	mitochondrial
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
m/v	Masse pro Volumen
MW	Mittelwert

Mx	<i>Myxovirus resistance</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAHR	<i>non-allelic homologous recombination</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa b</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal, <i>nuclear localization signal</i>
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA Decay</i>
nt	Nukleotid
OAS	2',5'-Oligoadenylat-Synthetase
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
ORF	<i>open reading frame</i>
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3KC3	<i>phosphatidyl inositol 3 kinase class III</i>
PIP	<i>PCNA-interacting-peptide</i>
PNB	<i>perinuclear body</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAB	<i>Ras-related in brain</i>
Rapa	Rapamycin
RER	<i>ribonucleotide excision repair</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	<i>retinoic acid-inducible gene I-like receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleotide acid</i>
RNase H	Ribonuklease H

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rNMPs	<i>ribonucleotide monophosphate</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatinfoci
SAMHD1	<i>sterile alpha motif domain and HD domain-containing protein 1</i>
SASP	Seneszenz-assoziiierter, sekretorischer Phänotyp
SAVI	<i>STING-associated vasculopathy with onset in infancy</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
sog.	sogenannt
ss	einzelstränig, <i>single-stranded</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SV40	Simian-Virus-40
Tab.	Tabelle
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TIR-Domäne	<i>Toll/IL-1R homology domain</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Top1	Topoisomerase 1
Tor-1	Torin-1
TREX1	<i>three prime repair exonuclease 1</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIM	<i>tripartite motif</i>
TVP	Terminverpaarung
u.a.	unter anderem

UBL	<i>ubiquitin-like</i>
ULK	<i>Unc-51-like kinase</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	<i>untranslated region</i>
VHH	Victor-Hensen-Haus
Viperin	<i>virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, IFN-inducible</i>
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
v/v	Volumen pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Alle Einheiten wurden nach den Normen der SI verwendet. Ferner wurden alle proteinogenen Aminosäuren gemäß dem Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Klinischer Phänotyp bei AGS-Patienten.

Abb. 2 Charakterisierung der RNase H2 bezüglich ihrer Struktur und Substrate.

Abb. 3 AGS-assoziierte Mutationen in den Untereinheiten der RNase H2.

Abb. 4 Hauptsignalwege zur Detektion von Nukleinsäuren.

Abb. 5 Makroautophagie.

Abb. 6 DNA-Schadensantwort.

Abb. 7 Zucht des induzierbaren *Knock-out*-Stammes CreERT_H2B.

Abb. 8 Funktionsweise des Induktionssystems.

Abb. 9 Verifizierung des 4-OHT induzierbaren RNaseH2B-*Knock-outs*.

Abb. 10 Abbau der RNaseH2B-Untereinheit.

Abb. 11 Verstärktes Auftreten von DNA-Schäden in RNase H2-defizienten MEFs.

Abb. 12 RNase H2-Defizienz führt zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort.

Abb. 13 RNase H2-abhängiges Auftreten einer ISG-Signatur.

Abb. 14 Einzelsträngige DNA im Zytoplasma RNase H2-defizienter Zellen.

Abb. 15 Zytoplasmatische dsDNA-Strukturen in RNase H2-defizienten MEFs.

Abb. 16 Export geschädigter DNA ins Zytoplasma.

Abb. 17 Export neu-synthetisierter, geschädigter DNA.

Abb. 18 Einfluss der Proliferationsrate auf das Vorkommen zytoplasmatischer dsDNA.

Abb. 19 Induktion von DNA-Schäden führt zum Vorkommen zytoplasmatischer pH2A.X⁺ dsDNA-Strukturen sowie zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort in Wildtyp-MEFs.

Abb. 20 Signaltransduktion in RNase H2-defizienten MEFs über den cGAS-STING-Signalweg.

Abb. 21 Bindung des Sensors cGAS an zytoplasmatische dsDNA.

Abb. 22 Abbau extranukleärer, zytoplasmatischer DNA durch Autophagie.

- Abb. 23** Erhöhte basale Autophagie in RNase H2 defizienten MEFs.
- Abb. 24** Einfluss von mTOR-Inhibitoren auf den Phänotyp.
- Abb. 25** RNase H2-Defizienz ohne Einfluss auf das lysosomale Kompartiment.
- Abb. 26** RNase H2-Defizienz bedingt Seneszenz und SASP.
- Abb. 27** Langzeiteffekte RNase H2-defizienter Kulturen.
- Abb. 28** Initiale Charakterisierung RNase H2/p53-defizienter MEFs.
- Abb. 29** Gleichzeitige p53-Defizienz rettet den seneszenten Phänotyp RNase H2-defizienter MEFs.
- Abb. 30** Zucht des konditionalen *Knock-out*-Stammes GFAP_Cre_H2B.
- Abb. 31** Verifizierung des konditionalen *Knock-outs* im GFAP_Cre_H2B-Stamm.
- Abb. 32** RNase H2-Expression in Gehirnen der Stämme EMX1_Cre_H2B und GFAP_Cre_H2B.
- Abb. 33** RNase H2-Defizienz im Gehirn ohne morphologischen Phänotyp.
- Abb. 34** RNase H2-Defizienz im Gehirn ohne inflammatorischen Phänotyp.
- Abb. 35** Abwesenheit eines subklinischen Phänotyps in GFAP_Cre^{+/-}-Tieren.
- Abb. 36** Verifizierung des astroglialen *Knock-outs* im *in-vitro*-System.
- Abb. 37** Vorliegen einer ISG-Signatur und Vorkommen von DNA-Schäden in RNase H2-defizienten primären Astrozyten.
- Abb. 38** Astrogliale RNase H2-Defizienz ohne apoptotischen Phänotyp.
- Abb. 39** Astrogliale RNase H2-Defizienz mit Zeichen von zellulärer Seneszenz.
- Abb. 40** *Priming*-Effekte.
- Abb. 41** Graphischer Vergleich der auf ins Genom inkorporierte Ribonukleotide folgenden Prozesse unter physiologischen und RNase H2-defizienten Bedingungen.
- Abb. 42** Aktivierung des cGAS-STING-Signalweges in RNase H2-defizienten MEFs.
- Abb. 43** Graphisches Modell des Abbauweges von zytoplasmatischer dsDNA.
- Abb. 44** DNA-Schadensantwort und Langzeiteffekte in RNase H2-defizienten MEFs.
- Abb. 45** Graphische Zusammenfassung der molekularen Prozesse in RNase H2-defizienten MEFs.

Abb. A1 Negativkontrollen der immunzytochemischen Färbungen.

Abb. A2 Charakterisierung perinukleärer Körperchen.

Abb. A3 Grunddaten zum Vektor pMOWS-mRFP-eGFP-LC3.

Abb. A4 Zucht und *Knock-out*-Verifizierung des Stammes EMX1_Cre_H2B.

Abb. A5 graphische Übersicht der Mechanismen in RNase H2-defizienten MEFs.

IV. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Vergleich zwischen AGS, SLE und KVI

V. LITERATUR

- Ablasser A, Hemmerling I, Schmid-Burgk JL, Behrendt R, Roers A, Hornung V (2014). TREX1 deficiency triggers cell-autonomous immunity in a cGAS-dependent manner. *J Immunol*, 192(12): 5993-5997.
- Adams PD (2009). Healing and hurting: molecular mechanisms, functions and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell*, 36:2–14.
- Ahn J, Xia T, Konno H, Konno K, Ruiz P, Barber GN (2014). Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat Commun*, 5:5166.
- Aicardi J, Goutières F (1984). A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann Neurol*, 15:49-54.
- Akwa Y, Hassett DE, Eloranta ML, Sandberg K, Masliah E, Powell H, Whitton JL, Bloom FE, Campbell IL (1998). Transgenic expression of IFN-alpha in the central nervous system of mice protects against lethal neurotropic viral infection but induces inflammation and neurodegeneration. *J Immunol*, 161:5016-26.
- Altmepfen HC, Prox J, Krasemann S, Puig B, Kruszewski K, Dohler F, Bernreuther C, Hoxha A, Linsenmeier L, Sikorska B, Liberski PP, Bartsch U, Saftig P, Glatzel M (2015). The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *Elife*, doi: 10.7554/eLife.04260.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403-10.
- Amaya C, Fader CM, Colombo MI (2015). Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett*, 589(22):3343-53.
- Appella E, Anderson CW (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem. FEBS*, 268:2764-2772.
- Arudchandran A, Cerritelli S, Narimatsu S, Itaya M, Shin DY, Shimada Y, Crouch RJ (2000). The absence of ribonuclease H1 and H2 alters sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea, caffeine and ethyl methanesulphonate: implications for roles of RNases H in DNA replication and repair. *Genes Cells*, 5: 789-802.
- Athanasiadis A, Rich A, Maas S (2004). Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS Biol*, 2(12):e391.
- Barber GN (2011). STING-dependent signaling. *Nat Immunol*, 12(10):929-30.
- Beloglazova N, Flick R, Tchigvintsev A, Brown G, Popovic A, Nocek B, Yakunin AF (2013). Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction. *J Biol Chem*, 288(12):8101-10.

- Benanti JA (2012). Coordination of cell growth and division by the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cell Dev Biol*, 23(5):492-8.
- Berger A, Sommer AF, Zwarg J, Hamdorf M, Welzel K, Esly N, Panitz S, Reuter A, Ramos I, Jatiani A, Mulder LC, Fernandez-Sesma A, Rutsch F, Simon V, König R, Flory E (2011). SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. *PLoS Pathog*, 7(12):e1002425.
- Bermudez, VP, Lindsey-Boltz LA, Cesare AJ, Maniwa Y, Griffith JD, Hurwitz J, Sancar A (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hrad17-replication factor c complex in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:1633-38.
- Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab*, 11(1):35-46.
- Bubeck D, Reijns MA, Graham SC, Astell KR, Jones EY, Jackson AP (2011). PCNA directs type 2 RNase H activity on DNA replication and repair substrates. *Nucleic Acids Res*, 39(9):3652-66.
- Burman P, Karlsson FA, Öberg K, Alm G (1985). Autoimmune thyroid disease in interferon-treated patients. *Lancet*, 2:100-1.
- Campbell IL, Krucker T, Steffensen S, Akwa Y, Powell HC, Lane T, Carr DJ, Gold LH, Henriksen SJ, Siggins GR (1999). Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN-alpha. *Brain Res*, 835:46-61.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews*, 8: 729-40.
- Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*, 21:354-59.
- Campisi J (2013). Aging, cellular senescence and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75:685-705.
- Cao X, Ding Q, Lu J, Tao W, Huang B, Zhao Y, Niu J, Liu YJ, Zhong J (2015). MDA5 plays a critical role in interferon response during hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, 62(4):771-8.
- Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. *Mutat Res*, 704:12-20.
- Cerritelli SM, Crouch RJ (2009). Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *FEBS J*, 276(6):1494-1505.
- Cerritelli SM, Frolova EG, Feng C, Grinberg A, Love PE, Crouch RJ (2003). Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol Cell*, 11:807-815.
- Chai Q, Qiu J, Chapados B, Shen B (2001). *Archaeoglobus fulgidus* RNase HII in DNA replication: enzymological functions and activity regulation via metal cofactors. *Biochem Biophys Res Commun*, 286:1073-1081.

- Chan YA, Aristizabal MJ, Lu PYT, Luo Z, Hamza A, Kobor MS, Stirling PC, Hieter P (2014). Genome-Wide Profiling of Yeast DNA:RNA Hybrid Prone Sites with DRIP-CHIP. *PLoS Genet*, 10(4): e1004288.
- Chapados BR, Chai Q, Hosfield DJ, Qiu J, Shen B, Tainer JA (2001). Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication. *J Mol Biol*, 307:541–556.
- Chen Y, Klionsky DJ (2011). The regulation of autophagy- unanswered questions. *J Cell Sci*, 124(2):161-70.
- Chon H, Vassilev A, DePamphilis ML, Zhao Y, Zhang J, Burgers PM, Crouch RJ, Cerritelli SM (2009). Contributions of the two accessory subunits, RNaseH2B and RNaseH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids Res*, 37(1):96-110.
- Chon H, Sparks JL, Rychlik M, Nowotny M, Burgers PM, Crouch RJ, Cerritelli SM (2013). RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities. *Nucleic Acids Res*, 41(5):3130-43.
- Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B, Perrino FW, Lieberman J (2006). The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell*, 23(1):133–142.
- Ciccia A, Elledge SJ (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 40(2):179-204.
- Ciechanover A (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1):79-87.
- Clemens MJ, Vaquero CM (1978). Inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: evidence for activation of an endoribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun*, 83(1):59-68.
- Clifford R, Louis T, Robbe P, Ackroyd S, Burns A, Timbs AT, Wright Colopy G, Dreau H, Sigaux F, Judde JG, Rotger M, Telenti A, Lin YL, Pasero P, Maelfait J, Titsias M, Cohen DR, Henderson SJ, Ross MT, Bentley D, Hillmen P, Pettitt A, Rehwinkel J, Knight SJ, Taylor JC, Crow YJ, Benkirane M, Schuh A. (2014). SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood*, 123(7): 1021-1031.
- Coffin SR, Hollis T, Perrino FW (2011). Functional consequences of the RNase H2A subunit mutations that cause Aicardi-Goutieres syndrome. *J Biol Chem*, 286(19):16984-91.
- Collins CJ, Sedivy JM (2003). Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell*, 2:145–50
- Collins AC, Cai H, Li T, Franco LH, Li XD, Nair VR, Scharn CR, Stamm CE, Levine B, Chen ZJ, Shiloh MU (2015). Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe*, 17(6):820-8.

- Collado M, Serrano M (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, 10:51–57
- Conover HN, Lujan SA, Chapman MJ, Cornelio DA, Sharif R, Williams JS, Clark AB, Camilo F, Kunkel TA, Argueso JL (2015). Stimulation of Chromosomal Rearrangements by Ribonucleotides. *Genetics*, 201(3):951-61.
- Crow YJ, Rehwinkel J (2009). Aicardi-Goutieres syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum Mol Genet*, 18(R2):R130-6.
- Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J, Szykiewicz M, Forte GM, Gornall HL, Oojageer A, Anderson B, Pizzino A, Helman G, Abdel-Hamid MS, Abdel-Salam GM, Ackroyd S, Aeby A, Agosta G, Albin C, Allon-Shalev S, Arellano M, Ariaudo G, Aswani V, Babul-Hirji R, Baidam EM, Bahi-Buisson N, Bailey KM, Barnerias C, Barth M, Battini R, Beresford MW, Bernard G, Bianchi M, Billette de Villemeur T, Blair EM, Bloom M, Burlina AB, Carpanelli ML, Carvalho DR, Castro-Gago M, Cavallini A, Cereda C, Chandler KE, Chitayat DA, Collins AE, Sierra Corcoles C, Cordeiro NJ, Crichtiutti G, Dabydeen L, Dale RC, D'Arrigo S, De Goede CG, De Laet C, De Waele LM, Denzler I, Desguerre I, Devriendt K, Di Rocco M, Fahey MC, Fazzi E, Ferrie CD, Figueiredo A, Gener B, Goizet C, Gowrinathan NR, Gowrishankar K, Hanrahan D, Isidor B, Kara B, Khan N, King MD, Kirk EP, Kumar R, Lagae L, Landrieu P, Lauffer H, Laugel V, La Piana R, Lim MJ, Lin JP, Linnankivi T, Mackay MT, Marom DR, Marques Lourenço C, McKee SA, Moroni I, Morton JE, Moutard ML, Murray K, Nabbout R, Nampoothiri S, Nunez-Enamorado N, Oades PJ, Olivieri I, Ostergaard JR, Pérez-Dueñas B, Prendiville JS, Ramesh V, Rasmussen M, Régál L, Ricci F, Rio M, Rodriguez D, Roubertie A, Salvatici E, Segers KA, Sinha GP, Soler D, Spiegel R, Stödberg TI, Straussberg R, Swoboda KJ, Suri M, Tacke U, Tan TY, te Water Naude J, Wee Teik K, Thomas MM, Till M, Tonduti D, Valente EM, Van Coster RN, van der Knaap MS, Vassallo G, Vijzelaar R, Vogt J, Wallace GB, Wassmer E, Webb HJ, Whitehouse WP, Whitney RN, Zaki MS, Zuberi SM, Livingston JH, Rozenberg F, Lebon P, Vanderver A, Orcesi S, Rice GI (2015). Characterisation of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR and IFIH1. *Am J Med Genet A*, 167A(2):296-312.
- Crow YJ, Casanova JL (2014). STING-associated vasculopathy with onset in infancy--a new interferonopathy. *N Engl J Med*, 371(6):568-71.
- Cuadrado E, Jansen MH, Anink J, De Filippis L, Vescovi AL, Watts C, Aronica E, Hol EM, Kuijpers TW (2013). Chronic exposure of astrocytes to interferon- α reveals molecular changes related to Aicardi-Goutieres syndrome. *Brain*, 136(Pt 1):245-58.
- Damme M, Suntio T, Saftig P, Eskelinen EL (2014). Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions. *Acta Neuropathol*, 129(3):337-62.

- Damme M, Stroobants S, Lüdemann M, Rothaug M, Lüllmann-Rauch R, Beck HC, Ericsson A, Andersson C, Fogh J, D'Hooge R, Saftig P, Blanz J (2015). Chronic enzyme replacement therapy ameliorates neuropathology in alpha-mannosidosis mice. *Ann Clin Transl Neurol*, 2(11):987-1001.
- Deretic V, Levine B (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, 5(6):527-49.
- Deretic V (2011). Autophagy in Immunity and Cell-Autonomous Defense Against Intracellular Microbes. *Immunol Rev*, 240(1): 92–104.
- Dice JF (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 3(4):295-9.
- Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM (2009). H2ax: Functional roles and potential applications. *Chromosoma*, 118: 683-692.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(20):9363-7.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366):215-21.
- Donehower LA (1997). Genetic instability in animal tumorigenesis models. *Cancer Surv*, 29:329-52.
- El Husseini N, Schlisser AE, Hales BF (2016). Hydroxyurea Exposure Activates the P53 Signaling Pathway in Murine Organogenesis-Stage Embryos. *Toxicol Sci*, 152(2):297-308.
- Feeley EM, Sims JS, John SP, Chin CR, Pertel T, Chen LM, Gaiha GD, Ryan BJ, Donis RO, Elledge SJ, Brass AL (2011). IFITM3 inhibits influenza A virus infection by preventing cytosolic entry. *PLoS Pathog*, 7(10):e1002337.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1):125-32.
- Figiel M, Chon H, Cerritelli SM, Cybulska M, Crouch RJ, Nowotny M (2011). The structural and biochemical characterization of human RNase H2 complex reveals the molecular basis for substrate recognition and Aicardi-Goutières syndrome defects. *J Biol Chem*, 286(12):10540-50.
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*, 19:2092–2100.
- Gan W, Guan Z, Liu J, Gui T, Shen K, Manley JL, Li X (2011). R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes Dev*, 25:2041–2056.

- Ganley IG, du Lam H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 284:12297–12305.
- Gao D, Li T, Li XD, Chen X, Li QZ, Wight-Carter M, Chen ZJ (2015). Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(42):E5699-705.
- George CX, Ramaswami G, Li JB, Samuel CE (2016). Editing of cellular self RNAs by adenosine deaminase ADAR1 suppresses innate immune stress responses. *J Biol Chem*, 291(12):6158-68.
- Gerber AP, Keller W (2001). RNA editing by base deamination: more enzymes, more targets, new mysteries. *Trends Biochem Sci*, 26(6):376-84.
- Ghodgaonkar MM, Lazzaro F, Olivera-Pimentel M, Artola-Borán M, Cejka P, Reijns MA, Jackson AP, Plevani P, Muzi-Falconi M, Jiricny J (2013). Ribonucleotides misincorporated into DNA act as strand-discrimination signals in eukaryotic mismatch repair. *Mol Cell*, 50(3):323-32.
- Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein JL, Jones KR (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 22(15):6309-14.
- Grieves JL, Fye JM, Harvey S, Grayson JM, Hollis T, Perrino FW (2015). Exonuclease TREX1 degrades double-stranded DNA to prevent spontaneous lupus-like inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(16):5117-22.
- Günther C, Kind B, Reijns MA, Berndt N, Martinez-Bueno M, Wolf C, Tüngler V, Chara O, Lee YA, Hübner N, Bicknell L, Blum S, Krug C, Schmidt F, Kretschmer S, Koss S, Astell KR, Ramantani G, Bauerfeind A, Morris DL, Cunninghame Graham DS, Bubeck D, Leitch A; Ralston SH, Blackburn EA, Gahr M, Witte T, Vyse TJ, Melchers I, Mangold E, Nöthen MM, Aringer M, Kuhn A, Lüthke K, Unger L, Bley A, Lorenzi A, Isaacs JD, Alexopoulou D, Conrad K, Dahl A, Roers A, Alarcon-Riquelme ME; Jackson AP, Lee-Kirsch MA (2015). Defective Removal of ribonucleotides from DNA promotes systemic autoimmunity. *J Clin Invest*, 125(1):413-24.
- Guo J, Hui DJ, Merrick WC, Sen GC (2000). A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J*, 19:6891–6899.
- Haaxma CA, Crow YJ, van Steensel MA, Lammens MM, Rice GI, Verbeek MM, Willemsen MA. (2010). A de novo p.Asp18Asn mutation in TREX1 in a patient with Aicardi–Goutières syndrome. *Am J Med Genet A*, 152A:2612–2617.
- Hage AE, Webb S, Kerr A, Tollervey D (2014). Genome-Wide Distribution of RNA-DNA hybrids identifies RNase H Targets in tRNA Genes, Retrotransposons and Mitochondria. *PLoS Genet*, 10(10): e1004716.

- Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol. Rep.*,22(1):215-221.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*, 282:37298–37302.
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253):392-5.
- Hart PD, Young MR, Jordan MM, Perkins WJ, Geisow MJ (1983). Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. A combined microscopic and computer study. *J Exp Med*, 158(2):477-92.
- Härtlova A, Erttmann SF, Raffi FA, Schmalz AM, Resch U, Anugula S, Lienenklaus S, Nilsson LM, Kröger A, Nilsson JA, Ek T, Weiss S, Gekara NO (2015). DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity*, 42(2):332-43.
- Harvey M, Sands AT, Weiss RS, Hegi ME, Wiseman RW, Pantazis P, Giovanella BC, Tainsky MA, Bradley A, Donehower LA (1993). In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene*, 8(9):2457-67.
- Hasan M, Koch J, Rakheja D, Pattnaik AK, Brugarolas J, Dozmorov I, Levine B, Wakeland EK, Lee-Kirsch MA, Yan N (2013). Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes. *Nat Immunol*, 14(1):61-71.
- Hasan M, Fermaintt CS, Gao N, Sakai T, Miyazaki T, Jiang S, Li QZ, Atkinson JP, Morse HC 3rd, Lehrman MA, Yan N (2015). Cytosolic Nuclease TREX1 Regulates Oligosaccharyltransferase Activity Independent of Nuclease Activity to Suppress Immune Activation. *Immunity*, 43(3):463-74.
- Hatch EM, Fischer AH, Deerinck TJ, Hetzer MW (2013). Catastrophic nuclear envelope collapse in cancer cell micronuclei. *Cell*, 154(1):47-60.
- Hayashi S, McMahon AP (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244(2):305-18.
- Helbig KJ, Eyre NS, Yip E, Narayana S, Li K, Fiches G, McCartney EM, Jangra RK, Lemon SM, Beard MR (2011). The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology*, 54(5):1506-17.
- Helton ES, Chen X (2007). P53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem*, 100:883-896.

- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813):740-5.
- Heteren van JT, Rozenberg F, Aronica E, Troost D, Lebon P, Kuijpers TW (2008). Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutières syndrome. *Glia*, 56(5):568-78.
- Hiller B, Achleitner M, Glage S, Naumann R, Behrendt R, Roers A (2012). Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *J Exp Med*, 209(8):1419-26.
- Holmes JB, Akman G, Wood SR, Sakhuja K, Cerritelli SM, Moss C, Bowmaker MR, Jacobs HT, Crouch RJ, Holt IJ (2015). Primer retention owing to the absence of RNase H1 is catastrophic for mitochondrial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 112(30):9334-9339.
- Hornung V, Barchet W, Schlee M, Hartmann G (2008). RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handb Exp Pharmacol*, (183):71-86.
- Huang Y, Fenech M, Shi Q (2011). Micronucleus formation detected by live-cell imaging. *Mutagenesis*, 26(1):133-8.
- Hühn D, Bolck HA, Sartori AA (2013). Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy. *Swiss Med Wkly*, 143:w13837.
- Ishikawa H, Ma Z, Barber GN (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 461(7265):788-92.
- Ivashkiv LB, Donlin LT (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*, 14(1):36-49.
- Jakobsen MR, Bak RO, Andersen A, Berg RK, Jensen SB, Jin T, Laustsen A, Hansen K, Ostergaard LJ, Fitzgerald KA, Xiao T, Mikkelsen JG, Mogensen TH, Paludan SR (2013). IFI16 senses DNA forms of the retroviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:4571–4580.
- Jaeger M, van der Lee R, Cheng SC, Johnson MD, Kumar V, Ng A, Plantinga TS, Smeekens SP, Oosting M, Wang X, Barchet W, Fitzgerald K, Joosten LA, Perfect JR, Wijmenga C, van de Veerdonk FL, Huynen MA, Xavier RJ, Kullberg BJ, Netea MG (2015). The RIG-I-like helicase receptor MDA5 (IFIH1) is involved in the host defense against *Candida* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34(5):963-74.
- Jeong HS, Backlund PS, Chen HC, Karavanov AA, Crouch RJ (2004). RNase H2 of *Saccharomyces cerevisiae* is a complex of three proteins. *Nucleic Acids Res*, 32:407-414.
- Jewell JL, Guan KL (2013). Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci*, 38(5):233-42.

- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20:1992–2003.
- Junt T, Barchet W (2015). Translating nucleic acid-sensing pathways into therapies. *Nat Rev Immunol*, 15(9):529-44.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19:5720–5728.
- Kaeberlein M, Powers RW 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, 310(5751):1193-6.
- Kaech S, Banker G (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, 1(5):2406-15.
- Kaisho T, Akira S (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 117(5):979-87
- Karlsson-Parra A, Burman P, Hagberg H, Öberg K, Alm G, Klareskog L, Karlsson FA (1990). Autoantibodies to epithelial cells in patients on long-term therapy with leucocyte-derived interferon-alpha (IFN- α) *Clin Exp Immunol*, 81:72–5.
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, 205(7): 1601–1610.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 53:3976–3985.
- Keskin H, Shen Y, Huang F, Patel M, Yang T, Ashley K, Mazin AV, Storici F (2014). Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature*, 515(7527):436-9.
- Ketteler R., Glaser S., Sandra O., Martens U. M., Klingmuller U (2002). Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther*, 9:477–487.
- Kind B, Muster B, Staroske W, Herce HD, Sachse R, Rapp A, Schmidt F, Koss S, Cardoso MC, Lee-Kirsch MA (2015). Altered spatial-temporal dynamics of RNase H2 complex assembly at replication and repair sites in Aicardi-Goutieres-Syndrome. *Hum Mol Genet*, 23(22):5950-60.
- Kim T, Kim TY, Song YH, Min IM, Yim J, Kim TK (1999). Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA damaging agents. *J Biol Chem*, 274(43):30686-9.
- Kim N, Jinks-Robertson S (2011). Mutagenic processing of ribonucleotides in DNA by yeast Topoisomerase I. *Science*, 332:1561–1564.

- Klionsky DJ, Emr SD (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497):1717-21.
- Konno H, Konno K, Barber GN (2013). Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. *Cell*, 155(3):688-98.
- Kortlever RM, Bernards R (2006). Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection. *Cell Cycle*, 5:2697–703
- Kranzusch PJ, Lee AS, Berger JM, Doudna JA (2013). Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep*, 3(5):1362-8.
- Kretschmer S, Wolf C, König N, Staroske W, Guck J, Häusler M, Luksch H, Nguyen LA, Kim B, Alexopoulou D, Dahl A, Rapp A, Cardoso MC, Shevchenko A, Lee-Kirsch MA (2015). SAMHD1 prevents autoimmunity by maintaining genome stability. *Ann Rheum Dis*, 74(3): e17.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (20):3613-22.
- Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, Limbad C, Demaria M, Li P, Hubbard GB, Ikeno Y, Javors M, Desprez PY, Benz CC, Kapahi P, Nelson PS, Campisi J (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*, 17(8):1049-61.
- Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, Bloch N, Maudet C, Bertrand M, Gramberg T, Pancino G, Priet S, Canard B, Laguette N, Benkirane M, Transy C, Landau NR, Kim B, Margottin-Goguet F (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*, 13(3):223-8.
- Lamming DW (2016). Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Rapamycin and Beyond. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(5).
- Lan YY, Londoño D, Bouley R, Rooney MS, Hacoheh N (2014). Dnase2a deficiency uncovers lysosomal clearance of damaged nuclear DNA via autophagy. *Cell Rep*, 9(1):180-92.
- Lanzi G, Fazzi E, D'Arrigo S (2002). Aicardi-Goutieres syndrome: a description of 21 new cases and a comparison with the literature. *Eur J Paediatr Neurol*, 6:A9–A22.
- Lazzaro F, Novarina D, Amara F, Watt DL, Stone JE, Costanzo V, Burgers PM, Kunkel TA, Plevani P, Muzi-Falconi M (2012). RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA. *Mol Cell*, 45(1):99-110.
- Levine B, Klionsky DJ (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6(4):463-77.

- Li W, Ajev D, Fu B, Wu JJ, Ma S, Liu X, Zhu F (2016). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Inhibitor of cGAS (KicGAS), Encoded by ORF52, is an Abundant Tegument Protein and is Required for Protection of Infectious Progeny Viruses. *J Virol*, 90(11):5329-42.
- Liang Q, Seo GJ, Choi YJ, Kwak MJ, Ge J, Rodgers MA, Shi M, Leslie BJ, Hopfner KP, Ha T, Oh BH, Jung JU (2014). Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses. *Cell Host Microbe*, 15(2):228-38.
- Liddicoat BJ, Chalk AM, Walkley CR (2016). ADAR1, inosine and the immune sensing system: distinguishing self from non-self. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 7(2):157-72.
- Lindahl T, Barnes DE, Yang YG, Robins P (2009). Biochemical properties of mammalian TREX1 and its association with DNA replication and inherited inflammatory disease. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 3):535-8.
- Lim YW, Sanz LA, Xu X, Hartono SR, Chédin F (2015). Genome-Wide DNA hypomethylation and RNA:DNA hybrid accumulation in Aicardi-Goutieres syndrome. *eLife*, 4: e08007.
- Liu SY, Aliyari R, Chikere K, Li G, Marsden MD, Smith JK, Pernet O, Guo H, Nusbaum R, Zack JA, Freiberg AN, Su L, Lee B, Cheng G (2013). Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity*, 38(1):92-105.
- Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Montealegre Sanchez GA, Tenbrock K, Wittkowski H, Jones OY, Kuehn HS, Lee CC, DiMattia MA, Cowen EW, Gonzalez B, Palmer I, DiGiovanna JJ, Biancotto A, Kim H, Tsai WL, Trier AM, Huang Y, Stone DL, Hill S, Kim HJ, St Hilaire C, Gurprasad S, Plass N, Chapelle D, Horkayne-Szakaly I, Foell D, Barysenka A, Candotti F, Holland SM, Hughes JD, Mehmet H, Issekutz AC, Raffeld M, McElwee J, Fontana JR, Minniti CP, Moir S, Kastner DL, Gadina M, Steven AC, Wingfield PT, Brooks SR, Rosenzweig SD, Fleisher TA, Deng Z, Boehm M, Paller AS, Goldbach-Mansky R (2014). Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med*, 371(6):507-18.
- Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, Berns A, Jonkers J (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(16):9209-14.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2):145-51.
- Lu J, Pan Q, Rong L, He W, Liu SL, Liang C (2011). The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J Virol*, 85(5):2126-37.
- Lujan SA, Williams JS, Clausen AR, Clark AB, Kunkel TA (2013). Ribonucleotides are signals for mismatch repair of leading-strand replication errors. *Mol Cell*, 50(3):437-43.

- Ma Z, Jacobs SR, West JA, Stopford C, Zhang Z, Davis Z, Barber GN, Glaunsinger BA, Dittmer DP, Damania B (2015). Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses. *Proc Natl Acad USA*, 112(31):E4306-15.
- Mackenzie KJ, Carroll P, Lettice L, Tarnauskaitė Ž, Reddy K, Dix F, Revuelta A, Abbondati E, Rigby RE, Rabe B, Kilanowski F, Grimes G, Fluteau A, Devenney PS, Hill RE, Reijns MA, Jackson AP (2016). Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response. *EMBO J*, 35(8):831-44.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9):741-52.
- Mankan AK, Schmidt T, Chauhan D, Goldeck M, Höning K, Gaidt M, Kubarenko AV, Andreeva L, Hopfner KP, Hornung V (2014). Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS-STING axis. *EMBO J*, 33(24):2937-46.
- Massey AC, Zhang C, Cuervo AM (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol*, 73:205-235.
- Mauvezin C, Neufeld TP (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11(8):1437-8.
- McElhinny NSA, Watts BE, Kumar D, Watt DL, Lundström EB, Burgers PM, Johansson E, Chabes A, Kunkel TA (2010). Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Natl Acad Sci*, 107: 4949-4954.
- Mertins P, Qiao JW, Patel J, Udeshi ND, Clauser KR, Mani DR, Burgess MW, Gillette MA, Jaffe JD, Carr SA (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nat Methods*, 10(7):634-7.
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiya T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 152(4): 657-68.
- Mizushima N (2007). Autophagy: process and functions. *Genes Dev*, 21:2861-2873.
- Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, Greene WC (2014). IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science*, 343:428–432.
- Morita M, Stamp G, Robins P, Dulic A, Rosewell I, Hrivnak G, Daly G, Lindahl T, Barnes DE (2004). Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *Mol Cell Biol*, 24(15):6719-27.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113:703–16

- Nicholson DW¹, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535):37-43.
- Noda T, Ohsumi Y (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273(7):3963-6.
- Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T (2014). Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet*, 95(1):121-5.
- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Investig*, 51:146–53
- Ohto U, Shibata T, Tanji H, Ishida H, Krayukhina E, Uchiyama S, Miyake K, Shimizu T (2015) Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature*, 520: 702–705.
- Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ (2004). Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*, 100:657-666.
- Paz-Yaacov N, Levanon EY, Nevo E, Kinar Y, Harmelin A, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Eisenberg E, Rechavi G (2010). Adenosine-to-inosine RNA editing shapes transcriptome diversity in primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(27):12174–12179.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G, Reis e Sousa C (2009). Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol*, 83(20):10761–10769.
- Pizzi S, Sertic S, Orcesi S, Cereda C, Bianchi M, Jackson AP, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutières syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Hum Mol Genet*, 24(3):649-58.
- Pokatayev V, Hasin N, Chon H, Cerritelli SM, Sakhuja K, Ward JM, Morris HD, Yan N, Crouch RJ (2016). RNase H2 catalytic core Aicardi-Goutières syndrome-related mutant invokes cGAS-STING innate immune-sensing pathway in mice. *J Exp Med*, 213(3):329-36.
- Powers RW 3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*, 20(2):174-84.
- Prieur A, Peeper DS (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr. Opin. Cell Biol*, 20:150–55
- Pulit-Penalzo 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(2): 82-94.

- Purvis JE, Karhohs KW, Mock C, Batchelor E, Loewer A, Lahav G (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science*, 336(6087):1440-4.
- Qin Y, Zhang W, Yang P (2015). Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord. *J Neurosci Res*, 93(3):391-8.
- Radoshevich L, Dussurget O (2016). Cytosolic Innate Immune Sensing and Signaling upon Infection. *Front Microbiol*, 7: 313.
- Ramantani G, Kohlhase J, Hertzberg C, Innes AM, Engel K, Hunger S, Borozdin W, Mah JK, Ungerath K, Walkenhorst H (2010). Expanding the phenotypic spectrum of lupus erythematosus in Aicardi-Goutières syndrome. *Arthritis Rheum*, 62:1469-1477.
- Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol*, 11:395–402.
- Rehwinkel J, Maelfait J, Bridgeman A, Rigby R, Hayward B, Liberatore RA, Bieniasz PD, Towers GJ, Moita LF, Crow YJ, Bonthron DT, Reis e Sousa C (2013). SAMHD1-dependent retroviral control and escape in mice. *EMBO J*, 32(18):2454-62.
- Reijns MA, Bubeck D, Gibson LCD, Graham SC, Baillie GS, Jones EY, Jackson PA (2011). The Structure of the Human RNase H2 Complex Defines Key Interaction Interfaces Relevant to Enzyme Function and Human Disease. *J Biol Chem*, 286(12):10530-9.
- Reijns MA, Rabe B, Rigby RE, Mill P, Astell KR, Lettice LA, Boyle S, Leitch A, Keighren M, Kilanowski F, Devenney PS, Sexton D, Grimes G, Holt IJ, Hill RE, Taylor MS, Lawson KA, Dorin JR, Jackson AP (2012). Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell*, 149(5):1008-22.
- Reijns MA, Jackson AP (2014). Ribonuclease H2 in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 42(4):717-25.
- Rello-Varona S, Lissa D, Shen S, Niso-Santano M, Senovilla L, Mariño G, Vitale I, Jemaá M, Harper F, Pierron G, Castedo M, Kroemer G (2012). Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle*, 11(1):170-6.
- Rice G, Patrick T, Parmar R, Taylor CF, Aeby A, Aicardi J, Artuch R, Montalto SA, Bacino CA, Barroso B, Baxter P, Benko WS, Bergmann C, Bertini E, Biancheri R, Blair EM, Blau N, Bonthron DT, Briggs T, Brueton LA, Brunner HG, Burke CJ, Carr IM, Carvalho DR, Chandler KE, Christen HJ, Corry PC, Cowan FM, Cox H, D'Arrigo S, Dean J, De Laet C, De Praeter C, Déry C, Ferrie CD, Flintoff K, Frints SGM, Garcia-Cazorla A, Gener B, Goizet C, Goutières F, Green AJ, Guët A, Hamel BCJ, Hayward BE, Heiberg A, Hennekam RC, Husson M, Jackson AP, Jayatunga R, Jiang YH, Kant SG, Kao A, King MD, Kingston HM, Klepper J, van der Knaap MS, Kornberg AJ, Kotzot D, Kratzer W, Lacombe D, Lagae L, Landrieu PG, Lanzi G, Leitch A, Lim MJ, Livingston JH, Lourenco CM, Lyall EGH, Lynch

- SA, Lyons MJ, Marom D, McClure JP, McWilliam R, Melancon SB, Mewasingh LD, Moutard ML, Nischal KK, Østergaard JR, Prendiville J, Rasmussen M, Rogers RC, Roland D, Rosser EM, Rostasy K, Roubertie A, Sanchis A, Schiffmann R, Scholl-Bürgi S, Seal S, Shalev SA, Corcoles CS, Sinha GP, Soler D, Spiegel R, Stephenson JBP, Tacke U, Tan TY, Till M, Tolmie JL, Tomlin P, Vagnarelli F, Valente EM, Van Coster RNA, Van der Aa N, Vanderver A, Vles JSH, Voit T, Wassmer E, Weschke B, Whiteford ML, Willemsen MAA, Zankl A, Zuberi SM, Orcesi S, Fazzi E, Lebon P, Crow YL (2007a). Clinical and Molecular Phenotype of Aicardi-Goutieres-Syndrome. *Am J Hum Genet*, 81(4): 713–725.
- Rice G, Newman WG, Dean J, Dean J, Patrick T, Parmar R, Flintoff K, Robins P, Harvey S, Hollis T, O'Hara A, Herrick AL, Bowden AP, Perrino FW, Lindahl T, Barnes DE, Crow YJ (2007b). Heterozygous mutations in TREX1 cause familial chilblain lupus and dominant Aicardi-Goutieres syndrome. *Am J Hum Genet*, 80:811–815.
 - Rice GI, Forte GM, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, Ackroyd S, Allcock R, Bailey KM, Balottin U, Barnerias C, Bernard G, Bodemer C, Botella MP, Cereda C, Chandler KE, Dabydeen L, Dale RC, De Laet C, De Goede CG, Del Toro M, Effat L, Enamorado NN, Fazzi E, Gener B, Haldre M, Lin JP, Livingston JH, Lourenco CM, Marques W Jr, Oades P, Peterson P, Rasmussen M, Roubertie A, Schmidt JL, Shalev SA, Simon R, Spiegel R, Swoboda KJ, Temtamy SA, Vassallo G, Vilain CN, Vogt J, Wermenbol V, Whitehouse WP, Soler D, Olivieri I, Orcesi S, Aglan MS, Zaki MS, Abdel-Salam GM, Vanderver A, Kisand K, Rozenberg F, Lebon P, Crow YJ (2013). Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol*, 12:1159–69.
 - Rice GI, del Toro Duany Y, Jenkinson EM, Forte GM, Anderson BH, Ariaudo G, Bader-Meunier B, Baidam EM, Battini R, Beresford MW, Casarano M, Chouchane M, Cimaz R, Collins AE, Cordeiro NJ, Dale RC, Davidson JE, De Waele L, Desguerre I, Faivre L, Fazzi E, Isidor B, Lagae L, Latchman AR, Lebon P, Li C, Livingston JH, Lourenço CM, Mancardi MM, Masurel-Paulet A, McInnes IB, Menezes MP, Mignot C, O'Sullivan J, Orcesi S, Picco PP, Riva E, Robinson RA, Rodriguez D, Salvatici E, Scott C, Szybowska M, Tolmie JL, Vanderver A, Vanhulle C, Vieira JP, Webb K, Whitney RN, Williams SG, Wolfe LA, Zuberi SM, Hur S, Crow YJ (2014). Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet*, 46(5):503-9.
 - Rigby RE, Leitch A, Jackson AP (2008). Nucleic acid-mediated inflammatory diseases. *Bioessays*, 30(9):833-42.

- Rigby RE, Webb LM, Mackenzie KJ, Li Y, Leitch A, Reijns MA, Lundie RJ, Revuelta A, Davidson DJ, Diebold S, Modis Y, MacDonald AS, Jackson AP (2014). RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. *EMBO J*, 33(6):542-58.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000). High-efficiency delete mice show that FLPe is an alternative to Cre-LoxP. *Nat. Genet*, 25:139-140.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273:5858-68.
- Rönnblom LE, Alm GV, Öberg KE (1990). Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon- α treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour. *J Intern Med*, 227:207–10.
- Rönnblom LE, Alm GV, Öberg KE (1991). Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Ann Intern Med*, 115(3):178-83.
- Rupnik A, Lowndes NF, Grenon M (2010). Mrn and the race to the break. *Chromosoma*, 119:115-135.
- Rychlik MP, Chon H, Cerritelli SM, Klimek P, Crouch RJ, Nowotny M (2010). Crystal structures of RNase H2 in complex with nucleic acid reveal the mechanism of RNA-DNA junction recognition and cleavage. *Mol Cell*, 40(4):658-70.
- Rydberg B, Game J (2002). Excision of misincorporated ribonucleotides in DNA by RNase H (type 2) and FEN-1 in cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:16654-59.
- Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim SY, Seo D, Kim J, White TE, Brandariz-Nuñez A, Diaz-Griffero F, Yun CH, Hollenbaugh JA, Kim B, Baek D, Ahn K (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med*, 20(8):936-41.
- Sabharwal R, Verma P, Syed MA, Sharma T, Subudhi SK, Mohanty S, Gupta S (2015). Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 36(4):212-8.
- Sadler AJ, Williams BR (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*, 8(7):559-68.
- Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(49):20842-6.
- Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML (2001). Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int*, 59:3-16.
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*, 32:513-45.
- Schubert-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, Herzner AM, Zillinger T, Goldeck M, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Kerber R, Wolter S, Stümpel JP, Roth A, Bartok E, Drosten C, Coch C,

- Hornung V, Barchet W, Kümmerer BM, Hartmann G, Schlee M (2015). A conserved histidine in the RNA sensor RIG-I controls immune tolerance to N1-2'O-methylated self RNA. *Immunity*, 43(1): 41–51.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88:593–602.
 - Shaban NM, Harvey S, Perrino FW, Hollis T (2010). The structure of the mammalian RNase H2 complex provides insight into RNA:NA hybrid processing to prevent immune dysfunction. *J Biol Chem*, 285(6):3617-24.
 - Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by mdm2. *Cell*, 91: 325-334.
 - Singh K, Matsuyama S, Drazba JA, Almasan A (2012). Autophagy-dependent senescence in response to DNA damage and chronic apoptotic stress. *Autophagy*, 8(2):236-51.
 - Sofroniew MV, Vinters HV (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1):7-35.
 - Sparks JL, Burgers PM (2015). Error-free and mutagenic processing of topoisomerase 1-provoked damage at genomic ribonucleotides. *EMBO J*, 34(9):1259-69.
 - Stein H, Hausen P (1969). Enzymes from calf thymus degrading the RNA moiety of DNA-RNA Hybrids. *Science*, 166:393-395
 - Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, Medzhitov R (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*, 134(4):587–598.
 - Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977):848-53.
 - Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ (2012). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 339(6121): 786–91.
 - Takanohashi A, Prust M, Wang J, Gordish-Dressman H, Bloom M, Rice GI, Schmidt JL, Crow YJ, Lebon P, Kuijpers TW, Nagaraju K, Vanderver A (2013). Elevation of proinflammatory cytokines in patients with Aicardi-Goutieres syndrome. *Neurology*, 80(11): 997-1002.
 - Takeuchi O, Akira S (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6):805-20.
 - Tanaka Y, Chen ZJ (2012). STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal*, 5(214):ra20.
 - Tanida I (2011). Autophagy basics. *Microbiol Immunol*, 55(1):1-11.

- Tolmie JL, Shillito P, Hughes-Benzie R, Stephenson JB (1995). The Aicardi-Goutieres syndrome (familial, early onset encephalopathy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis) *J Med Genet*, 32:881–884.
- Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones AE, Fitzgerald KA (2011). Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses*, 3(6): 920–940.
- Tungler V, Silver RM, Walkenhorst H, Günther C, Lee-Kirsch MA (2012). Inherited or de novo mutation affecting aspartate 18 of TREX1 results in either familial chilblain lupus or Aicardi–Goutières syndrome. *Br J Dermatol*, 167:212–214.
- Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, Choudhary C (2011). A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics*, 10(10):M111.013284.
- Wahba L, Amon J, Koshland D, Vuica-Ross M (2011). Rnase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability. *Mol Cell*, 44: 987-988
- Wang S, Wu X, Pan T, Song W, Wang Y, Zhang F, Yuan Z (2012). Viperin inhibits hepatitis C virus replication by interfering with binding of NS5A to host protein hVAP-33. *J Gen Virol*, 93(Pt 1):83-92.
- Watson RO, Bell SL, MacDuff DA, Kimmey JM, Diner EJ, Olivas J, Vance RE, Stallings CL, Virgin HW, Cox JS (2015). The Cytosolic Sensor cGAS Detects *Mycobacterium tuberculosis* DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe*, 17(6):811-9.
- Weiden MD, Hoshino S, Levy DN, Li Y, Kumar R, Burke SA, Dawson R, Hioe CE, Borkowsky W, Rom WN, Hoshino Y (2014). Adenosine deaminase acting on RNA-1 (ADAR1) inhibits HIV-1 replication in human alveolar macrophages. *PLoS One*, 9(10):e108476.
- Williams JS, Smith DJ, Marjavaara L, Lujan SA, Chabes A, Kunkel TA (2013). Topoisomerase 1-mediated removal of ribonucleotides from nascent leading-strand DNA. *Mol Cell*, 49(5):1010-5.
- Wolf C, Rapp A, Berndt N, Staroske W, Schuster M, Dobrick-Mattheuer M, Kretschmer S, König N, Kurth T, Wieczorek D, Kast K, Cardoso MC, Günther C, Lee-Kirsch MA (2016). RPA and Rad51 constitute a cell intrinsic mechanism to protect the cytosol from self DNA. *Nat Commun*, 7:11752.
- Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ (2012). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*, 339(6121): 826-30.
- Wu JJ, Li W, Shao Y, Ajev D, Fu B, Gillen J, Hand T, Ma S, Liu X, Miley W, Konrad A, Meipel F, Stürzl M, Whitby D, Li H, Zhu F (2015). Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. *Cell Host Microbe*, 18(3):333-44.

- Xu B, Sun Z, Liu Z, Guo H, Liu Q, Jiang H, Zou Y, Gong Y, Tischfield JA, Shao C (2011). Replication stress induces micronuclei comprising of aggregated DNA double-strand breaks. *PLoS One*, 6(4):e18618.
- Yan N, Regalado-Magdos AD, Stiggelbout B, Lee-Kirsch MA, Lieberman J (2010). The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol*, 11(11):1005–1013.
- Yang YG, Lindahl T, Barnes DE (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell*, 131(5):873-86.
- Yang Z, Klionsky DJ (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12(9):814-22.
- Yasui M, Koyama N, Koizumi T, Senda-Murata K, Takashima Y, Hayashi M, Sugimoto K, Honma M (2010). Live cell imaging of micronucleus formation and development. *Mutat Res*, 692(1-2):12-8.
- Yoshiyama KO, Sakaguchi K, Kimura S (2013). DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals. *Biology*, 2:1338-56.
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*, 23(7):798-803.
- Yuan F, Dutta T, Wang L, Song L, Gu L, Qian L, Benitez A, Ning S, Malhotra A, Deutscher MP, Zhang Y (2015). Human DNA Exonuclease TREX1 Is Also an Exoribonuclease That Acts on Single-stranded RNA. *J Biol Chem*, 290(21):13344-53.
- Zhang X, Shi H, Wu J, Zhang X, Sun L, Chen C, Chen ZJ (2013). Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING. *Molecular Cell*, 51(2): 226–235.
- Zhuo L, Theis M, Alvarez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing A (2001). hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis*, 31(2):85-94.
- Zou L, Elledge SJ (2003). Sensing DNA damage through atrip recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300:1542-48.

VI. ANHANG

V.I. Verifizierung der Antikörperspezifität

Zur Verifizierung der Spezifität der detektierten Fluoreszenzsignale in immunzytochemischen Färbungen wurden Negativkontrollen durchgeführt, bei denen einzig eine Inkubation mit dem sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörper vorgenommen wurde. Diese zeigten in allen durchgeführten Analysen keine spezifische, über der Hintergrundfluoreszenz liegende Signalgebung (Abb. A1).

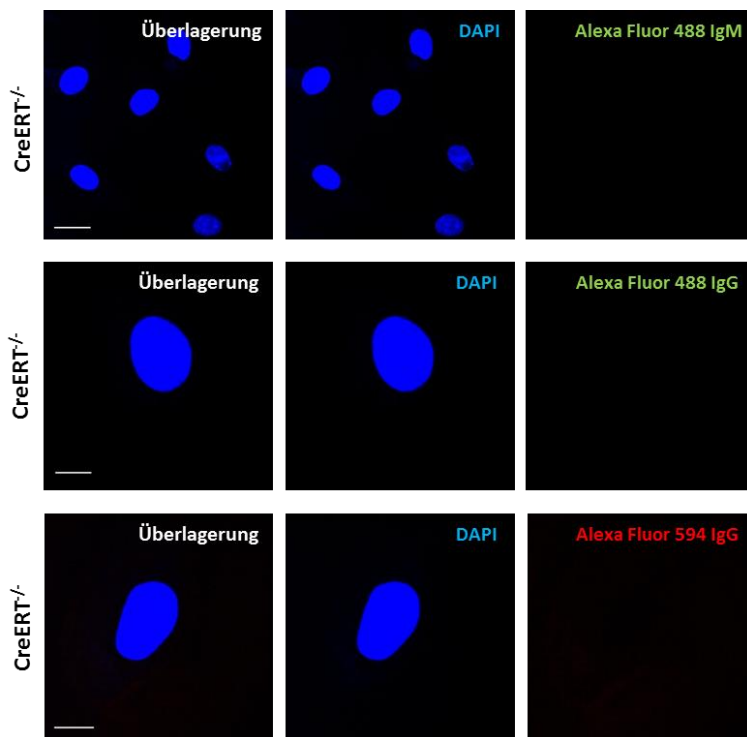


Abb. A1 Negativkontrollen der immunzytochemischen Färbungen.

Repräsentative, immunzytochemische Färbungen von CreERT^{-/-}-MEFs 3 d post 4-OHT als Negativkontrollen unter alleiniger Verwendung des sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörpers (Alexa Fluor 488 IgG und IgM, grün; Alexa Fluor 594 IgG, rot); Maßstäbe oben 20 μ m, weitere 10 μ m.

V.II. Charakterisierung perinukleärer Körperchen

Zur Verifizierung der Spezifität der Fluoreszenzfärbung gegen dsDNA in MEFs wurde die Kolokalisation der Signale mit dem DNA interkalierenden Farbstoff DAPI begutachtet. Es zeigte sich eine nahezu vollständige Überlagerung der Signale (Abb. A2 A), sodass die Visualisierung dieser Nukleinsäurespezies anhand beider Färbungen möglich war. Ferner wurden die primären Kulturen auf

eine Kolokalisation der perinukleären Körperchen mit dem DNA-Schadenmarker pH2A.X untersucht (Abschnitt 3.1.9). Diese bestand jedoch nicht in allen Fällen (Abb. A2 B).

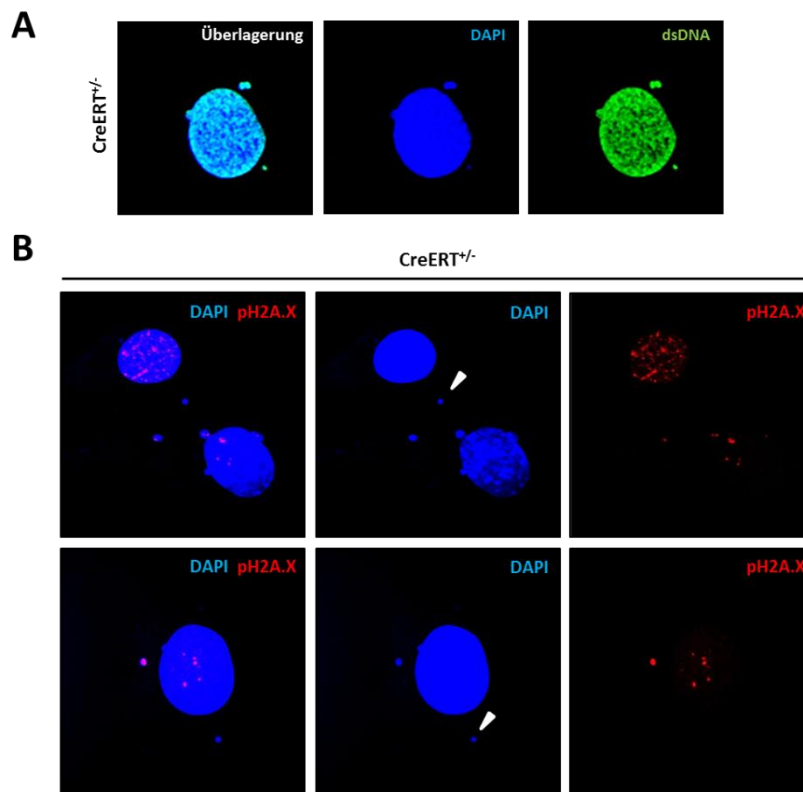
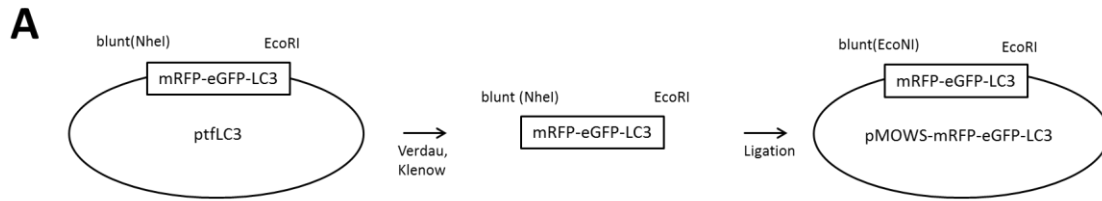


Abb. A2 Charakterisierung perinukleärer Körperchen.

(A) Repräsentative, immunzytochemische Färbungen von CreERT^{+/-}-MEFs 3 d post 4-OHT gegen dsDNA (Alexa Fluor 488 IgG, grün) mit Gegenfärbung der nukleären dsDNA (DAPI, blau), die auch im Zytoplasma als perinukleäre Körperchen nachweisbar war; nahezu vollständige Signalüberlagerung. (B) Repräsentative, immunzytochemische Färbung von CreERT^{+/-}-MEFs 3 d nach 4-OHT-Induktion gegen den DSB-Marker pH2A.X (Cy3, rot) mit Gegenfärbung von dsDNA (DAPI, blau); Auftreten des Markers in perinukleären Körperchen und dessen Abwesenheit (mit Pfeilen gekennzeichnet).

V.III. Klonierung des Vektors pMOWS-mRFP-eGFP-LC3

Um eine alternative Einbringung des LC3-Tandemfluoreszenzkonstruktes neben der Transfektion zu ermöglichen wurde der ORF (*open reading frame*) des Autophagiemarkers aus dem Vektor ptfLC3 in den Vektor pMOWS-eGFP kloniert, der ebenso die retrovirale Transduktion von Primärzellen erlaubt. Dazu wurde der Ausgangsvektor mit NheI verdaut und aufgereinigt. Der entstandene Überhang wurde anschließend mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und ein weiterer Restriktionsschritt mit EcoRI angeschlossen. Der Zielvektor wurde äquivalent vorbereitet, wobei anstatt NheI EcoNI verwendet wurde, sodass dieser linearisiert und ohne eGFP vorlag. Letztlich wurde der ORF des Autophagiemarkers (*Insert*) in den geöffneten Vektor pMOWS ligiert und das Ligationsprodukt in *E. coli* XL-1 Blue transformiert (Abb. A3).



B pMOWS-mRFP-eGFP-LC3

```

GACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCG
AGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCA
AGGGCGCCCCCTGCCCTTCGCTTGGGACATCCTGTCCCCCTCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGCCTAC
GTGAAGCACCCCGCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCG
CGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAG
TTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGA
CCATGGGCTGGGAGGCCCTCCACCGAGCGGATTACCCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAG
ATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAG
AAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGG
ACTACACCATCGTGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCGCCACTCCACCGGCGCCGGTGGACCGGT
CGCCACCATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGAC
GGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG
CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCT
GACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG
CCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCG
TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAA
CCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG
CTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGAT
CTAGACCGTCCGAGAAGACCTTCAAACAGCGCCGAGCTTTCGAACAAAGAGTGGAAGATGTCCGGCT
CATCCGGGAGCAGCACCCACCAAGATCCCAGTGATTATAGAGCGATAACAAGGGTGAGAAGCAGCTG
CCCGTCCCTGGACAAGACCAAGTTCCTTGTACCTGATCACGTGAATATGAGCGAACTCATCAAGATAAT
TAGAAGGCGCCTGCAGCTCAATGCTAACCAAGCCTTCTTCTCCTGGTGAATGGGCACAGCATGGTGA
GTGTGTCCACACCCATCTCTGAAGTGTACGAGAGCGAGAGAGATGAAGACGGCTTCTGTACATGGT
CTATGCCTCCCAGGAGACGTTTCGGGACAGCACTGGCTGTTACATACATGTCAGCTCTGAAGGCAACA
GCAACAGGAAGAGAGCCATGCTTGTGA

```

Abb. A3 Grunddaten zum Vektor pMOWS-mRFP-eGFP-LC3.

(A) Klonierungsschemata des Vektors pMOWS-mRFP-eGFP-LC3: Durchführung gemäß Abschnitt VIII (B) Nukleotidsequenz des ORF, der sich aus mRFP, eGFP und LC3 zusammensetzt.

V.IV. Initiale Charakterisierung des EMX1_Cre_H2B Mausstammes

Neurone sind post-mitotische, auf Erregungsleitung und Erregungsübertragung spezialisierte Zellen des Gehirnes, die eine hohe RNase H2 Expression aufweisen (Abb. 31 und Abb. 32). Um daher die Funktion des Enzymes in diesem Zelltyp zu untersuchen wurde der konditionale *Knock-out* Stamm EMX1_Cre_H2B durch Verpaarung der Linien EMX1_Cre (B6.129S2-Emx1^{tm1(cre)Krij}/J) und

RNaseH2B_{flox} (*Rnaseh2b*^{tm1a(EUCOMM)Wtsi/J}) gezüchtet (Abb. A4). Die Nachkommen der F2-Generation der gezüchteten EMX1_Cre_H2B-Linie waren lebensfähig, fertil und phänotypisch unauffällig. Die eindeutige Zuordnung der Genotypen erfolgte anhand von Genotypisierungs-PCRs auf den Lysaten der Schwanzbiopsate, die zwischen der 3. und 6. Woche nach der Geburt der Jungtiere genommen wurden. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einer Agarosematrix erlaubte die Unterscheidung von gefloxtem Allel mit einer Bande in Höhe von 390 bp gegenüber einem Wildtyp-Allel von 420 bp. Das EMX1_Cre-Transgen war als Amplifikat von 100 bp eindeutig identifizierbar (Abb. A4B). In allen weiteren Versuchen wurden Versuchstiere des Genotyps RNaseH2B^{lox/lox} als Kontrollgruppe (abgekürzt als EMX1_Cre^{-/-}) und des Genotyps RNaseH2B^{lox/lox} EMX1_Cre^{+/-} (abgekürzt als EMX1_Cre^{+/-}) als Vergleichs- bzw. Defizienzgruppe verwendet. Um ferner eine maximale Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde mit Geschwisterpaaren (*litter mates*) gearbeitet.

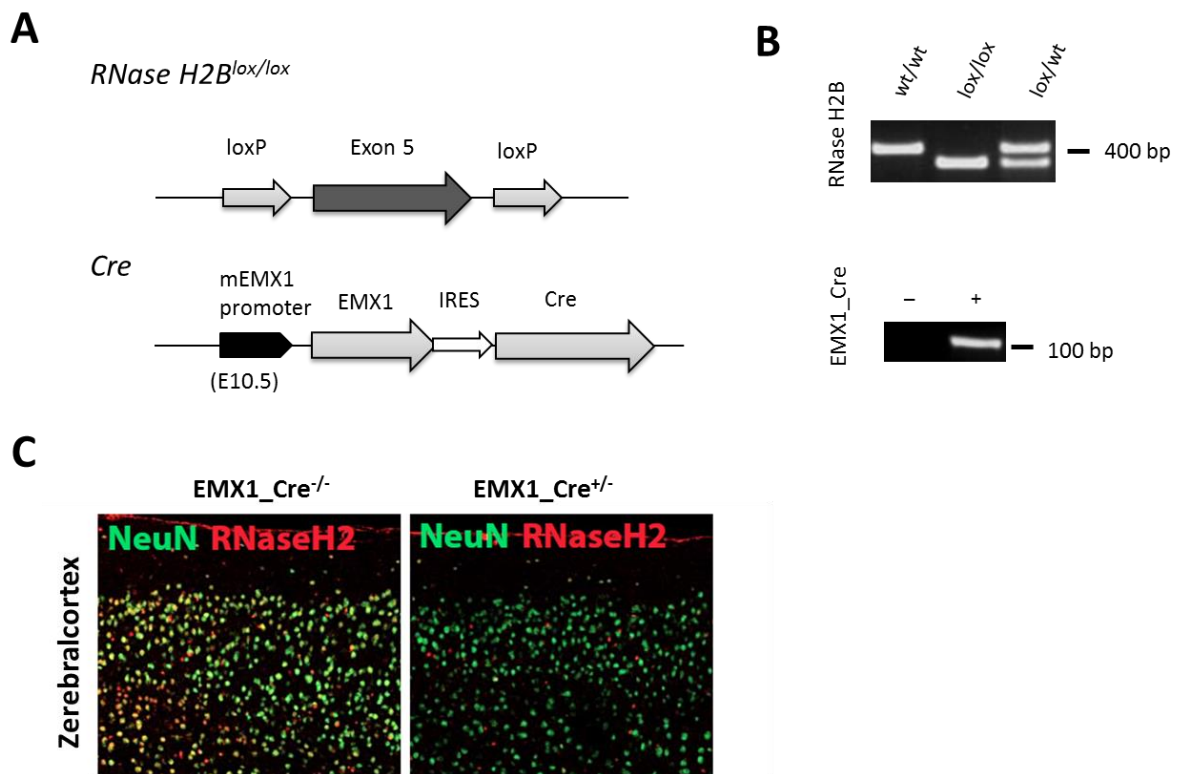


Abb. A4 Zucht und *Knock-out*-Verifizierung des Stammes EMX1_Cre_H2B.

(A) Aufbau der transgenen Genbereiche des RNaseH2B_{flox}- sowie EMX1_Cre-Stammes wie unter Abschnitt 2.1.16 beschrieben. (B) Fotografische Dokumentation der Fragmente der Genotypisierungs-PCRs, die mittels Agarosegelelektrophorese (2 % Matrix) aufgetrennt, mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert und bezüglich ihrer Länge (Basenpaar, bp) qualitativ untersucht wurden; RNaseH2B_{flox}-Fragment wt: 420 bp tg: 390 bp; EMX1_Cre-Fragment: 100 bp. (C) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Gehirnschnitten des EMX1_Cre_H2B-Stammes (6 Wochen alt) im Bereich des Zerebralcortex gegen die RNase H2 (Cy3, rot) sowie den neuronalen Marker NeuN (Alexa 488, grün) mit Gegenfärbung der Zellkerne (DAPI, blau); Durchführung durch Dr. Markus Damme (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

Zur Verifizierung des *Knock-outs* wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, bei denen sowohl die RNase H2 als auch der neuronale Marker NeuN visualisiert wurden. Die mikroskopische Begutachtung bestätigte die Ausschaltung des Enzymes in Neuronen. So wiesen die Kontrolltiere eine Kolokalisation beider Proteine auf, die in der Vergleichsgruppe im Bereich des Zerebralcortex und Hippocampus nicht mehr zu erkennen war. Außerdem waren in den EMX1_Cre^{+/-}-Gehirnen kaum Signale der Ribonuklease detektierbar (Abb. A4C).

V.V. Zusammenfassung der molekularen Mechanismen bei Ribonuklease H2-Defizienz auf Zellebene

Die Defizienz der RNase H2 führt zur Aktivierung einer Reihe molekularer Prozesse, die sich auf der fehlenden enzymalen Aktivität zur Beseitigung von inkorporierten rNMPs aus dem zellulären Genom mittels RER gründen. Daraus folgend greift ein Netzwerk an regulatorischen Mechanismen: DNA-Schadensantwort, Seneszenzprogramm, nukleärer Export von ss und dsDNA ins Zytoplasma, cGAS-STING-Signaltransduktion und Autophagie (Abb. A5).

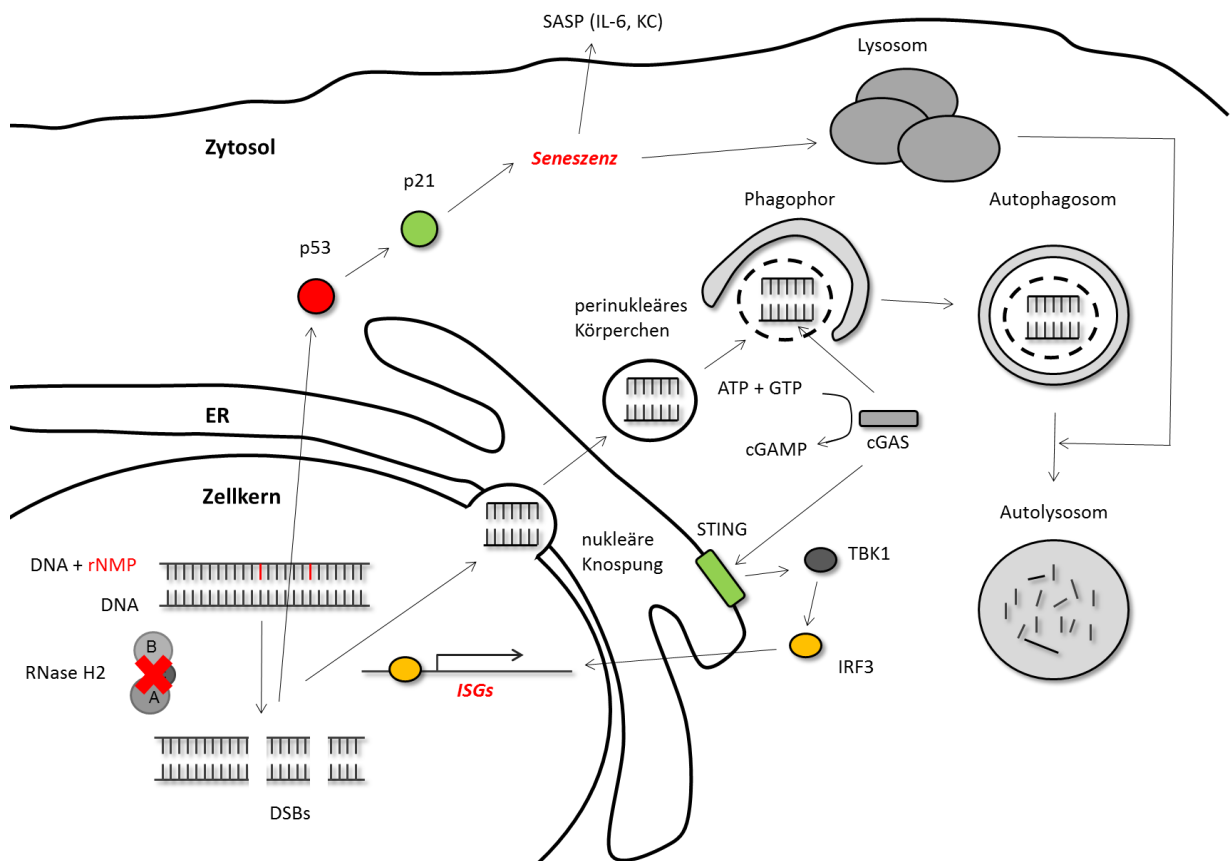


Abb. A5 Graphische Übersicht der Mechanismen in RNase H2-defizienten MEFs.

Graphische Zusammenfassung der in RNase H2-defizienten MEFs postulierten Prozesse. Detaillierte Beschreibungen aller Teilprozesse unter den Abbildungen 41-45 entnehmbar.

V.VI. Aufführung der Kooperationen und deren Arbeitsanteil

Nachfolgend sind alle Kooperationspartner sowie deren Arbeitsanteil unter weiterer Aufführung der selbst durchgeführten Arbeitsschritte aufgeführt.

(1) M. Sc. Sönke Rudnik (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland)

Abb.	Eigenanteil	Fremdanteil
Abb. 23 A/B	Zellkultivierung und –stimulation Zellernte	Westernblot Densitometrie
Abb. 24 A/B	Zellkultivierung und –stimulation Zellernte	Westernblot beta-Hexosaminidase Aktivitätsassay

(2) Dr. Markus Damme (AG Paul Saftig, Biochemisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland)

Abb.	Eigenanteil	Fremdanteil
Abb. 31 A	Mauszucht	Perfusion Immunhistochemie
Abb. 32 A/B	Mauszucht	Perfusion Immunhistochemie
Abb. 33 B/C	Mauszucht	Perfusion Immunhistochemie
Abb. A4 C	Mauszucht	Perfusion Immunhistochemie

(3) Prof. Dr. Markus Glatzel (Institut für Neuropathologie, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland)

Abb.	Eigenanteil	Fremdanteil
Abb. 33 A/B/C	Mauszucht Perfusion Mikroskopie	Immunhistochemie

VII. LEBENS LAUF

Name: Bartsch
Vorname: Kareen
Geburtsdatum: 03.12.1987
Geburtsort: Gardelegen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Bildungsweg: 08/2000 – 07/2007 Geschwister Scholl Gymnasium, Gardelegen
Allgemeine Hochschulreife
09/2007 – 08/2010 Christian-Albrechts Universität, Kiel
Bachelor of Science: Biochemie
09/2010 – 09/2012 Christian-Albrechts Universität, Kiel
Master of Science: Biochemie & Molekularbiologie
01/2013 – 09/2016 Christian-Albrechts Universität, Kiel
PhD: Institut für Biochemie, AG Rabe

Publikationen:

- (1) **Bartsch K**, Rudnik S, Knittler K, Damme M, Aden K, Spehlmann M, Chalaris A, Rabe B (2016). RNaseH2 deficiency leads to cytosolic accumulation of immunostimulatory DNA that is removed by autophagy, *in Arbeit*
- (2) Hattermann K¹, **Bartsch K**¹, Gebhardt H, Mehdorn HM, Synowitz M, Schmitt AD, Mentlein R, Held-Feindt J (2016). „Inverse signaling“ of the transmembrane chemokine CXCL16 contributes to proliferative and anti-apoptotic effects in human meningiomas, *Cell Communication and Signaling, eingereicht*
¹ geteilte Erstautorenschaft
- (3) Effenberger T, von der Heyde J, **Bartsch K**, Garbers C, Schulze-Osthoff K, Chalaris A, Murphy G, Rose-John S, Rabe B (2014). Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding, *FASEB J.*, 28(11): 4847-56.

Tagungsbeiträge:

- (1) Aden K, Tran F, Tschurtschenthaler M, **Bartsch K**, Terzerji RS, Luzius A, Paulsen M, Kuiper J, Rabe B, Blumberg RS, Schreiber S, Kaser A, Rosenstiel P (2016). ATG16L1 and XBP1 Coordinate Interleukin 22 Dependent Signals in Intestinal Epithelium. AGA Congress, Basel, Schweiz, Sep 15- Sep 17 2016. *Gastroenterology*, 150(4):S90.

(Poster)

- (2) Aden K, **Bartsch K**, Tran F, Rose-John S, Rosenstiel P, Rabe B (2016). The Ribonuclease RNaseH2B Controls Intestinal Stem Cell Integrity. Digestive Disease Week® (DDW), San Diego, USA, May 21-24 2016. *Gastroenterology*, 150(4):S1015.

(Poster)

- (3) Aden K, Tran F, Sheibani-Tezerji R, Tschurtschenthaler M, **Bartsch K**, Luzius A, Jentsch M, Kuiper J, Blumberg R, Hartmann G, Barchet W, Rabe B, Schreiber S, Kaser A, Rosenstiel P (2016). The IBD Risk gene ATG16L1 regulates an IL-22 induced STING dependent immune response. Keystone Symposium, Dresden, Deutschland, May 08-May 12 2016.

(Poster)

- (4) **Bartsch K**, Rudnik S, Knittler K, Markus D, Aden K, Rabe B (2016). RNaseH2 Deficiency leads to immunostimulatory DNA in the cytoplasm that is removed by autophagy. Keystone Symposium, Dresden, Deutschland, May 08-May 12 2016.

(Scholarship & Poster & Short talk)

- (5) Hattermann K, **Bartsch K**, Gebhardt H, Schmitt AD, Mehdorn HM, Held-Feindt J (2015). The transmembrane chemokines CXCL16 and CX3CL1 transduce proliferative and anti-apoptotic effects in human meningiomas by “inverse signaling”. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie: Abstracts, Porstmann Kongresse GmbH, Berlin, p. 193.

(Poster)

- (6) Effenberger T, von der Heyde J, **Bartsch K**, Chalaris A, Rose-John S, Rabe B (2013). ADAM17 is activated upon cellular senescence and contributes to the secretory profile of senescent cells by ectodomain shedding. Conference: Annual Joint Conference of the International-Cytokine-Society and the International-Society-for-Interferon-and-Cytokine-Research, San Francisco, USA, Sep 29-Oct 03 2013, *Cytokine* (63).

(Poster)

- (7) **Bartsch K**, Hattermann K, Gebhardt H, Mehdorn HM, Mentlein R, Held-Feindt J (2013). Inverse signaling of the transmembrane chemokines CXCL16 and CX3CL1 in human meningiomas. Anatomische Gesellschaft 30. Arbeitstagung, Würzburg, 25. – 27. September 2013. Abstract-Band p.112, Abstract P53.

(Poster)

VIII. DANKSAGUNG

Zunächst gilt mein Dank Prof. Dr. Stefan Rose-John für die Möglichkeit am Biochemischen Institut meine Promotion durchführen zu dürfen.

Außerdem danke ich Jun.-Prof. Dr. Björn Rabe für die Bereitstellung des Themas, die Anregungen sowie die Diskussion der Experimente und Ergebnisse.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Markus Damme, Dr. Konrad Aden und den fleißigen Helfern des IKMB beim Präpen, Dr. Athena Chalaris-Rissman, Dr. Dirk Schmidt-Arras, Sönke Rudnik, Dr. Sandra Kissing, Dr. Judith Peters, Katharina Knittler und Dr. Johannes Prox für die hilfreichen Ideen, Bereitstellung von Materialien, Zusammenarbeit bei Versuchen und stetigen Hinterfragung der Ergebnisse.

Doch nicht nur sie sondern auch Tina Bachmann und Melanie Bloss möchte ich für ihre Hilfe bei der Tierhaltung und dem Hefescreen hervorheben.

Zum Schluss danke ich besonders herzlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich moralisch über diese lange Zeit getragen, aufgemuntert und abgelenkt haben. Ohne euch wäre dieser Abschnitt in meinem Leben nicht möglich gewesen. Ihr wart das Fundament, auf dem diese Arbeit errichtet wurde.

IX. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Kareen Bartsch, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Anleitung meiner akademischen Lehrer angefertigt habe.

Die Arbeit erfolgte unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt oder veröffentlicht. Ich erkläre ferner, kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben.

..... Kareen Bartsch.....

(Unterschrift)