

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Schwerpunktleiter Endokrinologie: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

Der Einfluss von CLEC16A auf Autophagie
- ein neuer Mechanismus in der Pathogenese von Typ-1-Diabetes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kilian Schober

aus Münster (Westfalen)

Würzburg, September 2016



Referent: Prof. Dr. med. Martin Fassnacht

Koreferent: Prof. Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 2016

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund	2
1.1.1 Typ-1-Diabetes.....	2
1.1.1.1 Allgemeine Informationen.....	2
1.1.1.2 Ätiologie.....	3
1.1.1.3 Pathogenese.....	4
1.1.2 Zentrale Toleranz.....	6
1.1.2.1 Positive und negative Selektion	6
1.1.2.2 Zentrale Expression von Autoantigenen und Autoimmunität.....	7
1.1.3 Autophagie.....	7
1.1.3.1 Der Proteindegradationsprozess Autophagie.....	8
1.1.3.2 Der Einfluss von Autophagie auf Autoimmunität.....	8
1.1.4 CLEC16A	10
1.1.4.1 <i>CLEC16A</i> und das Immunsystem	11
1.1.4.2 CLEC16A in TECs	12
1.1.4.3 CLEC16A und Autophagie in <i>Drosophila</i>	12
1.2 Fragestellung, Modelle und Autophagie-Marker.....	13
1.2.1 Fragestellung	13
1.2.2 Gen-KD-Modelle.....	13
1.2.2.1 In vitro-Modell: CLEC16A-KD-HEK-Zellen	15
1.2.2.2 In vivo-Modell: Die NOD-Clec16a-KD-Maus	16
1.2.3 Autophagie-Marker	18
1.2.3.1 MDC	18
1.2.3.2 LC3	19
1.2.3.3 p62	21
2. Material und Methoden.....	23
2.1 CLEC16A-KD-HEK-Zellen	23
2.1.1 Zellkultur	23
2.1.2 Transfer einer Zellzahl.....	23
2.1.3 Klonierung und Transfektion von HEK-Zellen.....	24
2.1.3.1 PCR.....	25

2.1.3.2	PCR-Purifizierung.....	26
2.1.3.3	Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen.....	26
2.1.3.4	Verdau der Vektoren mit Restriktionsenzymen	26
2.1.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.1.3.6	Extraktion und Konzentrationsmessung der DNA und des Vektors.....	27
2.1.3.7	Ligation der DNA	27
2.1.3.8	Transformation der Bakterien und Amplifizierung	28
2.1.3.9	Minipräparation und Sequenzierung.....	28
2.1.3.10	Transformation von Bakterien mit <i>CLEC16A</i> -DNA	29
2.1.3.11	Maxipräparation.....	29
2.1.3.12	Transfektion.....	29
2.1.3.13	Überprüfung der Transfektion	30
2.1.4	Initiierung und Inhibierung von Autophagie.....	31
2.2	Die NOD-Clec16a-KD-Maus	32
2.2.1	Entnahme der Thymi.....	32
2.2.2	Isolierung von „TECs“- und „Thymozyten“-Zellgruppen	33
2.2.3	Charakterisierung der isolierten Zellgruppen mit Durchflusszytometrie	35
2.2.3.1	Vorbereitung der Zellen	35
2.2.3.2	Durchführung der Durchflusszytometrie und Auswertung.....	36
2.3	Nachweis von Autophagie	36
2.3.1	Durchflusszytometrie.....	36
2.3.1.1	Vorbereitung der Zellen	36
2.3.1.2	Durchführung der Durchflusszytometrie und Auswertung.....	36
2.3.2	Immunhistochemie	37
2.3.2.1	Kryokonservierung.....	37
2.3.2.2	Gewebsschnitte.....	37
2.3.2.3	Fixierung und Antikörperfärbung.....	38
2.3.2.4	Fluoreszenz-Mikroskopie und Auswertung.....	39
2.3.3	Immunzytochemie.....	40
2.3.3.1	Zellwachstum auf Deckgläsern	40
2.3.3.2	Fixierung und Antikörperfärbung.....	41
2.3.3.3	Fluoreszenz-Mikroskopie und Auswertung.....	41
2.3.4	Immunoblot.....	42
2.3.4.1	Vorbereitung der Zellysate	42

2.3.4.2	SDS-PAGE	43
2.3.4.3	Western Blot.....	44
2.3.4.4	Immundetektion	44
2.3.4.5	Quantifizierung.....	45
2.4	Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	46
3.	Ergebnisse.....	49
3.1	HEK-Zelllinie	49
3.1.1	Autophagie in HEK-Zellen	49
3.1.2	Autophagie in CLEC16A-KD-HEK-Zellen	52
3.2	Clec16a-KD-Maus	56
3.2.1	Morphologische Untersuchung von Autophagie in TECs	56
3.2.2	Funktionelle Untersuchung von Autophagie in TECs	59
4.	Diskussion.....	63
4.1	Die Darstellung von Autophagie	64
4.2	CLEC16A und Autophagie in humanen und murinen Zellen	65
4.3	Der Einfluss von Clec16a auf Autophagie in TECs	68
4.4	CLEC16A als Bindeglied zwischen Autophagie und Autoimmunität	72
4.5	Ausblick	76
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Material für HEK-Zellkultur.....	24
Tabelle 2	Material für Klonierung und Transfektion von HEK-Zellen.....	30
Tabelle 3	Material für Initiierung von Autophagie in HEK-Zellen.....	32
Tabelle 4	Material für Entnahme der Thymi.....	33
Tabelle 5	Material für Isolierung der Thymusepithelzellen.....	34
Tabelle 6	Material für Durchflusszytometrie.....	36
Tabelle 7	Material für Durchflusszytometrie.....	37
Tabelle 8	Material für Immunhistochemie.....	39
Tabelle 9	Material für Immunzytochemie.....	42
Tabelle 10	Material für Immunoblot.....	45
Tabelle 11	Material für statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pathogenese des Typ-1-Diabetes	5
Abbildung 2	Der Proteindegradationsprozess Autophagie	10
Abbildung 3	Die Autophagie-Marker LC3 und p62.....	20
Abbildung 4	Gelelektrophorese der per PCR vermehrten DNA.....	27
Abbildung 5	Thymektomie und Isolation von TECs mit einem Percoll-Gradienten	34
Abbildung 6	Darstellung und Manipulation von Autophagie in HEK-Zellen.....	51
Abbildung 7	Transfektion von HEK-Zellen.....	52
Abbildung 8	Immunoblot von LC3 in CLEC16A- und ATG5-KD-HEK-Zellen.....	53
Abbildung 9	Immunoblot von p62 in CLEC16A- und ATG5-KD-HEK-Zellen.....	55
Abbildung 10	Immunhistochemie von LC3 in mTECs und cTECs aus Clec16a-KD- und WT-Mäusen	57
Abbildung 11	Immunhistochemie von LC3 in mTECs und cTECs aus Clec16a-KD- und WT-Mäusen	59
Abbildung 12	Charakterisierung der mit einem Percoll-Gradienten isolierten „TECs“-Zellgruppe und „Thymozyten“-Zellgruppe.....	60
Abbildung 13	Immunoblot von LC3-I und LC3-II in „TECs“ von WT- und Clec16a-KD Mäusen	62
Abbildung 14	CLEC16A und Autophagie	67
Abbildung 15	Erklärungsansatz der Assoziation von <i>CLEC16A</i> mit Typ-1-Diabetes .	79

Abkürzungen

Es wurden der besseren Lesbarkeit halber die gebräuchlichen Abkürzungen verwendet, auch wenn diese für einen englischen Begriff stehen. Die deutschen Übersetzungen der englischen Begriffe sind in dieser Übersicht gleichwohl in Klammern mit angegeben. Wichtige, möglicherweise aber ungeläufige Abkürzungen werden darüber hinaus im Text bei ihrer ersten Nennung eingeführt. Den internationalen Richtlinien entsprechend werden Gene kursiv und Proteine nicht-kursiv geschrieben. Gene und Proteine des Menschen werden dabei in Majuskeln geschrieben (z. B. „*CLEC16A*“ bzw. „CLEC16A“), Gene und Proteine der Maus beginnend mit einer Majuskel und darauf folgenden Minuskeln (z. B. „*Clec16a*“ bzw. „Clec16a“). Gene der Fruchtfliege werden im Falle eines rezessiven Mutanten-Allels nur in Minuskeln geschrieben, während Proteine der Fruchtfliege mit einer Majuskel anfangen (z. B. „*ema*“ bzw. „Ema“). Sollen die Funktion des Gens und die Funktion des Proteins zusammengefasst beschrieben werden, so wird nur die nicht-kursive Form verwendet. Speziesübergreifend wird die humane Schreibweise verwendet.

Abb.	Abbildung
AIRE	Autoimmune Regulator (Autoimmuner Regulator)
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen Presenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG5	Autophagy Protein 5 (Autophagie-Protein 5)
AU	Arbitrary Unit (willkürliche Einheit)
bit	Binary digit (Binärziffer)
bp	Base pair (Basenpaar)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius

CD	Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppe)
CIITA	MHC Class II Transactivator (Transaktivator des Hauptgewebeverträglichkeitskomplex Klasse II)
CLEC16A	C-type Lectin Domain Family 16 Member A (C-Typ-Lektin-Bereich Familie 16 Mitglied A)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cTEC	Cortical Thymic Epithelial Cell (kortikale Thymusepithelzelle)
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4)
d	Dies (Tag)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoledihydrochlorid
DEXI	Dexamethasone-Induced Transcript (Dexamethason-induziertes Transkript)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbeccos modifiziertes Adler-Medium)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Deoxyribonuclease (Desoxyribonuklease)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung)
dpi	Punkte/Zoll
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ema	Endosomal maturation defective (endosomal reifungsgestört)
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule (epitheliales Zelladhäsionsmolekül)
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)
FC-Block	Fragment Crystallizable (kristallisierbares Fragment)-Rezeptor-Block
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Erdbeschleunigung oder Gramm

°	Grad
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Hora (Stunde)
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution (Hanks gepufferte Salzlösung)
HCl	Hydrogenchlorid
HEK cell	Human Embryonic Kidney cell (humane embryonische Nierenzelle)
hi	High (im Sinne von „viel“)
Hz	Hertz
IF α	Interferon alpha
IL2RA	Interleukin 2 Receptor alpha (Interleukin 2-Rezeptor alpha)
INS	Insulin
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (Tyrosin-basiertes Immunrezeptoraktivierungsmotiv)
K8	Keratin 8
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
KD	Knockdown (Runterschaltung)
KO	Knockout (Ausschaltung)
Lb-Amp	Lysogeny broth (Brühe)-Ampicillin
LC3	Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (Mikrotubulus-assoziiertes Protein 1 leichte Kette 3)
lo	Low (im Sinne von „wenig“)
MDC	Monodansylcadaverine (Monodansyl-1,5-Diaminopentan)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

miRNA	Micro RNA (Mikro-Ribonukleinsäure)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
msek	Millisekunde
mTEC	Medullary Thymic Epithelial Cell (medulläre Thymusepithelzelle)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOD mouse	Non-Obese Diabetic mouse (nicht übergewichtige diabetische Maus)
OCT	Optimal Cutting Temperature compound (Zusammensetzung für optimale Schneidetemperatur)
OD	Optical Density (optische Dichte)
p / p-Wert	p value (Signifikanzwert)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	Pacific Blue (Pazifikblau)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Triton X (Phosphat-gepufferte Salzlösung Triton X)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
%	Prozent
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22 (Protein-Tyrosin-Phosphatase-Nichtrezeptor Typ 22)
RISC	Ribonucleic Acid-Induced Silencing Complex (Ribonukleinsäure-induzierter Abschwächungskomplex)

RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	Ribonucleic Acid interference (Ribonukleinsäure-Interferenz)
RNAse	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen/Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (schwerer kombinierter Immundefekt)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde
shRNA	Small hairpin Ribonucleic Acid (kleine Haarnadel-Ribonukleinsäure)
siRNA	Small interfering Ribonucleic Acid (kleine interferierende Haarnadel-Ribonukleinsäure)
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SOCS1	Suppressor of Cytokine Signaling 1 (Unterdrücker der Zytokin-Signalwege 1)
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
ssDNA	Single stranded Deoxyribonucleic Acid (einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure)
TAP	Transporter associated with Antigen Processing (mit Antigenprozessierung assoziierter Transporter)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEC	Thymic Epithelial Cell (Thymusepithelzelle)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UEA-1	Ulex Europaeus Agglutinin-1
V	Volt
WT	Wildtyp
Z. B.	Zum Beispiel

1. Einleitung

Diese Arbeit untersuchte den Einfluss des Genes *CLEC16A* auf Autophagie in einer menschlichen Zelllinie und in Thymuszellen eines Mausmodells für Typ-1-Diabetes. Die Untersuchungen beleuchten damit eine mögliche Rolle von *CLEC16A* für die Entstehung von Autoimmunität. Die Einleitung (Kapitel 1) stellt in einem ersten Teil für die Arbeit relevante Informationen zu Typ-1-Diabetes und den für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wichtigen Begriff der zentralen Toleranz vor. Anschließend wird der Zusammenhang von Autophagie und Autoimmunität sowie die mögliche Bedeutung von *CLEC16A* für die Entstehung von Typ-1-Diabetes erläutert. Der zweite Teil der Einleitung befasst sich mit einer Fragestellung, die sich aus dieser möglichen Rolle von *CLEC16A* ableiten lässt. Ferner werden die Modelle vorgestellt, anhand derer die Fragestellung überprüft, sowie die Marker, mit denen Autophagie untersucht wurde. In Material und Methoden (Kapitel 2) werden die verwendeten Methoden und, am Ende jedes Abschnittes, das für die jeweilige Methode relevante Material beschrieben. Wenn ein Produkt nicht aufgeführt ist, wurde entweder ein schon vorher genanntes oder ein handels- und situationsübliches Produkt verwendet. Auf eine Angabe des Herkunftslandes des Herstellers wurde aufgrund der Internationalität des Marktes verzichtet. Die Ergebnisse (Kapitel 3) beziehen sich auf die Untersuchungen von Autophagie, zuerst in der menschlichen Zelllinie und danach in den Thymuszellen des Mausmodells für Typ-1-Diabetes. Daraufhin werden in der Diskussion (Kapitel 4) die Befunde hinsichtlich ihrer Einschränkungen und ihrer Bedeutung diskutiert. Dabei wird auch erörtert, welchen Einfluss *CLEC16A* auf Autophagie in TECs und damit im Rahmen der zentralen Toleranz im Thymus haben könnte. Im Verlauf der Diskussion werden außerdem Möglichkeiten vorgestellt, wie die Untersuchung der Fragestellung weiter vorangetrieben werden könnte. An die Diskussion schließen sich zuletzt eine Zusammenfassung (Kapitel 5) und das Literaturverzeichnis (Kapitel 6) an.

1.1 Hintergrund

1.1.1 Typ-1-Diabetes

Der folgende Abschnitt stellt zunächst allgemein die Erkrankung Typ-1-Diabetes vor und geht dann genauer auf die Ätiologie und die Pathogenese ein.

1.1.1.1 Allgemeine Informationen

Diabetes mellitus ist der Überbegriff für eine Gruppe von Erkrankungen, die durch eine Hyperglykämie gekennzeichnet sind. Die Hyperglykämie kann dabei durch einen relativen oder absoluten Insulinmangel bedingt sein. Die beiden wichtigsten Formen von Diabetes mellitus sind Typ-1-Diabetes und Typ-2-Diabetes. Typ-2-Diabetes ist für über 90 % der Diabetes mellitus-Fälle verantwortlich und entsteht durch einen relativen Insulinmangel aufgrund von Insulinresistenz Glukose-aufnehmender Zellen (1). An Typ-1-Diabetes leiden in Deutschland 5-10 % der an Diabetes mellitus erkrankten Menschen (1). Bei Typ-1-Diabetes kommt es durch einen autoimmunen Prozess zu einer Zerstörung der β -Zellen des Pankreas. Die β -Zellen sind Teil der endokrin wirkenden Langerhans-Inseln des Pankreas und für die Insulin-Produktion verantwortlich. Der daraus entstehende absolute Insulinmangel mündet in einer gestörten Glukoseaufnahme der Körperzellen. Der Goldstandard der Therapie ist die Substitution von Insulin. Eine Überdosierung von Insulin kann zu einer Hypoglykämie führen, die zusammen mit dem hyperglykämischen Koma die wichtigste Akutkomplikation von Typ-1-Diabetes darstellt. Die wichtigsten chronischen Komplikationen von Typ-1-Diabetes sind Angiopathien, die durch die chronische Hyperglykämie bedingt sind (2): Makroangiopathien führen zu koronarer Herzerkrankung und Bluthochdruck, Schlaganfällen und peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Mikroangiopathien führen zu Retinopathie, Neuropathie und Nephropathie. Diese Komplikationen gehen mit einer deutlich verminderten Lebensqualität und -erwartung einher (2). Die chronische Erkrankung Typ-1-Diabetes

verursacht wegen ihres frühen Manifestationsalters (häufig vor der Pubertät) und der Notwendigkeit intensiver medizinischer Betreuung erhebliche direkte und indirekte volkswirtschaftliche Kosten (1). Die pro Jahr um 3-4 % steigende Inzidenz beträgt in Nordeuropa und den Vereinigten Staaten derzeit etwa 12/100.000 Einwohner (1,3). Innerhalb von Europa variiert die Inzidenz allerdings von 3 Neuerkranken/100.000 Einwohner in Mazedonien bis zu 40 Neuerkranken/100.000 Einwohnern in Finnland (4,5). In Deutschland sind zur Zeit etwa 200.000 Menschen an Typ-1-Diabetes erkrankt (2).

1.1.1.2 Ätiologie

Typ-1-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung multifaktorieller Genese, deren Entstehung noch immer nicht vollständig aufgeklärt ist. Die geographischen Unterschiede der Inzidenz, die steigende Inzidenzrate, sowie ein Krankheitsbeginn in einem zunehmend jüngeren Lebensalter (6) weisen darauf hin, dass Umwelteinflüsse wichtige Entstehungsfaktoren für die Entwicklung von Typ-1-Diabetes sind (7). Die umfassende Suche nach konkreten Umweltfaktoren, die zur autoimmunen Pathogenese von Typ-1-Diabetes führen könnten, deutet auf virale Infektionen als mögliche auslösende Schlüsselereignisse hin; eine Evidenz für einen kausalen Mechanismus konnte aber bisher nicht erbracht werden (7-9). Unstrittig ist jedoch, dass jedwede Umweltfaktoren Typ-1-Diabetes auf einer genetischen Basis auslösen (7). So beträgt die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen 50 % (7). Das relative Geschwisterrisiko (Wahrscheinlichkeit der Erkrankung bei einem Geschwisterkind geteilt durch die Prävalenz der Bevölkerung) wird auf 15 geschätzt; das entspricht einem der höchsten Werte bei weitverbreiteten komplexen Erkrankungen (10,11). Die Major Histocompatibility Complex (im Folgenden „MHC“) II-Region des Chromosoms 6 ist dabei für 50 % der genetischen Suszeptibilität verantwortlich (12,13). Weitere genetische Suszeptibilitätsregionen mit einer deutlichen Krankheitsassoziation sind INS (14), CTLA-4 (15), PTPN22 (16) und IL2RA (17). Die Entdeckung dieser Genregionen ist

durch den Beginn der Ära genomweiter Assoziationsstudien erheblich erleichtert worden. In diesem Rahmen wurde 2007 erstmals *CLEC16A* als ein mit Typ-1-Diabetes assoziiertes Gen beschrieben (18–20).

1.1.1.3 Pathogenese

Einen Vorschlag für die Pathogenese von Typ-1-Diabetes auf der Basis aktueller Kenntnisse zeigt Abb. 1 (7). Demnach lösen Umweltfaktoren bei genetisch anfälligen Individuen eine proinflammatorische Stoffwechsellage und die Hochregulierung von IF α und MHC I bei β -Zellen aus. Dies erleichtert die Erkennung pankreatischer Autoantigene durch CD8⁺ T-Zellen, was neben einer abnehmenden β -Zellmasse zu einer Präsentation dieser Antigene durch Antigen-präsentierende Zellen (im Folgenden „APCs“) im drainierenden Lymphknoten führt. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen aktivieren daraufhin B-Zellen, deren Plasmazellklone Autoantikörper produzieren, welche in diesem Stadium vornehmlich gegen Insulin gerichtet sind. Stimulierte und proliferierte CD8⁺ T-Zellen zerstören weitere β -Zellen, was die Exposition weiterer Autoantigene zur Folge hat. Ein erneuter Zyklus von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellstimulation schließt sich an bis die pankreatische β -Zellfunktion derart gestört ist, dass es zu einer hyperglykämischen Stoffwechsellage kommt.

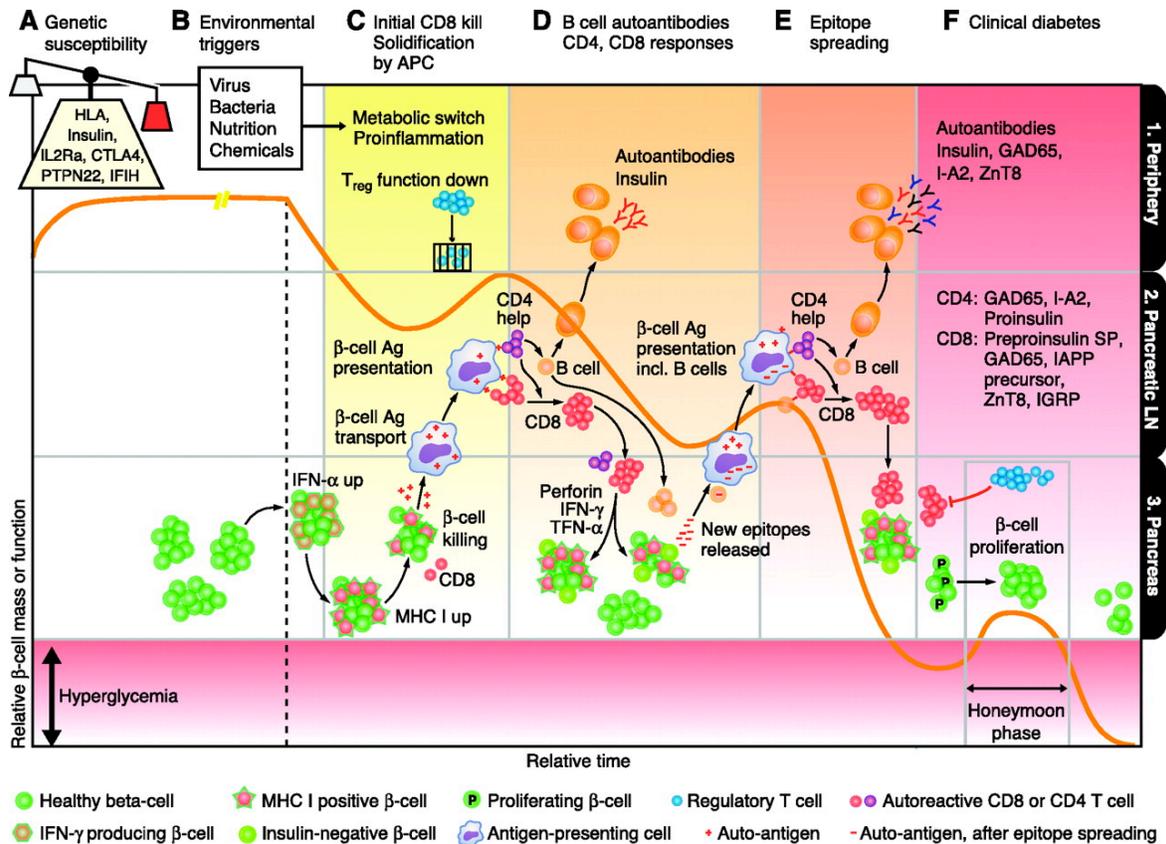


Abbildung 1 Pathogenese von Typ-1-Diabetes nach van Belle et al. (7), mit Genehmigung der American Physiological Society.

Bei der Pathogenese wird hyperreaktiven T-Zellklonen eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben (21–23). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Hyperreaktivität der T-Zellen durch ein Versagen peripherer tolerogener Mechanismen zustande kommt. Inzwischen nimmt man eine Störung in der Entwicklung zentraler Toleranz als primären Pathomechanismus an. Darauf wies 1982 der Schutz vor Typ-1-Diabetes nach neonataler Thymektomie hin (23,24). Transplantationsexperimente, in denen die Thymi von Diabetes-resistenten bzw. -anfälligen Mäusen die Krankheit in Empfängertieren verhüteten bzw. induzierten, bekräftigten diese Vermutung (25,26). Jüngere Einblicke in die Expression Gewebe-spezifischer Antigene wie Insulin im Thymus verleihen der Bedeutung zentraler Toleranz für die Pathogenese von Typ-1-Diabetes weiteres Gewicht (23).

1.1.2 Zentrale Toleranz

Das Immunsystem des Körpers ist mit der Aufgabe konfrontiert, auf der einen Seite körperfremde Zellen anzugreifen und auf der anderen Seite körpereigene Zellen zu tolerieren. Wenn diese Balance gestört ist, kommt es bei hyporeaktiven Abwehrzellen zu vermehrten Infektionen und bei hyperreaktiven Abwehrzellen zu Autoimmunität. In ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen werdende T-Zellen, sogenannte Thymozyten, mehrere Stationen, in denen sie auf ihre Funktionalität und die Fähigkeit der Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Zellen geprüft werden. Diese Toleranzentwicklung im Thymus wird auch zentrale Toleranz genannt.

1.1.2.1 Positive und negative Selektion

Nach dem Eintritt der T-Zellen in den Thymus und der Ausbildung eines vollständigen und funktionellen T-Zell-Rezeptors (im Folgenden „TCR“) werden die TCRs mit Peptiden konfrontiert, die ihnen auf MHC-Komplexen von APCs präsentiert werden. Wenn die TCRs nicht mit MHC-Komplexen funktionell interagieren, sterben die Thymozyten durch fehlende Überlebenssignale einen apoptotischen Zelltod (27–29). Diese sogenannte positive Selektion findet vornehmlich im kortikalen Thymus statt (30,31). Die zu diesem Zeitpunkt sowohl CD4 als auch CD8 aufweisenden Thymozyten (doppelpositive Thymozyten) werden nun zu ausschließlich CD4⁺ oder CD8⁺ Thymozyten und unterziehen sich als solche der sogenannten negativen Selektion, die im medullären Thymus stattfindet (32). Dabei werden diejenigen Thymozyten, die mit präsentierten Selbst-Antigenen reagieren, durch apoptotische Todessignale ausgeschaltet (33). Bereits 1997 konnte Douglas Hanahans Gruppe zeigen, dass einzelne Zellen im murinen Thymus pankreatische Antigene exprimieren und dies Autoimmunität verhindern könnte (34). Nach dem Affinitätsmodell entscheidet die Affinität der TCR-Peptid-MHC-Komplexe über das Schicksal der Thymozyten (35): Ist die

Affinität zu gering, sterben die Thymozyten während der positiven Selektion; ist die Affinität zu hoch, sterben sie während der negativen Selektion oder werden zu regulatorischen T-Zellen (36,37).

1.1.2.2 Zentrale Expression von Autoantigenen und Autoimmunität

Bei der Entstehung bestimmter Autoimmunerkrankungen, unter anderem Typ-1-Diabetes, wird einer fehlenden Expression Gewebe-spezifischer Antigene durch Thymusepithelzellen (im Folgenden "TECs") eine immer größere Rolle beigemessen (23,34). In murinen und humanen medullären TECs (im Folgenden „mTECs“) fördert der Transkriptionsfaktor AIRE die ektopische Expression peripherer Gewebe-spezifischer Antigene (38). Ein genetischer Defekt von *AIRE* führt im Menschen zum autoimmunen polyendokrinen Syndrom Typ-1 (Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy), das unter anderem durch die Entwicklung von Typ-1-Diabetes charakterisiert ist (39). In der Tat vermittelt AIRE in einer Untergruppe von mTECs zentrale Toleranz gegenüber Typ-1-Diabetes-Autoantigenen wie GAD65, GAD67 und Insulin (39,40). Doch sind neben den mTECs auch Prozessierungswege für Selbstantigene bekannt, die spezifisch in kortikalen TECs (im Folgenden „cTECs“) das TCR-Repertoire auf Ebene der positiven Selektion von MHC II-Spezifitäten beeinflussen (35). Beispiele hierfür sind die lysosomale Protease Cathepsin L und die Thymus-spezifische Serin-Protease (35). Schließlich ist in den letzten Jahren ein zusätzlicher Prozessierungsweg für die Präsentation von Selbstantigenen bekannt geworden, der sowohl bei der positiven Selektion als auch bei der negativen Selektion eine Rolle spielt: Autophagie (41).

1.1.3 Autophagie

In den meisten APCs wird der MHC II-Komplex vor allem mit Peptiden von exogenen Proteinen beladen, die durch Endozytose aufgenommen worden sind (42). Im Allgemeinen können jedoch auch der konstitutiv sekretorische

Weg (42), ein Proteasom- und TAP-abhängiger Weg (43), Chaperon-vermittelte Autophagie (44), Mikroautophagie (44) und Makroautophagie (45–50) zur MHC II-Beladung beitragen. Von diesen Beladungsprozessen ist dabei die Rolle von Makroautophagie in der Literatur am umfangreichsten beschrieben worden. Ihr wird zudem die größte Bedeutung für die MHC II-Beladung zugeschrieben (51). Der Begriff „Autophagie“ bezieht sich in dieser Arbeit daher auf Makroautophagie.

1.1.3.1 Der Proteindegradationsprozess Autophagie

Makroautophagie ist ein Proteindegradationsprozess, den Zellen in Stresssituationen wie Mangelernährung zum Überleben nutzen (52). Ein Phagophor nimmt dabei Zellsubstrat auf und formt durch den Zusammenschluss seiner Membranenden ein Autophagosom (Abb. 2). ATG5 ist für diesen Prozess essentiell (51). Das Autophagosom verschiebt seinen pH-Wert in einen sauren Bereich und fusioniert mit einem Lysosom zu einem Auto(phago)lysosom, in dem das aufgenommene Zellsubstrat degradiert wird. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zelltypen weisen TECs eine unabhängig von Mangelernährung durchgehend hohe autophagische Aktivität auf (53). Gleichzeitig zeichnen sich TECs durch eine ineffiziente Aufnahme exogener Antigene aus und präsentieren stattdessen auf ihren MHC II-Komplexen endogene Antigene (54). Dies legt einen Einfluss von Autophagie auf die Präsentation von endogenen Antigenen in TECs nahe.

1.1.3.2 Der Einfluss von Autophagie auf Autoimmunität

In der Tat konnte Ludger Kleins Arbeitsgruppe im Jahr 2008 zeigen, dass Autophagie in TECs ein Schlüsselprozess für die Präsentation von MHC II-präsentierten Selbstantigenen ist und dass eine Störung von Autophagie im Thymus ein schweres Entzündungsgeschehen in mehreren Körperorganen zur Folge hat (41). Ein Jahr später konnte Toshiaki Mizuochis Labor diesen

Ergebnissen weiteres Gewicht verleihen, indem es sowohl in cTECs als auch in mTECs die Kolo-kalisierung von Autophagie-Markern und MHC II-Kompartimenten nachwies (55). Ludger Kleins Arbeitsgruppe fand heraus, dass cTECs eine deutlich höhere autophagische Aktivität als mTECs aufweisen (41). Dennoch gibt es auch eine Subpopulation von mTECs, die eine durchgehend hohe Autophagierate zeigen. Dies sind MHC II^{hi} CD80^{hi} mTECs, in denen Aire aktiv ist und die promiskuitive Expression von Gewebe-spezifischen Antigenen fördert (41,56). Im Detail ist es jedoch unklar, wie gestörte Autophagie in TECs zu einer veränderten Selbstreaktivität führt. Darüber hinaus ist die Bedeutung von Autophagie im Vergleich zu anderen Zellprozessen, die zur MHC II-Beladung beitragen (wie der konstitutiv sekretorische Weg für intrazelluläre Antigene in cTECs und mTECs sowie der Endozytose-Weg für extrazelluläre Antigene in mTECs), nicht eindeutig differenziert (55). Schließlich berichtete 2012 Leopold Eckharts Arbeitsgruppe, dass in einem von Ludger Kleins Gruppe abweichenden Mausmodell fehlende Autophagie nicht zu dem gleichen, schweren Entzündungsgeschehen führt (57). Dieses Ergebnis ist jedoch mit der Hypothese vereinbar, dass Autophagie für die Beladung bestimmter MHC II-präsentierter Antigene notwendig ist, während die Generierung eines vollständigen T-Zell-Repertoires die Kombination verschiedener Prozessierungswege erfordert (41,57). Trotz vieler offener Fragen scheint Autophagie in TECs eine nicht zu vernachlässigende Rolle bei der autoimmunen Pathogenese zu spielen. Diese Vorstellung verlangt jedoch noch brückenschlagende Elemente. CLEC16A könnte ein solches Element sein und wird daher im Folgenden vorgestellt.

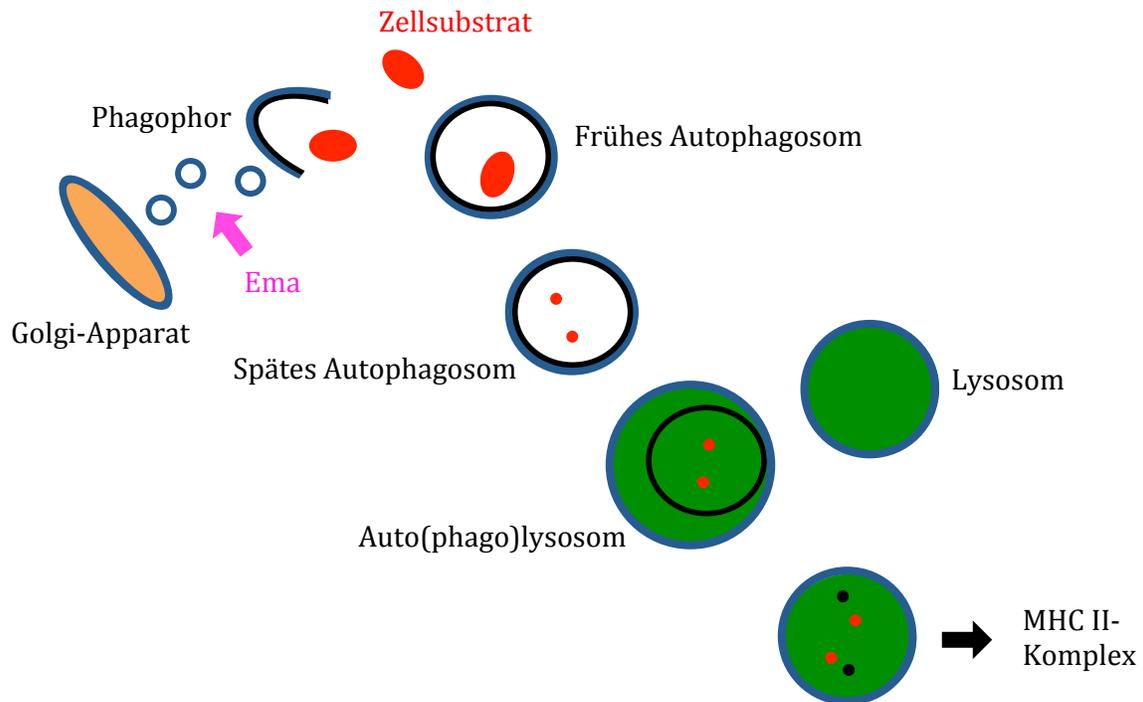


Abbildung 2 Der Proteindegradationsprozess Autophagie, angelehnt an Mizushima und Klionsky (58,59). Autophagie ist ein Proteindegradationsprozess, bei dem ein Phagophor Zellsubstrat aufnimmt und durch den Zusammenschluss seiner Membranenden ein Autophagosom formt. Dafür notwendige Membranteile werden unter anderem vom Golgi-Apparat geliefert. Dieser Prozess wird von Ema unterstützt (Kapitel 1.1.4.3). Das Autophagosom verschiebt seinen pH-Wert in einen sauren Bereich und fusioniert mit einem Lysosom zu einem Auto(phago)lysosom, in dem das aufgenommene Zellsubstrat degradiert und in TECs MHC II-Komplexen zugeführt wird.

1.1.4 CLEC16A

Genomweite Assoziationsstudien haben in den letzten Jahren die Bedeutung genetischer Suszeptibilität bei Autoimmunerkrankungen unterstrichen, wobei die Funktion vieler Gene noch immer unbekannt ist (60,61). Im Jahr 2007 wurde *CLEC16A* als ein mit Typ-1-Diabetes assoziiertes Gen beschrieben (18–20). Damals war es noch als *KIAA0350* benannt, inzwischen wurde das Gen wegen der Homologie zur C-Typ-Lektin-Familie in *CLEC16A* (C-type lectin domain family 16 member A) umbenannt. Mittlerweile wurde *CLEC16A* als eines von zwölf

Risikogenen für Typ-1-Diabetes beschrieben, das die Grundlage eines diagnostischen Tests bei Neugeborenen bildet (62). Es ist aber auch mit den Krankheiten multiple Sklerose (63), systemischer Lupus erythematosus (64), primäre biliäre Zirrhose (65) und juvenile idiopathische Arthritis (66), sowie Osteoporose (67) assoziiert.

1.1.4.1 *CLEC16A* und das Immunsystem

CLEC16A liegt auf dem Chromosom 16p13.3. Es hat 24 Exons und 13 RNA-Transkripte, von denen sechs ein Protein mit einer Länge zwischen 140 und 1053 Aminosäuren kodieren (68,69). Unter vielen mit Typ-1-Diabetes assoziierten SNPs von *CLEC16A* weist der SNP rs12708716 die achtstärkste Assoziation aller mit Typ-1-Diabetes assoziierten Genloki auf (18,19). *CLEC16A* wird vor allem in Immunzellen exprimiert (70) und liegt bemerkenswert nahe an den immunregulatorischen Genen *CIITA* und *SOCS1*, sowie dem noch nicht charakterisierten Gen *DEXI*, dessen Expression stark von *CLEC16A* beeinflusst wird (63,71,72). Auch andere C-Typ-Lektine sind an der Entstehung von Autoimmunität beteiligt (73), die meisten von ihnen wirken an der Bindung Ca^{2+} -abhängiger Kohlenhydrate mit (74). Es gibt allerdings auch C-Typ-Lektin-Domänen, die dies nicht tun (75). Darüber hinaus ist die C-Typ-Lektin-Domäne von *CLEC16A* nur 22 Aminosäuren lang (76). So ist unklar inwiefern *CLEC16A* für ein Protein kodiert, das Liganden erkennen könnte (71). Bioinformatische Analysen führten zu der Vermutung, dass *CLEC16A* ein sogenanntes ITAM kodieren könnte (18). ITAMs finden sich bei vielen Rezeptoren des Immunsystems wieder, darunter TCRs, und aktivieren sowohl aktivierende als auch inhibitorische Signalwege (77). Kürzlich wurde außerdem berichtet, dass das endoplasmatische Retikulum der zelluläre Wirkort von *Clec16a* sein könnte, was zu einer Rolle bei der Antigenprozessierung passen würde (76). Zusammenfassend finden sich mehrfach Hinweise auf eine Rolle von *CLEC16A* im Immunsystem, eine genaue Beschreibung der Funktion von *CLEC16A* steht aber noch aus.

1.1.4.2 CLEC16A in TECs

Die Arbeitsgruppe Kissler konnte zeigen, dass die Ausschaltung von *Clec16a* durch Ribonukleinsäure-Interferenz (im Folgenden „RNAi“) in non obese diabetic (im Folgenden „NOD“)-Mäusen zu einem starken Schutz vor der Entwicklung von Typ-1-Diabetes führt (78). Der Vergleich von NOD-Wildtyp-Mäusen (im Folgenden „WT-Mäuse“, „NOD“ mit eingeschlossen) und NOD-*Clec16a*-Knockdown-Mäusen (im Folgenden „*Clec16a*-KD-Mäuse“, „NOD“ mit eingeschlossen) ergab, dass fast keine der *Clec16a*-KD-Mäuse Diabetes entwickelten (78). Ein ähnlicher Schutz trat bei *Clec16a*-KD-Mäusen auf, bei denen Diabetes durch Cyclophosphamid-Gabe induziert wurde. Die Überführung von Milzzellen aus WT- und *Clec16a*-KD-Mäusen in NOD-SCID-Mäuse ergab, dass Milzzellen aus *Clec16a*-KD-Mäusen die Diabetesanfälligkeit der NOD-Mäuse aufheben konnte (78). Eine Wiederholung dieses Experimentes mit reinen B- und T-Zellen ließ erkennen, dass die Anfälligkeit für die Entwicklung von Diabetes von T-Zellen getragen wurde. Weitere Untersuchungen ergaben, dass periphere T-Zellen aus *Clec16a*-KD-Mäusen in der Tat hyporeaktiv gegenüber antigenen Stimuli waren. Wie Experimente mit Knochenmarkchimären zeigen konnten war diese Hyporeaktivität allerdings nicht vom T-Zell-Genotyp, sondern vom Genotyp strahlungsresistenter Zellen der Wirtsmaus abhängig. Es wurde daher vermutet, dass *Clec16a* seine Hauptwirkung in strahlungsresistenten APCs entfalten könnte. In der Tat hing die Hyporeaktivität der T-Zellen aus *Clec16a*-KD-Mäusen vom Genotyp strahlungsresistenter TECs ab (78).

1.1.4.3 CLEC16A und Autophagie in Drosophila

Im Jahr 2010 berichtete DiAntonios Arbeitsgruppe erstmals von „endosomal maturation defective“ (im Folgenden „*ema*“), dem orthologen Gen von *CLEC16A* in *Drosophila*, das die endosomale Reifung fördert (79). Zwei Jahre später konnte das gleiche Labor zeigen, dass *Ema* wichtig für die Größe und Funktion von

Autophagosomen in Fettkörperzellen ist (80). Ema stand im räumlichen Zusammenhang mit dem Golgi-Komplex (Abb. 2) und wurde bei Mangelernährung zusammen mit dem Golgi Protein „Lava lamp“ zur autophagosomalen Membran rekrutiert (80). In Abwesenheit von Ema fand Autophagie noch statt, allerdings waren die Autophagosomen kleiner und die Abbaufunktion des Autophagie-Prozesses war eingeschränkt (80). Bemerkenswerterweise zeigte die *ema*-Mutanten-Fliege diese Dysfunktion auch in somatischen Muskelzellen und die Expression des humanen orthologen Gen *CLEC16A* stellte normale Autophagie in der Fruchtfliege wieder her (79,80).

1.2 Fragestellung, Modelle und Autophagie-Marker

1.2.1 Fragestellung

Die Funktion des Genes *CLEC16A* ist unbekannt. Das orthologe Gen von *CLEC16A*, *ema*, beeinträchtigt Autophagie. Deshalb untersuchte diese Arbeit zunächst in einer humanen Zelllinie, ob ein KD von *CLEC16A* Autophagie verändert. Weiterhin führt die potentiell wichtige Rolle von Autophagie für die Entwicklung zentraler Toleranz zu der Frage, ob *CLEC16A* ein mit Autoimmunität assoziiertes Gen ist, weil es Autophagie in TECs verändert. Diese Vermutung wurde bereits von DiAntonios Gruppe geäußert (80). Um dieser Fragestellung nachzugehen, untersuchte diese Arbeit, ob Autophagie in TECs von *Clec16a*-KD-Mäusen verändert ist.

1.2.2 Gen-KD-Modelle

RNAi beschreibt die Abschwächung der Expression eines Gens durch Hybridisierung des endogenen Gen-Transkriptes mit komplementärer RNA (81,82). Diese kurze, komplementäre RNA wird in Säugetieren in zwei Typen

unterteilt: „small interfering RNA“ (im Folgenden „siRNA“) und „microRNA“ (im Folgenden „miRNA“) (83). siRNA kann von eukaryotischen Transposons selber transkribiert werden oder über virale doppelsträngige RNA in die Zelle gelangen (83). miRNA entsteht durch doppelsträngige RNA, die aufgrund ihrer Haarnadel-Struktur auch „small hairpin RNA“ (im Folgenden „shRNA“) genannt wird (83). Die Prozessierung von doppelsträngiger RNA bzw. shRNA zu siRNA oder miRNA wird durch die Ribonuklease Dicer katalysiert (83). Die Degradation der komplementären RNA wird schließlich durch den „Ribonucleic acid-induced silencing complex“ (im Folgenden „RISC“) vermittelt (83).

RNAi kann aber auch für den KD eines Gens experimentell induziert werden. Dies gelingt entweder durch die direkte Einführung von siRNA in die Zelle oder durch Transfektion der Zellen mit shRNA (83,84). In dieser Arbeit bezieht sich der Gen-KD auf die experimentell induzierte Expression von shRNA. Im Gegensatz zur Technik des Gen-Knockouts (im Folgenden „KO“) führt ein KD durch RNAi zu einer Abschwächung (und nicht zu einer totalen Ausschaltung) der Wirkung eines Gens (85). Die genetischen Variationen, die mit Autoimmunität assoziiert sind, haben häufig ebenfalls moderate Effekte auf die Genexpression (85). Darüber hinaus beeinflusst RNAi die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene direkt und spezifisch. RNAi erfordert so keine Rückkreuzung unterschiedlicher Genome, wie es bei der KO-Technik in der NOD-Maus notwendig wäre (85). Ferner erlaubt die posttranskriptionale Beeinflussung die Abschwächung eines bestimmten Gentranskripts, das durch alternatives Splicen entstanden ist (85). Auch in humanen Zelllinien kann ein Gen-KD durch RNAi durchgeführt werden (86). Im Allgemeinen müssen jedoch einige wichtige Fallstricke bei der Anwendung von RNAi beachtet werden. Die Wahl einer in Bezug auf die Genabschwächung effektiven Sequenz kann schwierig sein, vor allem wenn nur eine bestimmte Splice-Variante eines Gens angegriffen werden soll (87,88). Auch ist die voneinander unabhängige Verwendung mehrerer Zielsequenzen notwendig, um unspezifische Effekte („off-target effects“) zu vermeiden (89). Insgesamt stellt der Gen-KD durch

RNAi jedoch eine geeignete Methode dar, den Effekt eines einzelnen RNA-Transkriptes eines mit Autoimmunität assoziierten Gens zu untersuchen.

1.2.2.1 In vitro-Modell: CLEC16A-KD-HEK-Zellen

Als in vitro-Modelle werden Teile von Organismen bezeichnet, die in einem experimentell kontrollierten Umfeld untersucht werden. Daher sind in vitro-Modelle im Allgemeinen in ihrer translationalen Bedeutung für den menschlichen Organismus noch begrenzter als in vivo-Modelle. Zudem werden häufig Zelltypen als in vitro-Modelle verwendet, die nicht aus dem Gewebe stammen, über das eine Aussage getroffen werden soll. In vitro-Zelllinien sind allerdings einfacher zu handhaben als in vivo-Modelle und lassen häufig einen höheren Umsatz an Experimenten zu. Zudem können in vitro menschliche Zellen untersucht werden, was ein ethisch konfliktloseres Experimentieren erlaubt.

Human Embryonic Kidney (im Folgenden "HEK")-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, die mit dem menschlichen Adenovirus 5 transformiert worden sind (90). Sie werden seit Jahrzehnten in der biomedizinischen Forschung eingesetzt und haben gegenüber einem Mausmodell den Vorteil, dass sie menschliche Zellen sind. Gleichzeitig sind sie jedoch vor allem aufgrund ihres Ursprungszelltyps sowie leichter Veränderung durch die virale Transformation (91) in ihrer translationalen Bedeutung für den menschlichen Organismus begrenzt. Nichtsdestotrotz stellen HEK-Zellen eine einfach zu handhabende Zelllinie dar, die für eine methodische Validierung in Bezug auf den Nachweis von Autophagie nützlich ist und vorläufige Aussagen über die Funktion eines Gens in menschlichen Zellen zulässt.

RNAi ermöglichte den KD von CLEC16A in HEK-Zellen. Hierfür wurden HEK-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das die *CLEC16A*-Sequenz enthält. Das für die Transfektion der HEK-Zellen verwendete Plasmid ist von der Arbeitsgruppe Kissler erstellt worden (87). Es ist ein pLBM-Plasmid, bei dem die Expression von GFP und die Expression der shRNA unter der Kontrolle des selben Promoters

stehen und damit eng korrelieren (87). Die transfizierten Zellen exprimierten siRNA, die mit einer CLEC16A-Sequenz interferierte und so zum KD führte. Humanes *CLEC16A* hat sechs kodierende RNA-Transkripte, von denen ein RNA-Transkript alle Exons von *CLEC16A* umfasst, während bei den anderen RNA-Transkripten einzelne Exons fehlen (68). Darunter befindet sich ein RNA-Transkript, das das Exon 18 nicht mit einschließt (78). Für die Transfektion der HEK-Zellen wurde die gegen Exon 18 gerichtete Sequenz hKIAA#3 ausgewählt, da diese eine besonders hohe KD-Effizienz aufweist (78). Dies bedeutet allerdings auch, dass das RNA-Transkript, das Exon 18 nicht mit einschließt, vom KD unbeeinflusst bleibt. Zu der Zeit, als der gegen Exon 18 gerichtete Vektor hergestellt wurde, war das RNA-Transkript, das Exon 18 nicht mit einschließt, noch nicht bekannt.

1.2.2.2 In vivo-Modell: Die NOD-Clec16a-KD-Maus

Ein in vivo-Modell bezeichnet einen Organismus, dessen Untersuchung die Darstellung von Zellprozessen in einem natürlichem, dynamischem Kontext erlaubt. Als in vivo-Modell werden häufig Mäuse verwendet. Diese grenzen sich durch evolutionäre Divergenz, Verwandtschaftszucht und einen anderen Lebensstil vom Menschen ab. Sie werden so als Krankheitsmodelle für den Menschen regelmäßig in Frage gestellt (92).

Auch die NOD-Maus ist kein perfektes Modell für Typ-1-Diabetes im Menschen. Neben den allgemeinen Fallstricken eines Tiermodells tritt beispielsweise Typ-1-Diabetes in der NOD-Maus im Gegensatz zum Menschen erst nach der Pubertät auf (93). Seit ihrer Entwicklung im Jahr 1980 hat die NOD-Maus trotzdem viel zum Verständnis von Typ-1-Diabetes und autoimmuner Pathogenese im Allgemeinen beigetragen und stellt somit einen etablierten und anerkannten Modellorganismus in der Erforschung von Typ-1-Diabetes dar (93,94). Sie konnte so für die präklinische Entwicklung vieler therapeutischer Ansätze, wie z. B. anti-CD3 Antikörpern, verwendet werden (93,95). Die polygenetische Suszeptibilität und

die Grundzüge der Pathogenese inklusive der Autoantigene sind im Menschen und in der NOD-Maus sehr ähnlich (93). NOD-Mäuse sind mit einem besonderen MHC-Haplotyp namens H-2^{g7} ausgestattet, der den höchsten genetischen Anteil an der Erkrankungsanfälligkeit aufweist (93,96). Die diabetische Pathogenese wird in der NOD-Maus hauptsächlich von T-Zellen getragen, die eine Antigenpezifität für Insulin, GAD, IA-2 und Hsp60 aufweisen (93). Auch in der NOD-Maus konnte eine essentielle Rolle von Aire für die Prävention von Autoimmunität gezeigt werden (97). Zudem stellen insbesondere ein spontanes Auftreten der Krankheit sowie eine Chronizität der Krankheit weitere Ansprüche an ein gutes Tiermodell für Typ-1-Diabetes dar (95). Die NOD-Maus erfüllt diese Ansprüche, wodurch sie sich von anderen autoimmunen Tiermodellen positiv abhebt (95). Die Inzidenz von spontanem Diabetes beträgt bei Weibchen 60-80 % und bei Männchen 20-30 % (93,98). Trotz dieser geringeren Häufigkeit eines offenen Diabetes bei Männchen ist das Vorkommen von infiltrativer Insulinitis ähnlich hoch (94). Die Krankheit tritt typischerweise bei Weibchen zwischen der 12.-14. Woche und bei Männchen etwas später auf (93). Wie einige Menschen mit Typ-1-Diabetes sind NOD-Mäuse auch anfällig für die Entwicklung anderer, über das endokrine System hinausgehender Autoimmunerkrankungen (93).

Die NOD-Clec16a-KD-Maus wurde im Kissler-Labor hergestellt (99). Eine in vitro validierte, von Lentiviren getragene shRNA wurde dabei in NOD-Mäuseembryos injiziert. Die benutzte shRNA richtet sich gegen das Exon 19 von *Clec16a*. Das Exon 19 ist in neun der zehn Splice-Varianten enthalten, womit nur eine möglicherweise kodierende Variante von dieser shRNA nicht angegriffen wird (Clec16a-006) (100). Der Erfolg des KD wurde anhand einer GFP-exprimierenden Sequenz überprüft, die an die shRNA gekoppelt war. Eine weitergehende Zucht führte zu homozygoten, gleichmäßig hoch GFP-exprimierenden Mäusen.

1.2.3 Autophagie-Marker

In den letzten zehn Jahren ist die Zahl der Forschungsarbeiten zu Autophagie erheblich angestiegen (58). Durch ein besseres Verständnis dieses Zellprozesses sind viele neue Methoden vorgeschlagen worden, wie die autophagische Aktivität einer Zelle nachvollzogen werden kann (101). Dennoch ragt keine einzelne, vermeintlich ideale Untersuchungsmethode hervor. Vielmehr existieren ausreichend spezifische Methoden für einzelne Aspekte des Autophagie-Prozesses, die in ihrer Kombination ein repräsentatives Gesamtbild des Zellprozesses ergeben (102). In der vorliegenden Arbeit wurde Autophagie durch Durchflusszytometrie von Monodansylcadaverin (im Folgenden „MDC“), Immunocytochemie bzw. Immunhistochemie von Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (im Folgenden „LC3“) und p62 sowie durch Immunoblot von LC3 und p62 überprüft.

1.2.3.1 MDC

MDC ist ein azidotroper Farbstoff, der zuerst in den 1990er Jahren als *in vivo*-Marker beschrieben worden ist (103). MDC repräsentiert lediglich absolute Zellspiegel von Autophagosomen und Mizushima et al. stellten später darüber hinaus die Spezifität von MDC für Autophagie in Frage, da der Farbstoff größtenteils saure lysosomale Kompartimente repräsentiert (59). Da jedoch in Abgrenzung zu frühen Autophagosomen späte Autophagosomen einen sauren pH-Wert aufweisen, können sie unabhängig von ihrer Fusion mit Lysosomen bereits mit MDC angefärbt werden (104). Demnach kann MDC als probatorische Nachweismethode von Autophagie benutzt werden.

1.2.3.2 LC3

LC3 ist das erste beschriebene Säugetierprotein, das spezifisch mit autophagosomalen Membranen assoziiert ist (105). Es kann daher auch in frühen Autophagosomen detektiert werden (105,106). LC3 existiert in zwei Isoformen, dem zytosolischen Vorläufer LC3-I und der aktiven Form LC3-II (105). Bei der Initiierung von Autophagie wird das zytosolische LC3-I in LC3-II umgewandelt, das in autophagosomale Membranen eingebaut wird (Abb. 3). Diese Initiierung geschieht zusammen mit dem Autophagie-Protein 5 (im Folgenden „ATG5“). Schließlich gibt es drei unterschiedliche Isoformen von LC3 in Säugetierzellen: LC3A, LC3B und LC3C (107). LC3B ist dabei diejenige Isoform, die im Zusammenhang mit Autophagie steht und die im Folgenden mit „LC3“ gemeint ist (106). Der Nachweis von LC3 per Immunoblot ist eine weit verbreitete Methode, um Autophagie nachzuverfolgen. Gleichwohl ist es wichtig zu beachten, dass LC3-II zunächst nur den absoluten Zellspiegel autophagischer Kompartimente anzeigt und kein direktes Maß des autophagischen Flusses ist (106,108). Eine Möglichkeit der Beurteilung des Flusses ist die Verwendung von Protease-Inhibitoren (109). Mit ihnen wird der Autophagie-Prozess an einer dem Einbau von LC3 nachgeschalteten Stelle angehalten. In diesem Fall entspricht eine Anreicherung von LC3-II sicherer einer wirklichen Steigerung autophagischer Aktivität. Eine Alternative, die ohne die zusätzliche Behandlung mit Protease-Inhibitoren auskommt, ist die Messung des Verhältnisses von LC3-II zu LC3-I. Diese hat den Vorteil, dass sie sowohl LC3-I, als auch LC3-II berücksichtigt, kann aber nicht bei Zellen angewendet werden, in denen LC3-I-Spiegel labil sind (106). Sind LC3-I-Spiegel dagegen stabil, bildet das Verhältnis von LC3-II zu LC3-I die Prozessierung von zytosolischem LC3-I zu LC3-II in Autophagosomen-Membranen ab (106). Der Nachweis von LC3 durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie kann direkt mit GFP-LC3 (105) oder indirekt durch die Visualisierung von LC3-Antikörpern erfolgen (106). Der Gebrauch von LC3-Antikörpern hat den Vorteil, dass keine Transfektion und Transgenese erforderlich ist und außerdem das Risiko potentieller Artefakte durch eine

Überexpression (106) vermieden wird. Nichtsdestotrotz können Artefakte durch die Einlagerung von LC3 in Proteinaggregaten auch beim Antikörpernachweis endogenen LC3s vorhanden sein (110). Die in dieser Arbeit benutzten Antikörper reagieren sowohl mit LC3-I als auch mit LC3-II. Daher zeigen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommene Bilder entweder eine diffuse zytosolische Anfärbung oder spezifische punktförmige Strukturen, wobei letztere Autophagosomen darstellen (Abb. 6A) (102).

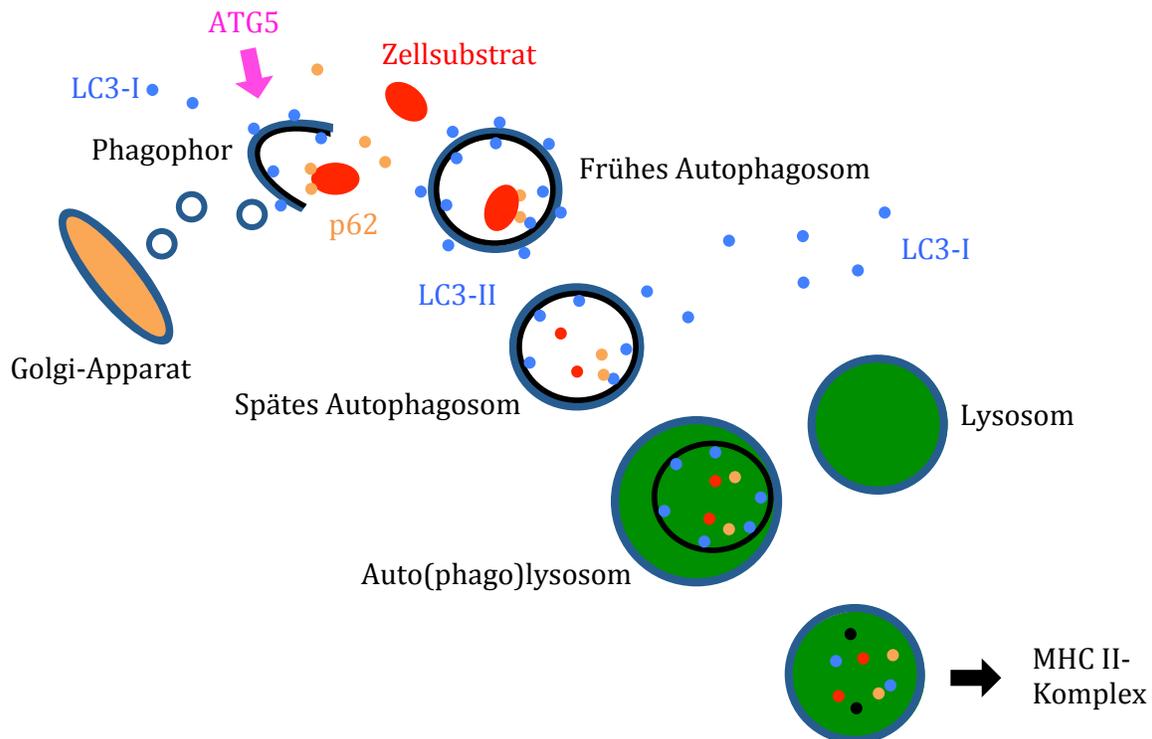


Abbildung 3 Die Autophagie-Marker LC3 und p62, angelehnt an Mizushima, Levine und Klionsky (52,58,59,102). LC3-I ist ein zytosolisches Protein, das in die äußere und innere Membran des frühen Autophagosoms inkorporiert und dann LC3-II genannt wird. Zusammen mit LC3 wirkt auch ATG5 bei der Bildung des frühen Autophagosoms mit. Das LC3-II der äußeren Membran des späten Autophagosoms wird wieder zu LC3-I, während das LC3-II der inneren Membran degradiert wird. p62 ist ein direktes Substrat von Autophagie, das das eigentliche Zellsubstrat über LC3-II mit dem Autophagosom verbindet. Im weiteren Verlauf wird p62 ebenso wie das Zellsubstrat autophagosomal degradiert.

1.2.3.3 p62

p62 ist auch unter dem Namen Sequestosom 1 bekannt. Es verbindet polyubiquitinierte Proteinaggregate mit LC3, wird dadurch in das Autophagosom aufgenommen und schließlich in ihm degradiert (Abb. 3) (111,112). DiAntonios Gruppe verwendete p62, um in der *ema*-Mutante Autophagie zu beobachten (80). Da p62 ein direktes Autophagie-Substrat ist, fallen p62-Zellspiegel bei gesteigerter Autophagie, während sie bei gestörter Autophagie ansteigen (106,113,114). Absolute Zellspiegel deuten aus diesem Grund auf den wirklichen autophagischen Fluss hin. Trotzdem müssen einige potentielle Trugschlüsse beachtet werden. p62 kann auch proteasomal degradiert werden. Erhöhte p62-Zellspiegel können somit aufgrund von inhibierter proteasomaler Aktivität gestörte Autophagie vortäuschen (115,116). Des Weiteren kann p62 situationsabhängig transkriptional aktiviert werden (117). Insgesamt ist p62 nichtsdestotrotz ein etablierter und zuverlässiger Autophagie-Marker.

2. Material und Methoden

2.1 CLEC16A-KD-HEK-Zellen

Die HEK-Zellen wurden in Zellkultur gehalten und für Experimente standardisiert übertragen. Für den KD wurden HEK-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die die Zielsequenz enthielten. Neben *CLEC16A* wurde auch eine Zielsequenz des Gens *ATG5* verwendet. *ATG5* ist essentiell für die Formation von frühen Autophagosomen (Abb. 3) (51). Ein KD von *ATG5* stellt somit eine Positivkontrolle für die Ausschaltung des Autophagie-Weges dar.

2.1.1 Zellkultur

Die HEK-Zellen wurden in 10 cm-Petrischalen bei 37 °C gelagert und alle zwei bis 3 d unter sterilen Bedingungen aufgeteilt. Für die Zellüberführung wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellschicht einmal mit 10 ml DPBS gewaschen und danach mit 1,5 ml 0,005 % Trypsin-EDTA für 3-5 min bei 37 °C gelöst. Die Wirkung des Trypsin wurde mit 8,5 ml Serum-positivem Medium (500 ml DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mmol/l Glutamin, 10 % Fetal Bovine Serum) inhibiert und die Zellen zu einer Einzelzellsuspension gemischt. Jeweils 1,5 ml dieser Einzelzellsuspension wurden in neue Petrischalen überführt, die mit 8,5 ml frischem Serum-positivem Medium aufgefüllt wurden.

2.1.2 Transfer einer Zellzahl

Zum Startzeitpunkt eines Experiments hatten die Zellen eine Konfluenz von 60-80 %. Um dies zu erreichen, wurde zuvor eine bestimmte Anzahl an Zellen (1.500.000 Zellen für Experimente in Petrischalen, 150.000 Zellen für Experimente

in 6-Well-Platten) unter sterilen Bedingungen überführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit DPBS gewaschen, trypsinisiert und wieder mit Serum-positivem Medium auf 10 ml aufgefüllt. 10 µl des Zellgemisches wurden danach mit 90 µl Trypanblau gemischt und von diesem Gemisch wurden wiederum 10 µl in einer Zählkammer gezählt. Die Zelldichte/ml entsprach der Anzahl der gezählten Zellen (pro Quadrant) x 10 (Verdünnungsfaktor) x 10.000 (Kammerfaktor). Das einer Zellzahl entsprechende Volumen wurde schließlich auf neue Petrischalen bzw. 6-Well-Platten verteilt und auf 10 ml (Petrischalen) bzw. 2 ml (6-Well-Platten) mit Serum-positivem Medium aufgefüllt.

Tabelle 1 Material für HEK-Zellkultur

Material	Hersteller	Kennung
HEK-Zelllinie	Joslin Diabetes Center	-
DPBS	Fisher Scientific	SH30028FS
0,005 % Trypsin-EDTA	Invitrogen	25300054
DMEM	Invitrogen	10313039
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	15140122
Glutamin	Invitrogen	25030081
Fetal Bovine Serum	Fisher Scientific	SH30396.03
Trypanblau	Cellgro	25-900-CI
Zählkammer	Hausser Scientific	3200

2.1.3 Klonierung und Transfektion von HEK-Zellen

Für die Klonierung des CLEC16A-KD- und des ATG5-KD-Plasmids wurde ssDNA von *CLEC16A* und *ATG5* anhand einer PCR vervielfältigt und purifiziert. Für den ATG5-KD wurden zwei verschiedene Sequenzen verwendet, die unterschiedliche ATG5-shRNAs kodierten (*ATG5#2* und *ATG5#7*) (118), um die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen ATG5-KD zu erhöhen. Die gereinigte DNA-Sequenz wurde daraufhin ebenso wie ein pUGM-Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut. Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese wurden die korrekt geschnittene DNA und der

korrekt geschnittene Vektor identifiziert, extrahiert und durch Ligation zusammengeführt. Daraufhin wurden Bakterien mit dem Vektor transformiert, der von nun an potentiell die *CLEC16A*- bzw. *ATG5*-Sequenz trug. Durch eine weitere PCR und anschließende Gelelektrophorese wurde festgestellt, bei welchen dieser Bakterien die Transformation mit einem vollständigen Vektor erfolgreich war. Die Bakterien dieser Kolonien amplifizierten ihren Vektor durch ihr Wachstum. Die vollständigen Vektoren wurden dann durch eine Minipräparation extrahiert und zur Sequenzierung verschickt. Um eine größtmögliche Menge an Vektoren mit korrekter Sequenz zu gewinnen, wurden sie durch die erneute Transformation von Bakterien amplifiziert und per Maxipräparation extrahiert. Das daraus hervorgehende DNA-Produkt konnte dann für die Transfektion von HEK-Zellen genutzt werden. Als Transfektion wird die nicht-virale Einführung von DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet (119). Das verwendete FUGENE ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz (119). Als solches bildet es Mizellen, mit der einzuführenden DNA im Kern, und wird so durch Endozytose von der Zelle aufgenommen (120).

2.1.3.1 PCR

Die ssDNA-Sequenz wurde anhand einer PCR vervielfältigt. Dazu wurden 1 µl der ssDNA (10 µM), jeweils 2,5 µl des vorläufigen Primers und des rückläufigen Primers, 1 µl dNTP, 1 µl der DNA-Polymerase, 5 µl des zehnfach konzentrierten Polymerase-Puffers und 37 µl destilliertes Wasser pipettiert und zusammen mit einer Kontrolle ohne ssDNA dem folgenden PCR-Zyklus unterzogen: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min, weitere Denaturierung bei 94 °C für 30 sek, Primerhybridisierung bei 60 °C für 30 sek, Elongation bei 72 °C für 30 sek, 20-fache Wiederholung der letzten drei Schritte (weitere Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation), abschließend bei 72 °C für 10 min Elongation und bei 4 °C Kühlung.

2.1.3.2 PCR-Purifizierung

Die per PCR vervielfachte DNA wurde mit dem Nucleo Spin-Satz laut Handbuch gereinigt, die Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Reinheit durch das Verhältnis von $OD_{260/280}$ überprüft, welches etwa dem Wert 1,8 entsprechen sollte.

2.1.3.3 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen

Die gereinigte PCR-Sequenz wurde mit schnell verdauenden Restriktionsenzymen bei 37 °C für 30 min verdaut: 1 µg/10 µl PCR-Produkt, 2 µl zehnfach konzentrierter Verdau-Puffer, 1 µl Restriktionsenzym XhoI, 1 µl Restriktionsenzym EcoRI und 6 µl destilliertes Wasser.

2.1.3.4 Verdau der Vektoren mit Restriktionsenzymen

Ein pUGM-Vektor wurde mit schnell verdauenden Restriktionsenzymen bei 37 °C für 10 min verdaut: 2 µl Plasmid (entspricht 2 µg), 3 µl zehnfach konzentrierter Verdau-Puffer, 1 µl Restriktionsenzym XhoI, 1 µl Restriktionsenzym EcoRI, 1 µl alkalische Phosphatase und 22 µl destilliertes Wasser.

2.1.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um das Agarose-Gel herzustellen, wurde 1 % (Plasmide) bzw. 1,5 % (PCR-Produkt) Agarose in TAE-Puffer für 1 min gekocht bis die Suspension klar war. Danach wurden 10 µl Ethidiumbromid/100 ml Puffer hinzugefügt und das Gel gegossen. Die Elektrophorese des Plasmids (30 µl) fand bei 100 V für 30 min und die Elektrophorese des PCR-Produktes (30 µl) fand bei 200 V für 25 min statt. Als Referenz wurden für den Vektor 5 µl eines 1 kb DNA-Leiters und für die DNA 5 µl eines low range DNA-Leiters verwendet.



Abbildung 4 Gelelektrophorese der per PCR vermehrten DNA. Bei 120 bp leuchten die durch Ethidiumbromid markierten DNA-Sequenzen von *ATG5#2* und *ATG5#7* auf, die PCR-Kontrollen ohne DNA dagegen nicht.

2.1.3.6 Extraktion und Konzentrationsmessung der DNA und des Vektors

Das erfolgreich geschnittene PCR-Produkt (Ziel-DNA) von *CLEC16A* bzw. *ATG5* wurde bei 120 bp (Abb. 4) identifiziert, ebenso wie der erfolgreich geschnittene Vektor bei 8 kb herausgeschnitten und mit dem Nucleo Spin-Satz laut Handbuch in 30 μ l destilliertem Wasser eluiert. Abschließend wurde die Konzentration der DNA gemessen.

2.1.3.7 Ligation der DNA

Das PCR-Produkt und der Vektor wurden im molaren Verhältnis von 5:1 in einem Volumen von 20 μ l, zusammen mit 1 μ l T4-Ligase und 2 μ l T4-Puffer, über Nacht bei 22 °C aufgesetzt. Um ein molares Verhältnis von 5:1 zu erreichen, wurde das Verhältnis der Längen der Ziel-DNA (in kb) und des Vektors (in kb) mit der Konzentration des Vektors (in ng) multipliziert. Das Ergebnis bezifferte die Konzentration der Ziel-DNA, die einem molaren Verhältnis von 1:1 gegenüber dem Vektor entspricht. Die fünffache Konzentration der Ziel-DNA bei gleichbleibender Konzentration des Vektors ergab ein molares Verhältnis von 5:1.

2.1.3.8 Transformation der Bakterien und Amplifizierung

Für die Transformation wurden 5 µl Ligationsprodukt und 25 µl Bakterien gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert, für 30 sek bei 42 °C mit Hitze geschockt, für 2 min auf Eis inkubiert und danach auf Ampicillin-enthaltende Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C über Nacht in feuchter Umgebung inkubiert. Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien einem erneuten PCR-Zyklus unterzogen. Mit einer Pipettenspitze wurde jeweils eine Kolonie berührt und dann in folgendes PCR-Gemisch eingetaucht: 1,25 µl des vor- und rückläufigen Primers, 0,5 µl dNTP, 0,5 µl DNA-Polymerase, 2,5 µl zehnfach konzentrierter Polymerase-Puffer und 19 µl destilliertes Wasser. 15 µl der PCR-Produkte wurden erneut mit einem 1,5 % Agarose-Gel aufgetrennt und diejenigen Kolonien identifiziert, die mit einem vollständigen Vektor erfolgreich transformiert wurden. Die entsprechenden Kolonien wurden auf jeweils 5 ml LB-Amp verteilt und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.1.3.9 Minipräparation und Sequenzierung

Die Kolonien in LB-Amp wurden mit 14.000 rpm für 1 min bei 4 °C abzentrifugiert und mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Danach wurden sie mit 250 µl P2-Puffer bei Raumtemperatur lysiert, fünfmal sanft gewendet und für 1 min inkubiert. Ebenso wurden weitere 250 µl neutralisierender P3-Puffer bei Raumtemperatur hinzugefügt, fünfmal sanft gewendet und für 1 min inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in neue Röhrchen überführt, in denen sie mit 600 µl Isopropanol resuspendiert wurden, um eine Präzipitation der DNA zu ermöglichen. Die Plasmide wurden mit einem darauf folgenden Zentrifugationsschritt mit 14.000 rpm für 15 min bei 4 °C im Rückstand gesammelt und mit 1 ml 70 % Ethanol (70 % Ethanol in destilliertem Wasser) resuspendiert. Der Überstand wurde nach einem erneuten Zentrifugationsschritt mit 14.000 rpm für 15 min bei 4 °C entfernt und der Rückstand in den Röhrchen

kopfüber für 5 min getrocknet. Die Plasmide wurden mit 30 µl destilliertem Wasser resuspendiert, die Konzentration wurde gemessen und die DNA mit dem Sequenzierungs-Primer pUGMseq zur Sequenzierung verschickt (Harvard Medical School Core Facilities). Die verbleibende DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.3.10 Transformation von Bakterien mit *CLEC16A*-DNA

Die DNA mit der korrekten Sequenz für *CLEC16A* wurde erneut für eine Transformation genutzt, um eine größtmögliche Menge an Vektoren mit korrekter *CLEC16A*-Sequenz zu gewinnen: 1 µl Plasmid (entspricht 0,16 ng DNA) und 25 µl Bakterien wurden bei 42 °C für 30 sek mit Hitze geschockt, für 2 min auf Eis gelegt, auf einer Ampicillin enthaltenden Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht in feuchter Umgebung inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie mit einer Pipette in 5 ml LB-Amp überführt und mit einer Schüttelfrequenz von 220 Hz bei 37 °C für 8 h inkubiert. Anschließend wurde das Bakteriengemisch mit 200 ml LB-Amp aufgefüllt und mit einer Schüttelfrequenz von 220 Hz bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.1.3.11 Maxipräparation

Am darauffolgenden Tag wurden die Bakterien mit 7.000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und die DNA mit einem Maxipräparation-Satz laut Handbuch extrahiert. Abschließend wurde die Konzentration der DNA gemessen.

2.1.3.12 Transfektion

Nachdem am Tag zuvor jeweils 1.500.000 Zellen/Petrischale überführt worden waren, wurden die HEK-Zellen mit dem *CLEC16A*- und *ATG5*-Plasmiden transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit einem leerem pUGM-Plasmid behandelt wurden. 600 µl Serum-negatives Medium und 12 µl FUGENE je Petrischale wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 µg

Plasmid (für den ATG5-KD wurden je 0,5 µg *ATG5#2*- und *ATG5#7*-Plasmid verwendet) hinzugefügt und das Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde das Gemisch zu den sich in Serum-positiven Medium befindenden Zellen hinzugefügt.

2.1.3.13 Überprüfung der Transfektion

2 d nach der Transfektion wurde unmittelbar vor der weiteren Verwendung der HEK-Zellen der Erfolg der Transfektion überprüft. Hierzu wurde mit Fluoreszenz-Mikroskopie die Expression von GFP überprüft, da die erfolgreich transfizierten Plasmide GFP exprimieren. Die Transfektion wurde als erfolgreich eingestuft, wenn der überwiegende Teil der HEK-Zellen GFP exprimierte.

Tabelle 2 Material für Klonierung und Transfektion von HEK-Zellen

Material	Hersteller	Kennung
ssDNA von <i>CLEC16A</i>	Eurofin Operon	-
ssDNA von <i>ATG5#2</i> und <i>ATG5#7</i>	Eurofin Operon	-
Vorläufiger Primer (CAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGA GCG von 5' nach 3')	Eurofin Operon	-
Rückläufiger Primer (CTAAAGTAGCCCCTTGAATTCGAGGCAGTAGGCA von 5' nach 3')	Eurofin Operon	-
10 mmol/l dNTP	Fisher Scientific	FERR0193
DNA-Polymerase	Fisher Scientific	FEREP0713
Polymerase-Puffer	Fermentas	EP0713
Destilliertes Wasser	Joslin Diabetes Center	-
Thermocycler	Bio-Rad	T100
Nucleo Spin-Satz	Macherey-Nagel	REF 740609.250
Spektrophotometer	NanoDrop	ND-1000
Verdau-Puffer (mit Restriktionsenzymen geliefert)	-	-
Restriktionsenzym XhoI	Fisher Scientific	FERFD0694
Restriktionsenzym EcoRI	Fisher Scientific	FERFD0274

pUGM-Plasmid	Kissler Labor	-
Alkalische Phosphatase	Fisher Scientific	FEREF0651
Agarose	Fisher Scientific	BP160-500
TAE-Puffer (2 mol/l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 1 mol/l Acetat und 50 mmol/l EDTA)	Joslin Diabetes Center	-
Ethidiumbromid	Fisher Scientific	BP1302-10
1 kb DNA-Leiter	Fisher Scientific	FERSM0313
Low range DNA-Leiter	Fisher Scientific	FERSM1193
Spektrophotometer	Thermo Scientific	NanoDrop 1000
T4-Ligase	Fisher Scientific	FEREL0011
T4-Puffer	Fisher Scientific	FEREL0011
Bakterien für Transformation	Novablu	50-230-8570
Ampicillin	Fisher Scientific	BP1760-25
Agar-Platten	Joslin Diabetes Center	-
LB-Amp	Joslin Diabetes Center	-
P1-Puffer (50 mmol/l Tris-Cl pH 8,0; 10 mmol/l EDTA; 100 µg/ml RNase A)	Joslin Diabetes Center	-
P2-Puffer (200 mmol/l NaOH; 1 % SDS)	Joslin Diabetes Center	-
P3-Puffer (3 mol/l Kaliumacetat pH 5,0)	Joslin Diabetes Center	-
Isopropanol	Fisher Scientific	AC32727-2500
Sequenzierungs-Primer pUGMseq (GCATGGACGAGCTGTACAAG von 5' nach 3')	Eurofin Operon	-
Maxipräparation-Satz	Macherey-Nagel	REF 740426.50
FUGENE	Fisher Scientific	PR-E2692
Fluoreszenz-Mikroskop	Olympus	IX51

2.1.4 Initiierung und Inhibierung von Autophagie

Autophagie kann durch Mangelernährung initiiert bzw. durch Protease-Inhibitoren inhibiert werden, um so etwaige Unterschiede autophagischer Aktivität zwischen Zellproben zu amplifizieren (106). Das Medium der HEK-Zellkultur wurde dazu unter sterilen Bedingungen entfernt und die Zellkultur einmal mit 1 ml (pro Well einer 6-Well-Platte) bzw. mit 10 ml (pro Petrischale) DPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen, die einer Mangelernährung ausgesetzt werden sollten, für 4 h

mit 2 ml (6-Well-Platten) bzw. 10 ml HBSS inkubiert. Die Kontrollen wurden stattdessen mit 2 ml bzw. 10 ml Serum-positiven Medium inkubiert. Diejenigen Proben, die mit Proteaseinhibitoren behandelt werden sollten, wurden mit 10 µg/ml Pepstatin A in Serum-positivem Medium inkubiert.

Tabelle 3 Material für Initiierung und Inhibierung von Autophagie in HEK-Zellen

Material	Hersteller	Kennung
HBSS	Fisher Scientific	NC9251126
Pepstatin A	Sigma	P5318-5MG

2.2 Die NOD-Clec16a-KD-Maus

Die Tiere wurden gemäß den Tierschutzrichtlinien in der Einrichtung für Versuchsmäuse des Joslin Diabetes Center untergebracht. Voraussetzung der Experimente war ein positives Votum des Tierschutzkomitees.

2.2.1 Entnahme der Thymi

Die Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation getötet, auf dem Rücken aufgespannt und mit 70 % Ethanol abgesprüht. Mit einer Mikrodissektion-Schere wurde das ventrale Fell aufgeschnitten und ebenfalls aufgespannt. Der Rippenbogen wurde an den Seiten durchtrennt und von kaudal nach kranial aufgeklappt. Nach Demonstration des Thymus und Entfernung von Bindegewebe wurden beide Thymuslappen abschließend mit Pinzetten blutlos an der Wurzel abgetrennt und entnommen (Abb. 5A).

Tabelle 4 Material für Entnahme der Thymi

Material	Hersteller	Kennung
CO ₂	Joslin Diabetes Center	-
Ethanol	Fisher Scientific	BP2818-500
Mikrodissektion-Schere	Biomedical Research Instruments	25-2500
Pinzetten	Biomedical Research Instruments	10-1200

2.2.2 Isolierung von „TECs“- und „Thymozyten“-Zellgruppen

Der Thymus kann mit Hilfe eines Percoll-Gradienten in eine „TECs“-Zellgruppe und eine „Thymozyten“-Zellgruppe aufgeteilt werden. Nach Entnahme der Thymi und Entfernung von Bindegewebe wurden die Thymi unter sterilen Bedingungen mit Mikrodissektionsscheren zerkleinert und mit 5 µl Kollagenase/Dispase und 5 µl DNase in 490 µl RPMI pro Thymus behandelt. Die Suspension größerer Klumpen wurde dabei durch eine abgeschnittene P1000-Pipettenspitze unterstützt. Danach wurde das Zellgemisch für 30 min bei 37 °C erhitzt und alle 10 min mit einer Pasteurpipette zu einer Einzelzellsuspension gebracht. Nach Zugabe von 0,5 mol/l EDTA wurde die Lösung für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Die fertige Lösung wurde durch Schmutzfänger geführt und mit DPBS 2 % FBS gewaschen. Nach Abzentrifugation mit 1.400 rpm für 3 min bei 4 °C wurden die Zellen mit 4 ml Percoll-Lösung mit einer Dichte von 1,115 g/ml resuspendiert und in ein mit FBS beschichtetes Röhrchen überführt. In dieses in einem Winkel von 45 ° geneigte Röhrchen wurden daraufhin mit einer Pasteurpipette 2 ml Percoll-Lösung mit einer Dichte von 1,06 g/ml und etwa 1 ml DPBS vorsichtig pipettiert. Die unterschiedlichen Dichten wurden zuvor durch Verdünnung mit DPBS hergestellt. Der sich anschließende Zentrifugationsschritt mit 1.350 g für 30 min bei 4 °C ohne Bremse trennte die „TECs“-Zellgruppe und die „Thymozyten“-Zellgruppe auf (Abb. 5B und C). Die jeweiligen Zellgruppen wurden mit einer Pasteurpipette

aufgenommen, in DPBS 2 % FBS gewaschen und gezählt. Schließlich wurden die Zellen mit 1.400 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und mit DPBS 2 % FBS resuspendiert.

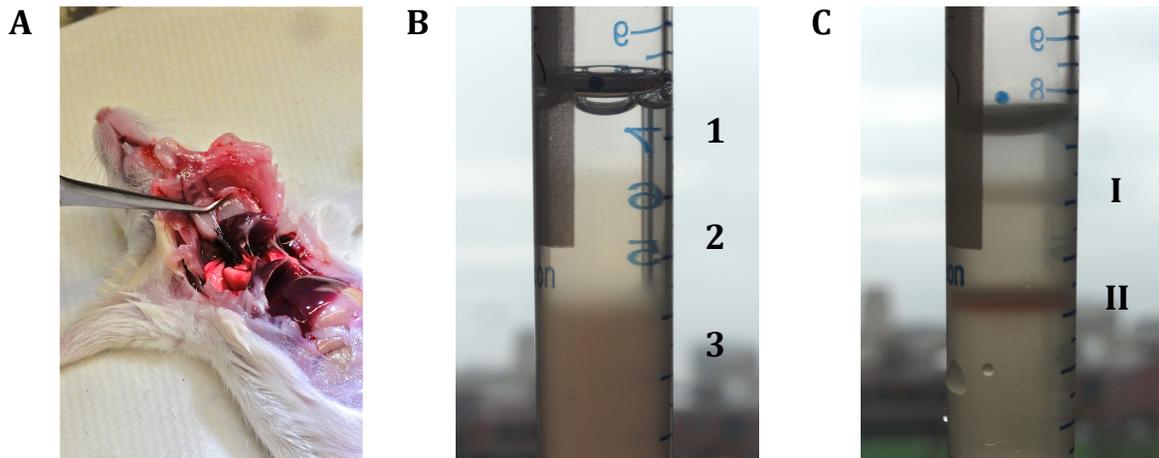


Abbildung 5 Thymektomie und Isolation von „TECs“ mit einem Percoll-Gradienten. Die Thymi wurden blutlos an der Wurzel abgetrennt (**A**) und verdaut. In einem 15 ml-Röhrchen wurde ein Percoll-Gradient angelegt (**B**). Die oberste Schicht hatte eine Dichte von 1 g/ml (1), die mittlere Schicht eine Dichte von 1,06 g/ml (2) und die unterste Schicht, in der sich die Thymus-Zellsuspension befindet, eine Dichte von 1,115 g/ml (3). Nach Zentrifugation (**C**) befand sich die „TECs“-Zellgruppe in der Interphase der beiden oberen Schichten (I), während sich in der Interphase der beiden unteren Schichten die „Thymozyten“-Zellgruppe befand (II).

Tabelle 5 Material für Isolierung der Thymusepithelzellen

Material	Hersteller	Kennung
Kollagenase/Dispase	Fisher Scientific	50-720-3377
DNase	Roche	10104159001
RPMI	Invitrogen	11835055
Pasteurpipette	Fisher Scientific	22-042-817
EDTA (0,5 mol/l pH 8,0)	Joslin Diabetes Center	-
FBS	Fisher Scientific	SH30396.03
Schmutzfänger	Fisher Scientific	22363548
Percoll-Lösung	Fisher Scientific	45-001-748

2.2.3 Charakterisierung der isolierten Zellgruppen mit Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein insbesondere in der Immunologie wertvolles Verfahren, um eine Population von Zellen hinsichtlich bestimmter Eigenschaften zu untersuchen und gegebenenfalls aufzutrennen. Die Zellen passieren dabei einzeln einen Lichtstrahl. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter) geben Auskunft über Volumen und strukturelle Beschaffenheit der Zellen. Dadurch identifizierte Unterpopulationen können weiterhin durch Fluoreszenzmessungen aufgeteilt werden. Durch direkt bindende Farbstoffe oder durch an Antikörper gebundene Farbstoffe können so weitere Aussagen über Eigenschaften der untersuchten Zellen getroffen werden.

2.2.3.1 Vorbereitung der Zellen

Die isolierten Zellgruppen wurden mit 1.400 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und mit 50 µl DPBS/2 % FBS/1 % FC-Block resuspendiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Für die Färbung mit Primärantikörpern wurden die Zellgruppen in Untergruppen aufgeteilt, wobei jede Untergruppe mindestens 100.000 Zellen in 50 µl DPBS 2 % FBS enthielt. Eine Untergruppe aus der KD-Thymozyten-Zellgruppe wurde für die GFP-Kompensation und sechs Untergruppen aus der WT-Thymozyten-Zellgruppe für die folgenden Kompensationen verwendet: Ungefärbt, CD4 mit PB (Verdünnung 1:2.000), Ly51 mit PE (Verdünnung 1:800), EpCAM mit PE-Cy7 (Verdünnung 1:800), CD45 mit APC (Verdünnung 1:3.000) und CD11c mit APC-Cy7 (Verdünnung 1:200). Jeweils eine Untergruppe der WT-TEC-Zellgruppe, der KD-TEC-Zellgruppe, der WT-Thymozyten-Zellgruppe und der KD-Thymozyten-Zellgruppe wurden für die eigentlichen Messungen mit den bei der Kompensation genannten Antikörpern (und mit den genannten Verdünnungen) für 30 min bei 4 °C gefärbt. Schließlich wurden die Untergruppen mit 1.400 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und in 500 µl DPBS 2 % FBS resuspendiert.

2.2.3.2 Durchführung der Durchflusszytometrie und Auswertung

Die Durchflusszytometrie wurde an einem MACSQuant-Analyzer durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo.

Tabelle 6 Material für Durchflusszytometrie

Material	Hersteller	Kennung
FC-Block	Biolegend	101321
CD4/PB-Antikörper	Biolegend	100428
Ly51/PE-Antikörper	Biolegend	108307
EpCAM/PE-Cy7-Antikörper	Biolegend	118215
CD45/APC-Antikörper	Biolegend	103111
CD11c/APC-Cy7-Antikörper	Biolegend	117324
MACSQuant-Analyzer	Miltenyi Biotec	-
FlowJo	Tree Star Inc.	Version 9.5.2

2.3 Nachweis von Autophagie

2.3.1 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie wurde bereits beschrieben.

2.3.1.1 Vorbereitung der Zellen

Die verwendeten HEK-Zellen wurden zweimal mit 1.400 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und mit DPBS resuspendiert. Danach wurden sie mit 6,25 µmol/l bzw. 12,5 µmol/l MDC in DPBS für 10 min bei 4 °C inkubiert, mit 1.400 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und in 500 µl DPBS 1 % FBS resuspendiert.

2.3.1.2 Durchführung der Durchflusszytometrie und Auswertung

Die Durchflusszytometrie wurde an einem MACSQuant-Analyzer durchgeführt. Die

HEK-Zellpopulation wurde im FSC-Kanal bei 216 V und im SSC-Kanal bei 332 V identifiziert. Die Fluoreszenz von MDC der HEK-Zellpopulation wurde im AmCyan-Kanal (Violet Blue) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo.

Tabelle 7 Material für Durchflusszytometrie

Material	Hersteller	Kennung
MDC	Sigma-Aldrich	30432-100mg

2.3.2 Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie können Antigene in fixierten Gewebeschichten sichtbar gemacht werden. Ein Mäusethymus wurde eingefroren, in Scheiben geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. Ein primärer Antikörper band an das Zielantigen und wurde durch einen fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Zielantigene waren Keratin 8 (im Folgenden „K8“) für die Darstellung von cTECs, Ulex Europaeus Agglutinin-1 (im Folgenden „UEA-1“) für die Darstellung von mTECs, sowie LC3 und p62 für die Darstellung von Autophagosomen. Die Betrachtung des Gewebeschnitts mit einem Fluoreszenz-Mikroskop erlaubte so die Beurteilung, inwiefern Autophagosomen mit cTECs oder mTECs kolokalisieren. Abschließend wurden die Bilder am Computer quantitativ ausgewertet.

2.3.2.1 Kryokonservierung

Unmittelbar nach Tötung der Maus wurde der Thymus entnommen und sofort in eine mit OCT beschichteten Gussform gelegt. Die Gussform wurde bis zum Rand mit OCT aufgefüllt und auf Trockeneis gefroren.

2.3.2.2 Gewebsschnitte

Mit einem Kryotom wurde der Thymus in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und

jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger überführt. Nach Trocknung für 30 min wurden die Schnitte bei -20 °C aufbewahrt, wenn sie nicht direkt weiter verwendet wurden.

2.3.2.3 Fixierung und Antikörperfärbung

Die Schnitte wurden für 5 min in -20 °C kaltem Aceton fixiert und zweimal für 5 min in PBS-T gewaschen. Die Gewebeproben wurden mit einem wasserabweisenden Stift umkreist, so dass bei den folgenden Inkubationsschritten jede Probe einem Inkubationsvolumen von 50 µl (1 % BSA und 10 % Ziegen Serum) ausgesetzt werden konnte. Jeder Inkubationsschritt fand in einer dunklen, feuchten Inkubationskammer statt. Mit einem Block-Puffer (mit zusätzlichen 0,1 % Tween) wurden zunächst unspezifische Antigene für 30 min blockiert. Die Zielantigene wurden danach für 1 h mit Primärantikörpern inkubiert. Diese waren gegen mTECs (mit Biotin konjugierter Anti-UEA-1-Antikörper, Verdünnung 1:1.000), cTECs (Hühnchen Anti-K8-Antikörper, Verdünnung 1:200) und Autophagosomen (Kaninchen Anti-LC3-Antikörper, Verdünnung 1:300) gerichtet. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten mit PBS-T wurden die Proben für 45 min mit Sekundärantikörpern inkubiert. Diese waren gegen UEA-1 (Streptavidin Alexa Fluor 594, Verdünnung 1:10.000), K8 (Ziege Anti-Hühnchen Alexa Fluor 594, Verdünnung 1:1.000) und LC3 (Ziege Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488, Verdünnung 1:200) gerichtet. Schließlich wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit PBS-T und einmal mit destilliertem Wasser im Dunkeln gewaschen. Überschüssiges Wasser wurde durch Klopfen der Objektträgerseite auf einem sauberen, trockenen Tuch entfernt, die Gewebeproben mit einem Tropfen Eindeckmedium ein- und mit einem Deckglas zugedeckt. Die Objektträger wurden für 10 min im Dunkeln getrocknet und direkt weiter verwendet oder bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.2.4 Fluoreszenz-Mikroskopie und Auswertung

Bilder der Schnitte wurden mit einer 20- und 40-fachen Vergrößerung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop und der Software Spot Advanced aufgenommen. Um eine Verzerrung durch das aufnehmende Subjekt zu vermeiden, wurden stets erst Bilder im TEC-Kanal und danach mit dem gleichen Fokus Bilder im Autophagosomen-Kanal aufgenommen. Die Bilder der einzelnen Farben wurden mit standardisierten Belichtungseinstellungen aufgenommen. Die quantitative Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ64. Die Farbbalance des grünen Kanals wurde auf 0-150 eingestellt, damit die Erkennung auch kleiner Autophagosomen gewährleistet war. Im zusammengeführten Bild mit roter und grüner Farbkanal-Darstellung wurden die mit TECs kolokalisierenden Autophagosomen von Hand und durch die Software ImageJ64 gezählt. Beim Zählen durch die Software wurden lediglich die Autophagosomen gezählt, die eine Größe von 3-50 Pixeln² aufwiesen. Darüber hinaus wurde die durchschnittliche Querschnittsfläche der Autophagosomen mit einer Größe von 3-50 Pixeln² berechnet.

Tabelle 8 Material für Immunhistochemie

Material	Hersteller	Kennung
OCT	Fisher Scientific	1437365
Gussform	VWR LabShop	25608916
Kryotom	Fisher Scientific	Microm HM 550
Objektträger	Fisher Scientific	12550101
Aceton	Fisher Scientific	A18-1
PBS	Joslin Diabetes Center	-
Triton X-100	Fisher Scientific	AC32737-2500
Wasserabweisender Stift	Fisher Scientific	00-8877
BSA	Fisher Scientific	BP1600-100
Ziegen Serum	Invitrogen	50-062Z
Kaninchen Anti-LC3-Antikörper	Fisher Scientific	PA1-16931
Biotin konjugierter Anti-UEA-1-Antikörper	Genetex	GTX01511

Hühnchen Anti-K8-Antikörper	Abcam	ab14053
Ziege Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11070
Streptavidin Alexa Fluor 594 Konjugat	Invitrogen	S-11227
Ziege Anti-Hühnchen Alexa Fluor 594	Invitrogen	A-11042
Eindeckmedium	Electron Microscopy Science	18006
Deckgläser	Fisher Scientific	12-540A
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss	Axioplan 2 imaging
Mikroskop-Kamera	Zeiss	MC 80 DX
Spot Advanced	Diagnostic Instruments	Version 4.7
ImageJ64	Wayne Rasband, NIH, USA	Version 10.2

2.3.3 Immunzytochemie

Immunzytochemische Untersuchungen ermöglichen die Visualisierung von Antigenen in einzelnen Zellen einer Zellkultur. Eine Population von HEK-Zellen wuchs auf einem Deckglas und wurde anschließend fixiert und geblockt. Ein Primärantikörper band an das Zielantigen und wurde durch einen fluoreszierenden Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Zielantigene waren LC3 und p62. Die Betrachtung der HEK-Zellen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop erlaubte so die Beurteilung ihrer autophagischen Aktivität.

2.3.3.1 Zellwachstum auf Deckgläsern

Die Deckgläser wurden in 70 % Ethanol gereinigt, jeweils ein Deckglas wurde in eine Well einer 6-Well-Platte gelegt. Jeweils 150.000 Zellen wurden anschließend in 2 ml Serum-positives Medium überführt und für 3 d bei 37 °C inkubiert.

2.3.3.2 Fixierung und Antikörperfärbung

Nach 2 d Inkubation wiesen die Zellen eine Konfluenz von 60-80 % auf. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS für 2 min vorsichtig gewaschen und mit je 2 ml 4 % Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei Waschzyklen mit 1 ml PBS für jeweils 2 min wurden die Zellen auf den Deckgläsern für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und permeabilisiert (mit je 75 µl PBS mit 10 % FBS und 0,1 % Triton X-100). Direkt anschließend wurden die Zellen mit einem primärem Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die gegen LC3 und gegen p62 gerichteten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:600 (wie alle Antikörper in PBS mit 10 % FBS) verwendet. Nach drei Waschzyklen mit 1 ml PBS für 5 min wurden die Zellen im Dunkeln mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Der anti-Kaninchen Alexa Fluor 488-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. In den letzten 5 min der Sekundärantikörper-Inkubation wurden die Zellkerne zusätzlich mit dem Farbstoff DAPI angefärbt. Nach drei Waschzyklen im Dunkeln mit PBS für jeweils 5 min wurden die Objektträger mit einem Tropfen Eindeckmedium versehen und die Deckgläser aus den Näpfen entfernt, auf einem sauberen Tuch kurz abgetropft und mit den Zellen nach unten zeigend auf die Objektträger gelegt. Etwaige Luftblasen wurden durch leichten Druck entfernt. Die Objektträger wurden für 10 min im Dunkeln getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt, wenn sie nicht direkt weiter verwendet wurden.

2.3.3.3 Fluoreszenz-Mikroskopie und Auswertung

Bilder der Schnitte wurden mit einer vierzigfachen Vergrößerung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop und der Software Spot Advanced aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software ImageJ64.

Tabelle 9 Material für Immunzytochemie

Material	Hersteller	Kennung
4 % Formaldehyd	Fisher Scientific	NC9942547
DAPI	Sigma-Aldrich	D9542-1MG
Eindeckmedium	Fisher Scientific	NC9265087

2.3.4 Immunoblot

Der Immunoblot ist eine geeignete Methode, mit der die Menge eines bestimmten zellulären Proteins unter verschiedenen Bedingungen verglichen werden kann. Die Zellen wurden dafür lysiert und gleiche Mengen Gesamtprotein auf ein Gel geladen. Unter Anlage elektrischer Spannung wurden die negativ geladenen Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht getrennt und danach auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Anschließend wurden an das Zielantigen Primärantikörper, und an die Primärantikörper Sekundärantikörper gebunden. Letztere trugen ein Reporterenzym. Das Reporterenzym setzte ein Farbstoffsubstrat um, das dann auf Autoradiographie-Filmen durch Chemielumineszenz sichtbar gemacht werden konnte.

2.3.4.1 Vorbereitung der Zellysate

Die jeweils verwendeten Zellen wurden mit 1.400 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und im Volumenverhältnis von 1:1 für 30 min bei 4 °C mit Lyse-Puffer lysiert. Der Lyse-Puffer bestand aus 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 2 % Triton X-100, Protease-Inhibitoren und Wasser. Danach wurde Zelldebris mit 16.000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Die Proteinkonzentration wurde durch die Mischung von 10 µl Proteinüberstand und 150 µl Reagenz des Pierce 660 nm Protein Assay mit dem Synergy Mx Microplate Reader gemessen und gegenüber 150 µl Reagenz genormt. Die Proteinkonzentration wurde schließlich anhand der BSA-Standardkurve für die Absorption bei 660 nm

ermittelt. Volumenäquivalente der gleichen Proteinmenge wurden mit Lyse-Puffer (ohne Protease-Inhibitoren) aufgefüllt und mit Laemmli-Puffer im Verhältnis von 1:3 gemischt. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 100 °C gekocht und kurz auf Eis wieder abgekühlt.

2.3.4.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde mit einem 12 % Trenngel durchgeführt, das folgendermaßen hergestellt wurde: 15 ml 30 % Acrylamid, 7,5 ml 1.5 mol/l Tris-HCl pH 8,8, 300 µl 10 % SDS (10 % SDS in destilliertem Wasser) und 7,2 ml destilliertes Wasser wurden in einem Reagiergefäß gemischt. Kurz vor der Auftragung des Gels wurden 150 µl frisch zubereitetes 10 % APS (in destilliertem Wasser) und 20 µl TEMED hinzugefügt und das Gel mit dem mini-PROTEAN Tetra Cell System in einem 15-Well-System mit 1,5 mm Spacer Plates aufgetragen. Der obere Rand der noch flüssigen Gele wurde mit jeweils 500 µl Isopropanol begradigt. Innerhalb von 30 min verfestigte sich das Gel. Der Alkohol wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen und die Spacer mit dem Sammelgel aufgefüllt. Das Sammelgel wurde zuvor folgendermaßen hergestellt: 660 µl 30 % Acrylamid, 1,26 ml 0,5 mol/l Tris-HCl pH 6,8, 50 µl 10 % SDS, 3 ml destilliertes Wasser, dazu dann 25 µl 10 % APS und 5 µl TEMED. Direkt nach dem Auftragen des Sammelgels wurden abschließend 1,5 mm dicke 15-Well-Kämme am oberen Rand des Spacers angebracht. Das Sammelgel verfestigte sich innerhalb von 30 min. Das fertige Gel wurde, insofern es nicht sofort verwendet wurde, bei 4 °C feucht gelagert und innerhalb von 7 d verbraucht. Das Gel wurde für die Auftrennung der Proteine mit einem Volumen von 25 µl beladen, das einer für alle Zellproben konsistenten Proteingesamtmenge von 10-35 µg entsprach. Zudem wurden 5 µl Proteinstandard geladen, um die getrennten Proteine einem Molekulargewicht zuordnen zu können. Die eigentliche Auftrennung der Proteine geschah im mini-PROTEAN Tetra Cell System unter einer Spannung von 100 V für 90 min (PowerPac Basic Power Supply) mit bis zur Markierung aufgefülltem Elektrophorese-Puffer.

2.3.4.3 Western Blot

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran geschah mit Hilfe der mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer-Cell. Das Gel-Sandwich wurde dafür in einer mit 4 °C kaltem Blot-Puffer gefüllten Schale folgendermaßen zubereitet (von der schwarzen Kathode zur roten Anode der Gel-Haltekassette): Faserkissen, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Faserkissen. Die Transferzelle wurde schließlich mit dem Gel-Sandwich, einer Kälteeinheit und Blot-Puffer beladen und bei 4 °C für 60 min unter eine Spannung von 100 V gesetzt.

2.3.4.4 Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran zurechtgeschnitten und mit PBS-T 5 % Milch (PBS mit 1 % Tween und 5 % Milchpulver) für 1 h bei Raumtemperatur mit einer Schauelfrequenz von 40 Hz geblockt. Nach einem Waschschriff mit PBS-T für 5 min unter Schaukeln mit einer Schauelfrequenz von 100 Hz wurde die Membran über Nacht bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper unter Schaukeln mit einer Schauelfrequenz von 40 Hz inkubiert. Ein Aktin-Antikörper diente in der Verdünnung von 1:1.000 in PBS-T als Proteinstandard. Als Autophagie-Marker wurden jeweils in der Verdünnung von 1:1.000 in PBS-T ein LC3-Antikörper und ein p62-Antikörper verwendet. Nachdem die Membran dreimal für jeweils 10 min mit PBS-T unter Schaukeln mit einer Schauelfrequenz von 100 Hz gewaschen wurde, wurde sie für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (für die Autophagie-Marker mit einem Kaninchen-Antikörper und für den Aktin-Antikörper mit einem Maus-Antikörper, jeweils in einer Verdünnung von 1:5.000 in PBS-T) unter Schaukeln mit einer Schauelfrequenz von 40 Hz inkubiert. An die Sekundärantikörper war eine Meerrettichperoxidase als Reporterenzym angehängt. Daraufhin wurde die Membran noch dreimal für jeweils 15 min unter Schaukeln mit einer Schauelfrequenz von 100 Hz gewaschen und auf eine glatte Oberfläche gelegt. Dort wurden pro Membran etwa 1,5 ml 1:1-Gemisch des Farbstoffsubstrats der

Meerretichperoxidase aufgetragen und für 1 min inkubiert. Die Membran wurde danach zwischen zwei Plastikfolien in eine Autoradiographie-Kassette gelegt und jegliche Luftblasen entfernt. Anschließend wurde in einer Dunkelkammer ein Autoradiographie-Film in die Kassette eingespannt und der Film ausreichend lange belichtet, typischerweise etwa 30 sek für Aktin und 10 min für LC3 und p62. Nach der Belichtung wurde der Film entwickelt.

2.3.4.5 Quantifizierung

Die Filme wurden eingescannt (16 bit-Graustufe und 600 dpi) und mit Hilfe der Software ImageJ64 quantifiziert und mit Prism dargestellt.

Tabelle 10 Material für Immunoblot

Material	Hersteller	Kennung
Tris-HCl pH 7,5	Boston BioProducts	BBT-75
NaCl	Fisher Scientific	BP328-500
Protease Inhibitoren (eine Tablette/10 ml)	Roche	REF05892791001
Pre-Diluted Protein Assay Standards; BSA Set	Fisher Scientific	23208
Pierce 660 nm Protein Assay	Fisher Scientific	PI-22660
Synergy Mx Microplate Reader	Biotek	-
Laemmli-Puffer	Boston BioProducts	BP110R-5
30 % Acrylamid	Bio-Rad	1610158
1,5 mol/l Tris-HCL pH 8,8	Bio-Rad	1610798
10 % SDS	USB/Affymetrix	75819
APS	Bio-Rad	1610700
TEMED	Bio-Rad	1610801
mini-PROTEAN Tetra Cell System	Bio-Rad	1658001
1,5 mm Spacer Plates	Bio-Rad	1658021
0,5 mol/l Tris-HCL pH 6,8	Bio-Rad	1610799
1,5 mm dicke 15-Well-Kämme	Bio-Rad	1658022
Proteinstandard für SDS-PAGE	Bio-Rad	350000506
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad	1645050
Elektrophorese-Puffer	Joslin Diabetes Center	-

Nitrozellulose-Membran	Bio-Rad	1620112
mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad	1703930
Blot-Puffer	Joslin Diabetes Center	-
Tween	Fisher Scientific	BP337-100
Milchpulver	Fisher Scientific	NC9121673
BioRocker	Denville Scientific	110A
Aktin-Antikörper	Sigma-Aldrich	A3853
Peroxidase-gebundener Anti-Kaninchen-Antikörper	Fisher Scientific	45-000-682
Peroxidase-gebundener Anti-Maus-Antikörper	Fisher Scientific	45-000-679
Meerretichperoxidase-Farbstoffsubstrat	Fisher Scientific	PI-32209
Autoradiographie-Kassette	Fisher Scientific	FBVC810
Autoradiographie-Film	Denville Scientific	E3218
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Konica minolta	SRX-101A
Scanner	EPSON	Perfection 2580 PHOTO

2.4 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung fanden mit der Software Prism statt. Bei Auswertungen wurden – wenn nicht anders angegeben – aufgrund von einer angenommenen Normalverteilung und einer Unabhängigkeit der Stichproben zweiseitige p-Werte mit ungepaarten t-Tests ermittelt. Trotz der kleinen Stichproben wurde damit ein parametrischer Test angewandt. Der nicht-parametrische Test zum Vergleich zweier ungepaarter Stichproben ist für kleine Stichproben zwar besser geeignet, da hierfür die Stichproben nicht normalverteilt sein müssen, benötigt aber einen Mindeststichprobenumfang von $n = 4$ in jeder Stichprobe, um signifikant ausfallen zu können. Da dieser Mindeststichprobenumfang durch die in dieser Arbeit verwendeten Stichproben oft nicht erreicht wurde, wurde stattdessen ein parametrischer Test verwendet. So bestand bei jeder statistischen Prüfung die Möglichkeit eines signifikanten Ergebnisses. Der Einheitlichkeit halber

wurde auch bei Experimenten, die den Mindeststichprobenumfang von $n = 4$ knapp überschritten, ein parametrischer Test verwendet.

Sterne über Fehlerbalken in Graphen entsprechen folgenden p-Werten:

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Alle Werte wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die in den Graphen dargestellten Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

Tabelle 11 Material für statistische Auswertung und graphische Darstellung

Material	Hersteller	Kennung
Prism	GraphPad Software	Version 5.0d

3. Ergebnisse

Der Ergebnis-Abschnitt gliedert sich in zwei Teile: In vitro-Befunde aus der HEK-Zelllinie und in vivo-Befunde aus der NOD-Maus. Die verwendeten Autophagie-Marker wurden in Kapitel 2.3 vorgestellt.

3.1 HEK-Zelllinie

Im Folgenden werden die in vitro-Befunde der HEK-Zelllinie vorgestellt. Diese umfassen die Darstellung und Manipulation von Autophagie in HEK-Zellen sowie die Untersuchung von CLEC16A-KD-HEK-Zellen im Vergleich zu Kontroll- und ATG5-KD-HEK-Zellen. Eine Beschreibung der Erstellung des KD befindet sich in Kapitel 2.1.3.

3.1.1 Autophagie in HEK-Zellen

Um zunächst morphologisch zu überprüfen, ob Autophagie in vollernährten HEK-Zellen dargestellt werden kann, wurden Autophagosomen in HEK-Zellen immunzytochemisch mit LC3- und p62-Antikörpern gefärbt. Abb. 6A zeigt mit p62 angefärbte Autophagosomen von HEK-Zellen im vollernährten Zustand. Immunzytochemische Untersuchungen mit LC3 zeigten eine ähnliche Anfärbung von Autophagosomen (Daten hier nicht gezeigt). Um ferner die Auslösung von Autophagie zu testen, wurden HEK-Zellen mangelernährt und mit vollernährten HEK-Zellen verglichen (106). Abb. 6B zeigt die Fluoreszenz des Autophagie-Markers MDC in der Durchflusszytometrie von HEK-Zellen, die vollernährt bzw. für 2, 4 oder 6 h mangelernährt worden waren. Der Anschaulichkeit halber wurden in Abb. 6B alle mangelernährten Zellen unabhängig von der Dauer der Mangelernährung zusammengefasst. Die unterschiedlich lang mangelernährten Zellen zeigten nur eine geringe Varianz in Bezug auf die MDC-Fluoreszenz. Die Dauer der Mangelernährung wurde daher für weitere Experimente auf 4 h festgesetzt. Der Versuch wurde bei

ungefärbten Zellen und bei Zellen durchgeführt, die mit einer Konzentration von 6,25 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 12,5 $\mu\text{mol/l}$ MDC gefärbt worden waren. Mangelernährte HEK-Zellen wiesen unabhängig von der verwendeten Konzentration mehr MDC als vollernährte Zellen auf (Abb. 6B, $p = 0,001$ in der zweifachen Varianzanalyse).

Da die Färbung mit MDC einen einfachen, aber nicht ausreichend spezifischen Nachweis von Autophagie darstellt, wurden per Immunoblot die Proteinmengen der Autophagie-Marker LC3 und p62 gemessen. Um zusätzlich die Auslösung von Autophagie durch Mangelernährung und die Manipulation durch Protease-Inhibitoren zu prüfen, wurden voll- und mangelernährte HEK-Zellen bzw. vollernährte HEK-Zellen ohne und mit Behandlung durch Protease-Inhibitoren getestet. Wie in Abb. 6C zu sehen ist, wiesen ansonsten unbehandelte HEK-Zellen unter Mangelernährung weniger LC3-I und mehr LC3-II auf. Unter der Behandlung mit Protease-Inhibitoren stiegen beide Marker in vollernährten HEK-Zellen an. Darüber hinaus wiesen mangelernährte HEK-Zellen weniger p62 als vollernährte HEK-Zellen auf, während die Behandlung mit Protease-Inhibitoren zu einem Anstieg von p62 führte.

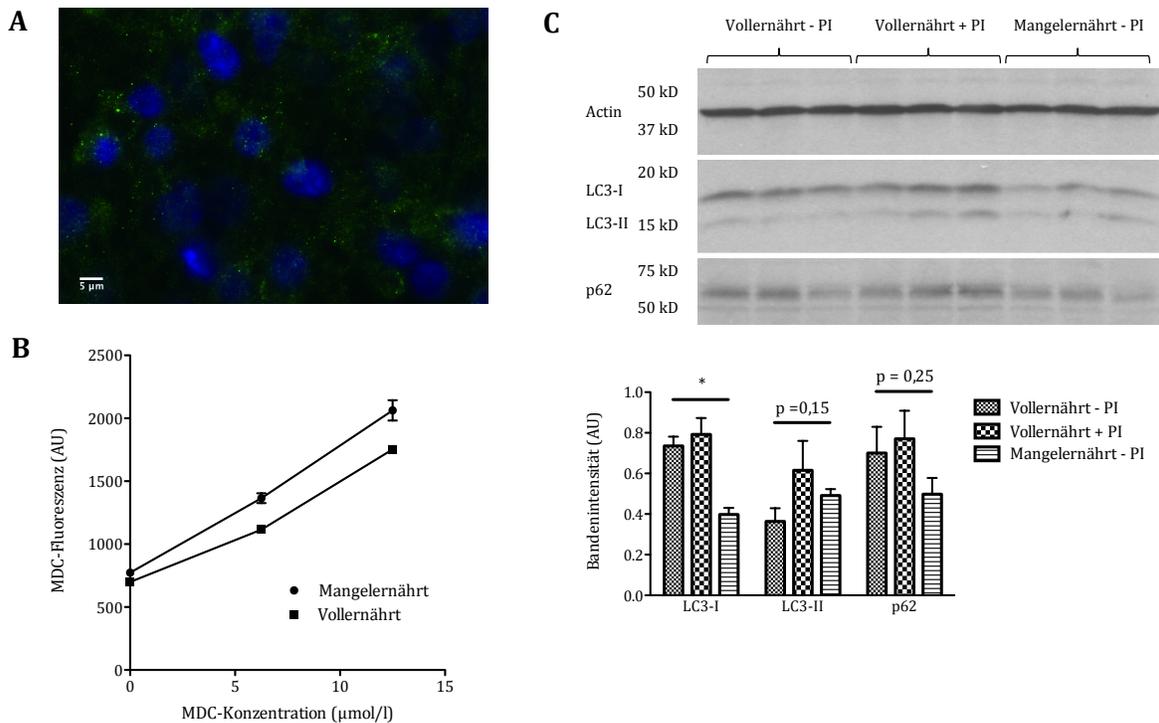


Abbildung 6 Darstellung und Manipulation von Autophagie in HEK-Zellen. **A:** Immunocytochemische Anfärbung von Autophagosomen (p62-gefärbte Autophagosomen, grün) in HEK-Zellen (DAPI-gefärbte Zellkerne, blau). **B:** Durchflusszytometrische Messung von MDC in vollernährten und mangelernährten HEK-Zellen (n = 1 Petrischale bei vollernährten, n = 3 Petrischalen bei mangelernährten Zellen). **C:** Mit Aktin genormte Quantifizierung eines Immunoblots von HEK-Zellen, die vollernährt oder mangelernährt bzw. ohne Protease-Inhibitoren (- PI) oder mit Protease-Inhibitoren (+ PI) behandelt worden sind und danach auf LC3-I-, LC3-II- sowie p62-Proteinmengen getestet wurden (jeweils n = 3 Petrischalen).

Zusammenfassend zeigte der Immunoblot-Versuch von HEK-Zellen, dass unter Mangelernährung LC3-I und p62 abfielen und LC3-II anstieg, sowie dass unter Behandlung mit Protease-Inhibitoren eine Erhöhung aller Marker beobachtet wurde. Wegen der für eine Evaluation unangemessen hohen Streuung der Daten mit Protease-Inhibitoren wurden im Folgenden das Verhältnis von LC3-II und LC3-I sowie die Zellspiegel von p62 unter Voll- und Mangelernährung als Autophagie-Marker verwendet.

3.1.2 Autophagie in CLEC16A-KD-HEK-Zellen

Nachdem etabliert worden war, wie Autophagie nachgewiesen werden kann, wurde untersucht, ob Autophagie in HEK-Zellen verändert ist, in denen CLEC16A per RNAi ausgeschaltet worden war. Um dies zu erreichen, wurden HEK-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die die genetische Zielsequenz der entsprechenden shRNA enthielten (Kapitel 2.1). Für den KD von CLEC16A wurde eine genetische Zielsequenz verwendet, bei der die Arbeitsgruppe Kissler eine KD-Effektivität von etwa 80 % zeigen konnte (78). Für eine Positivkontrolle wurden Plasmide mit zwei verschiedenen *ATG5*-Sequenzen verwendet, mit denen *ATG5* ausgeschaltet wurde (118). Für eine Negativkontrolle wurden HEK-Zellen mit einem leeren Kontrollplasmid transfiziert. Alle Plasmide enthielten auch eine GFP-Sequenz und sollten daher nach erfolgreicher Transfektion GFP exprimieren. Abb. 7 zeigt die GFP-exprimierenden und damit erfolgreich transfizierten HEK-Zellen.

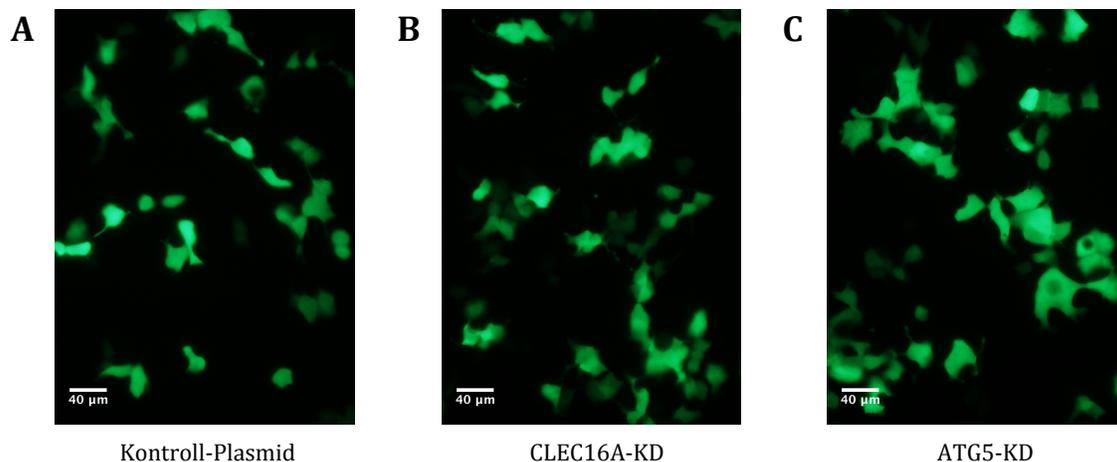


Abbildung 7 Transfektion von HEK-Zellen. **A-C:** Repräsentative, 20-fach vergrößerte Aufnahme von GFP-exprimierenden HEK-Zellen, die zuvor mit einem leeren Kontrollplasmid (**A**), einem *CLEC16A*-Plasmid (**B**) oder zwei *ATG5*-Plasmiden (**C**) behandelt worden waren.

Die CLEC16A- bzw. ATG5-KD-HEK-Zellen sowie die Kontrollplasmid-HEK-Zellen wurden anschließend voll- oder mangelernährt und einer Immunoblot-Untersuchung der Proteinmenge an LC3-I, LC3-II und p62 unterzogen.

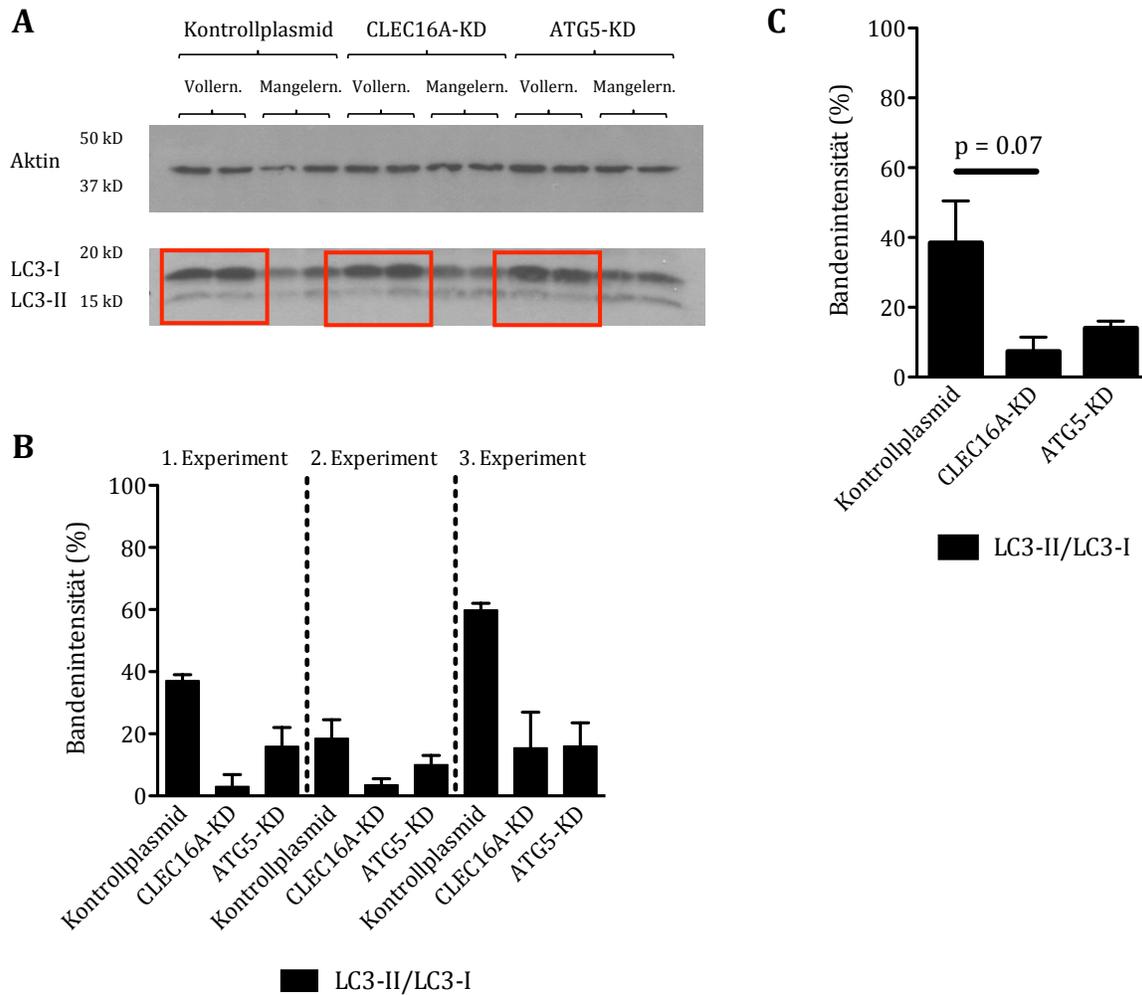


Abbildung 8 Immunoblot von LC3-I und LC3-II in voll- oder mangelernährten HEK-Zellen, die mit einem Kontrollplasmid oder mit Plasmiden für einen *CLEC16A*- oder *ATG5*-KD transfiziert worden waren. **A:** *CLEC16A*- und *ATG5*-KD-HEK-Zellen wiesen in vollernährten Proben weniger LC3-II auf als Kontrollplasmid-HEK-Zellen, während die Menge an LC3-I konstant war. **B:** In drei unabhängigen Experimenten konnte dieser Trend quantitativ bestätigt werden. Vollernährte HEK-Zellen mit einem KD für *CLEC16A* oder *ATG5* zeigten ein kleineres Verhältnis von LC3-II zu LC3-I (jeweils $n = 2$ Petrischalen). **C:** Zusammenfassung der drei Einzelexperimente ($n = 3$ Experimente).

Abb. 8 zeigt den Immunoblot von LC3-I und LC3-II. *CLEC16A*- und *ATG5*-KD-HEK-Zellen wiesen in vollernährten Proben weniger LC3-II auf als Kontrollplasmid-HEK-Zellen, während die Menge an LC3-I konstant war. Bei der Quantifizierung des Immunoblots (Abb. 8B und 8C) konnte somit das Verhältnis von LC3-II zu LC3-I als

Maß für die Prozessierung von zytosolischem LC3-I zu LC3-II in Autophagosomen-Membranen verwendet werden (Kapitel 1.2.3.2). Die LC3-Daten der mangelernährten Proben waren nicht verwertbar (Kapitel 4.2). Abb. 8C zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten in vollernährten HEK-Zellen (Abb. 8A und 8B). Sowohl die CLEC16A-, als auch die ATG5-KD-HEK-Zellen zeigten ein kleineres Verhältnis von LC3-II zu LC3-I als die Kontrollplasmid-HEK-Zellen. Der Unterschied an LC3-II/LC3-I zwischen Kontrollplasmid-HEK-Zellen und CLEC16A-KD-HEK-Zellen erreichte dabei knapp keine statistische Signifikanz ($p = 0,07$). Der Unterschied an LC3-II/LC3-I zwischen Kontrollplasmid-HEK-Zellen und ATG5-KD-HEK-Zellen erreichte ebenfalls knapp keine statistische Signifikanz ($p = 0,11$). Die Einzeldarstellung der drei unabhängigen Experimente zeigte jedoch jeweils die gleiche Tendenz (Abb. 8B): CLEC16A-KD-HEK-Zellen wiesen – ähnlich wie ATG5-KD-HEK-Zellen – weniger LC3-II im Verhältnis zu LC3-I als Kontrollplasmid-HEK-Zellen auf.

Der Immunoblot von p62 der selben HEK-Zellen zeigte mehr p62 in CLEC16A-KD-HEK-Zellen und ATG5-KD-HEK-Zellen nach Mangelernährung im Vergleich mit Kontrollplasmid-HEK-Zellen (Abb. 9). Aus der Zusammenfassung der Einzelexperimente ist zu sehen (Abb. 9C), dass das Verhältnis von p62 in mangelernährten zu p62 in vollernährten HEK-Zellen in CLEC16A-KD-HEK-Zellen größer ist als in der Kontrolle. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,18$), entsprach aber wiederum dem Vergleich von ATG5-KD-HEK-Zellen und der Kontrolle ($p = 0,05$). Darüber hinaus zeigte die Einzeldarstellung der drei unabhängigen Experimenten abgesehen von einer Ausnahme (p62 in CLEC16A-KD-HEK-Zellen im zweiten Experiment) die gleiche Tendenz (Abb. 9B). Insgesamt fand sich damit in CLEC16A-KD-HEK-Zellen – ähnlich wie in ATG5-KD-HEK-Zellen – mehr p62 als in Kontrollplasmid-HEK-Zellen.

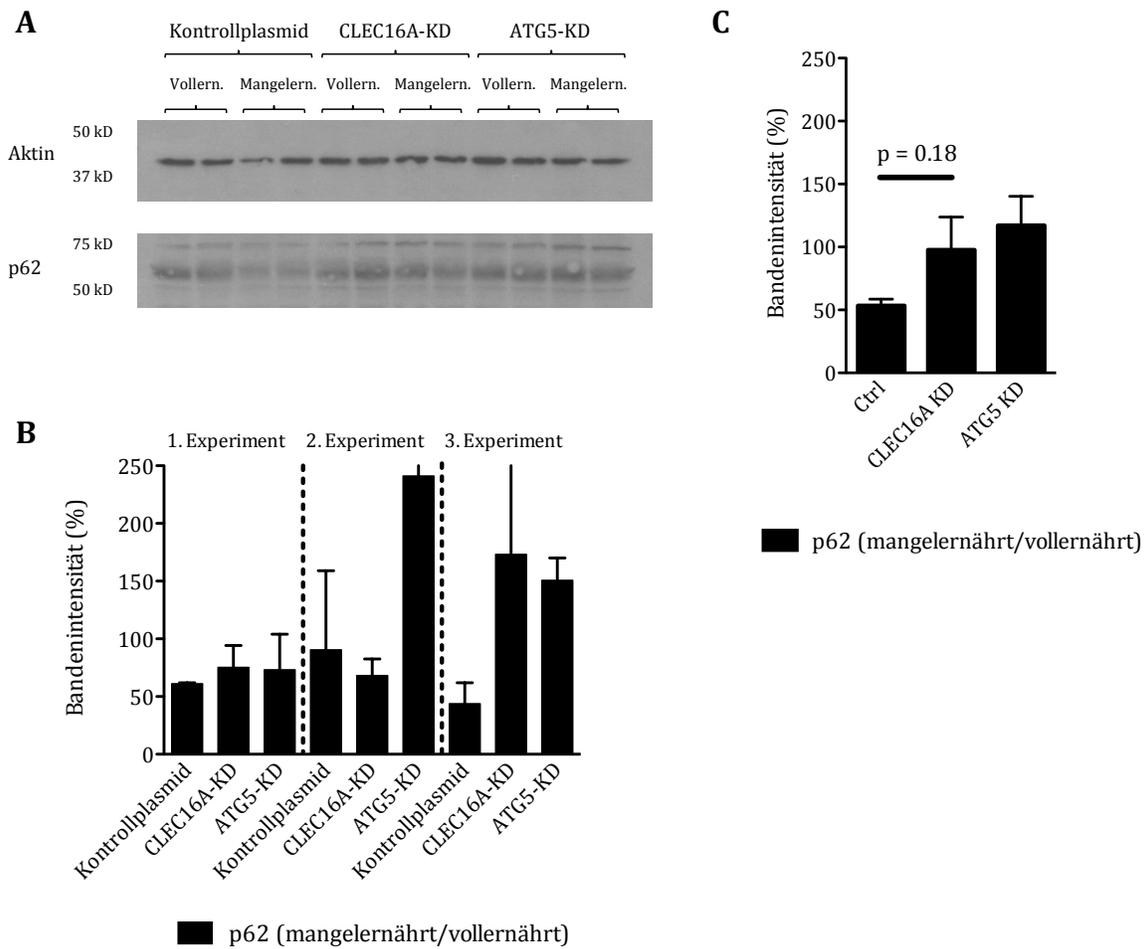


Abbildung 9 Immunoblot von p62 in voll- oder mangelernährten HEK-Zellen, die mit einem Kontrollplasmid oder mit Plasmiden für einen *CLEC16A*- oder *ATG5*-KD transfiziert worden waren. **A:** *CLEC16A*- und *ATG5*-KD-HEK-Zellen wiesen nach Mangelernährung mehr p62 auf als Kontrollplasmid-HEK-Zellen. **B:** In drei unabhängigen Experimenten konnte dieser Trend quantitativ bestätigt werden. HEK-Zellen mit einem KD für *CLEC16A* oder *ATG5* zeigten mehr p62 in mangelernährten HEK-Zellen im Verhältnis zu p62 in vollernährten HEK-Zellen (jeweils $n = 2$ Petrischalen). **C:** Zusammenfassung der drei Einzelexperimente ($n = 3$ Experimente).

Zusammenfassend zeigten *CLEC16A*- und *ATG5*-KD-HEK-Zellen eine ähnliche Veränderung der Autophagie-Marker LC3 und p62: KD-HEK-Zellen zeigten ein geringeres Verhältnis von LC3-II zu LC3-I und mehr p62 als Kontrollplasmid-HEK-Zellen.

3.2 Clec16a-KD-Maus

Im Folgenden werden die Befunde des in vivo-Modells vorgestellt. TECs aus Clec16a-KD-Mäusen wurden morphologisch per Immunhistochemie und funktionell durch Immunoblot auf ihre autophagische Aktivität geprüft.

3.2.1 Morphologische Untersuchung von Autophagie in TECs

Thymi aus fünf WT- und fünf Clec16a-KD-Mäusen wurden durch immunhistochemische Färbung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop dargestellt und wiederum fünf verschiedene Aufnahmen von jedem Thymus angefertigt. Jeweils zwei Mäuse waren männlich und jeweils drei Mäuse waren weiblich. Ein Geschlechtsabhängiger Unterschied der Ergebnisse war weder innerhalb eines Genotyps noch Genotyp-übergreifend zu erkennen. Die WT-Mäuse waren sechs und die Clec16a-KD-Mäuse acht Wochen alt. Somit waren alle Mäuse erwachsen. Abb. 10A zeigt mTECs, die mit dem Marker UEA-1 und einem roten Sekundärantikörper gefärbt wurden, sowie Autophagosomen, die mit dem Autophagie-Marker LC3 und einem grünen Sekundärantikörper gefärbt wurden. Diejenigen Autophagosomen, die mit mTECs und cTECs kolokalisierten (Abb. 11A und 11B, Vergrößerungsfenster), wurden von Hand ausgezählt. Sowohl in WT-Mäusen als auch in Clec16a-KD-Mäusen kolokalisierte der überwiegende Teil der Autophagosomen mit cTECs (Abb. 10C und 10D).

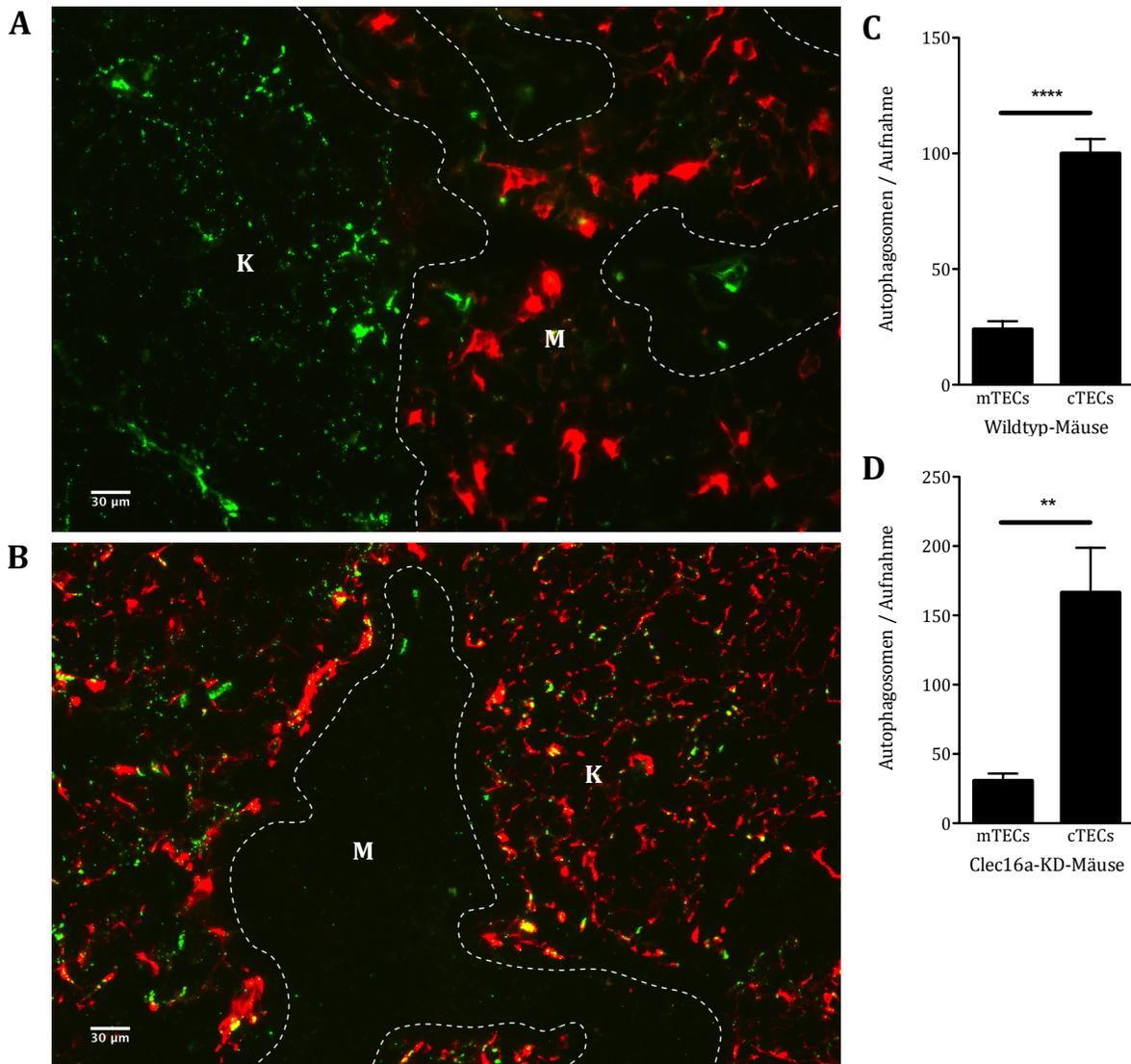


Abbildung 10 Immunhistochemie von LC3 in mTECs und cTECs aus Clec16a-KD- und WT-Mäusen. **A-B:** Mit Fluoreszenz-Mikroskopie dargestellte und 20-fach vergrößerte, repräsentative Kryoschnitte des Thymus einer erwachsenen Clec16a-KD-Maus. mTECs wurden durch UEA-1 (**A**; rot) bzw. cTECs durch K8 (**B**; rot) und Autophagosomen durch LC3 (**A-B**; grün) gefärbt. Medulla (M) und Kortex (K) werden durch die kortikomedulläre Grenze getrennt (gestrichelte Linien). **C-D:** Auszählung der Anzahl kolokalisierender Autophagosomen/Aufnahme in mTECs aus WT-Mäusen (**C**) und Clec16a-KD-Mäusen (**D**; jeweils n = 5 Mäuse).

Auf die allgemeine Beobachtung der höheren autophagischen Aktivität in cTECs im Vergleich zu mTECs folgte die Frage, ob innerhalb des mTEC-Kompartimentes bzw. innerhalb des cTEC-Kompartimentes ein Unterschied zwischen WT- und Clec16a-KD-Mäusen bestand. Wie Abb. 11C und 11D zeigen, war die Anzahl der Autophagosomen, die mit UEA-1 bzw. K8 kolokalisierten, in Clec16a-KD-Mäusen erhöht. In mTECs war dieser Unterschied deutlich nicht signifikant, da die um 25,12 % höhere Autophagosomenanzahl pro Aufnahme in Clec16a-KD-Mäusen mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0,30$ zufällig zustande gekommen war. In cTECs war der Unterschied mit einem Anstieg von 66,33 % deutlicher. Auch hier war der Unterschied nicht signifikant. Die Wahrscheinlichkeit eines zufällig zustande gekommenen Unterschiedes war jedoch mit $p = 0,11$ weitaus geringer als in mTECs. Die Anzahl von Autophagosomen in cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen zeigten eine große Streuung, während die Werte für cTECs aus WT-Mäusen und die Werte für mTECs im Allgemeinen wenig voneinander abwichen (Abb. 11C und 11D). Die durch eine Software ermittelte Querschnittsfläche der Autophagosomen in cTECs von Clec16a-KD-Mäusen war gegenüber der WT-Kontrolle unverändert (Abb. 11E). Auch hier zeigten die Autophagosomen der Clec16a-KD-Mäuse eine größere Streuung. Die Zählung der kolokalisierten Autophagosomen in den Abb. 10C, 10D, 11C und 11D erfolgte von Hand. Die Anzahl der mit TECs kolokalisierten durch einen Untersucher gezählten Autophagosomen korrelierte signifikant mit der durch eine Software ermittelten Gesamtzahl an Autophagosomen (Abb. 11F, $p < 0,0001$ im linearen Regressionstest).

Zusammenfassend zeigten cTECs in Clec16a-KD-, wie in WT-Mäusen mehr Autophagosomen als mTECs. cTECs aus transgenen Tieren wiesen bei großer Streuung eine höhere Anzahl an Autophagosomen auf als cTECs aus Kontrolltieren, während die Größe der Autophagosomen unverändert war.

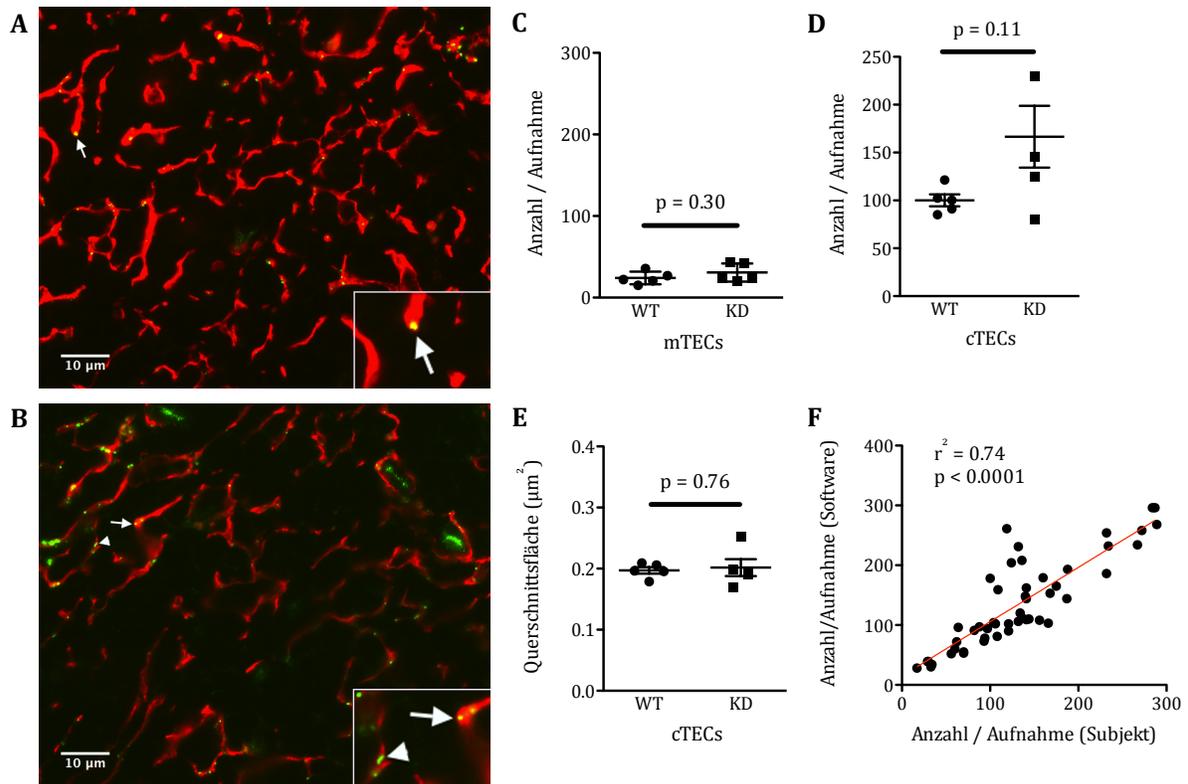


Abbildung 11 Immunhistochemie von LC3 in mTECs und cTECs aus Clec16a-KD- und WT-Mäusen. **A-B:** Mit Fluoreszenz-Mikroskopie dargestellte und 40-fach vergrößerte, repräsentative Kryoschnitte der Thymi einer erwachsenen WT-Maus (**A**) und einer erwachsenen Clec16a-KD-Maus (**B**). cTECs (rot) wurden durch Keratin 8, Autophagosomen durch LC3 (grün) gefärbt. Mit cTECs kolokalisierende Autophagosomen sind durch Pfeile und Pfeilspitze gekennzeichnet (vergrößerte Fenster). **C-D:** Auszählung der Anzahl kolokalisierender Autophagosomen/Aufnahme in mTECs (**C**; jeweils $n = 5$ Mäuse). und cTECs (**D**; jeweils $n = 5$ Mäuse). **E:** Die Korrelation einer Zählung von Autophagosomen durch einen Untersucher mit der Zählung durch eine Software ($n = 50$ Zählungen). **F:** Die Querschnittsfläche der durch die Software gezählten Autophagosomen in WT- und KD-Mäusen (jeweils $n = 5$ Mäuse).

3.2.2 Funktionelle Untersuchung von Autophagie in TECs

Für eine funktionelle Betrachtung von Autophagie in TECs wurden Immunoblots von „TECs“-Zellgruppen mit Autophagie-Markern untersucht. Dazu wurden mit einem Percoll-Gradienten eine Gruppe von Zellen, die unter anderem die TECs des jeweilig

untersuchten Thymus enthielt, von anderen thymischen Zellen getrennt, die mehrheitlich Thymozyten darstellten („TECs“- bzw. „Thymozyten“-Zellgruppe in Abb. 12). Die Anführungszeichen spielen darauf an, dass die Zellgruppen nicht nur diese jeweiligen Zelltypen enthielten. Im vorliegenden Fall wurde untersucht, wie spezifisch der Percoll-Gradient TECs isolieren kann. Dazu wurden zwei WT- und zwei Clec16a-KD-Thymi anhand eines Percoll-Gradienten aufgetrennt und die „TECs“-Zellgruppe und die „Thymozyten“-Zellgruppe durchflusszytometrisch charakterisiert.

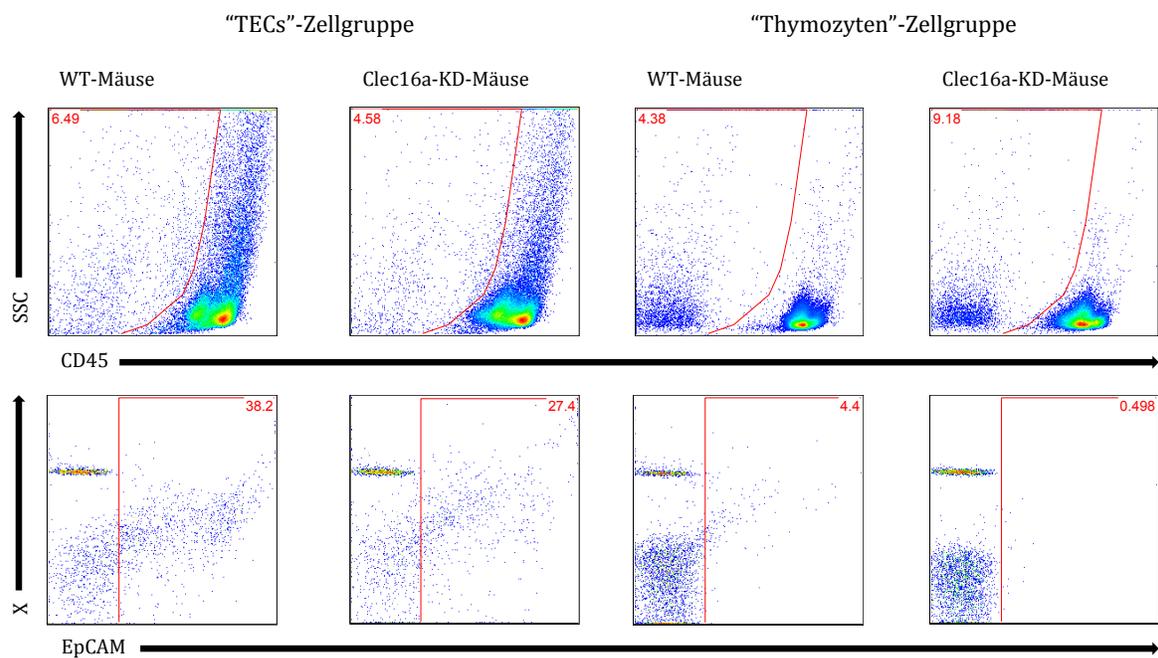


Abbildung 12 Charakterisierung der mit einem Percoll-Gradienten isolierten „TECs“-Zellgruppe und „Thymozyten“-Zellgruppe. Die in der oberen Reihe mit einer Prozentzahl gekennzeichneten und rot umrandeten Zellen stellen CD45+-Zellen dar, welche nicht aus dem hämatopoetischen Kompartiment stammten. Diese Untergruppe der CD45+-Zellen wurde in der zweiten Reihe weiter charakterisiert. Dort gekennzeichnete Zellen stellen EpCAM+-Zellen dar, welche epithelialen Ursprungs sind. Die Achsen-Pfeile geben ansteigende, arbiträre Fluoreszenz-Einheiten der angegebenen Marker wieder.

In der ersten Reihe von Abb. 12 ist die Auftrennung aller Zellen nach Seitwärtsstreulicht und CD45, einem Marker für Zellen hämatopoetischer Herkunft, zu sehen. Die roten Zahlen kennzeichnen den Prozentsatz von Zellen, der im rot

abgegrenzten Bereich lag. TECs sind nicht hämatopoetischer Herkunft und waren damit CD45⁻. Der Anteil CD45⁻-Zellen betrug in der „TECs“-Zellgruppe und in der „Thymozyten“-Zellgruppe unabhängig vom Genotyp einen ähnlich niedrigen Prozentsatz. Die zweite Reihe von Abb. 12 zeigt die in der ersten Reihe identifizierten CD45⁻-Zellen. Diese wurden nach CD11c, einem Marker für dendritische Zellen, und EpCAM, einem Marker für Epithelzellen, aufgetrennt. Der rote Bereich gibt EpCAM⁺-Zellen wieder. Die Zusammenführung der Prozentsätze (Multiplikation des Anteils von CD45⁻-Zellen und des Anteils von EpCAM⁺-Zellen) ergab, dass die Auftrennung von Thymuszellen mit einem Percoll-Gradienten eine „TECs“-Zellgruppe mit 2,48 % (WT) bzw. 1,25 % (KD) CD45⁻-EpCAM⁺-Zellen isolierte. In der „Thymozyten“-Zellgruppe befanden sich dagegen nur 0,19 % (WT) bzw. 0,05 % (KD) CD45⁻-EpCAM⁺-Zellen. Die „TECs“-Zellgruppen enthielten also mehrheitlich andere Zellarten als TECs, aber trotzdem den Großteil aller insgesamt im Thymus vorhandenen TECs.

Die „TECs“-Zellgruppe wurde nach ihrer Charakterisierung einer funktionellen Autophagie-Untersuchung unterzogen. Dafür wurden die „TECs“-Zellgruppen aus WT-Mäusen und Clec16a-KD-Mäusen in zwei unabhängigen Experimenten anhand eines Immunoblots auf LC3 geprüft. Die durchflusszytometrische Charakterisierung fand dabei vor dem zweiten Autophagie-Experiment mit jeweils zwei Mäusen statt und wurde mit Zellen aus der selben „TECs“-Zellgruppe durchgeführt, aus der die restlichen Zellen für die Immunoblot-Analyse verwendet wurden; das erste Experiment fand mit jeweils einer Maus statt. Abb. 13 zeigt, dass in Clec16a-KD-Mäusen weniger LC3-II vorhanden war als in WT-Mäusen. Die Menge an LC3-I war in Clec16a-KD-Mäusen unverändert. Untersuchungen mit der gleichen Immunoblot-Methode für den Autophagie-Marker p62 lieferten keine einheitlichen Ergebnisse.

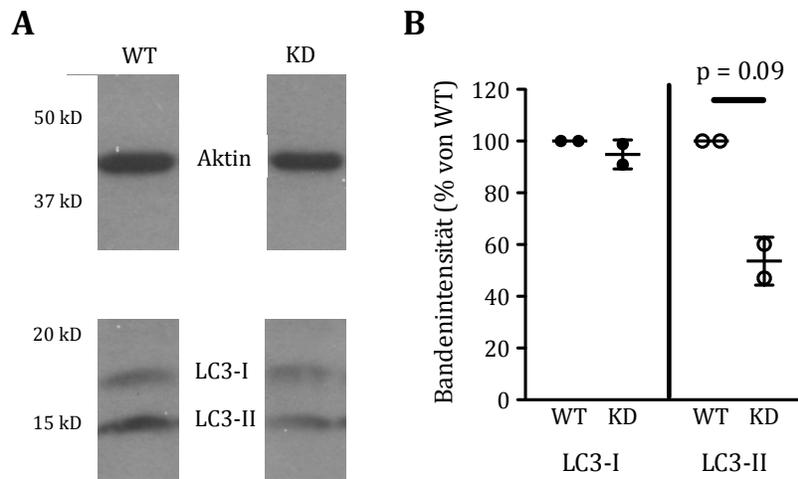


Abbildung 13 A: Immunoblot der mit einem Percoll-Gradienten isolierten „TECs“-Zellgruppe von WT- und Clec16a-KD-Mäusen für die Autophagie-Marker LC3-I und LC3-II. **B:** Intensität der Immunoblot-Banden von LC3-I und LC3-II, über der Intensität der Immunoblot-Banden von Aktin normiert und prozentual der WT-Werte dargestellt. ($p = 0,09$; jeweils $n = 2$ Experimente; insgesamt $n = 3$ Mäuse).

4. Diskussion

Typ-1-Diabetes ist eine chronische Autoimmunerkrankung mit zunehmender epidemiologischer Bedeutung. Ätiologisch wird eine multifaktorielle Genese angenommen, auch wenn die genaue Ursache der Erkrankung noch immer unbekannt ist. Pathogenetische Erklärungsmodelle messen einer gesteigerten Reaktivität von T-Zellen im Rahmen einer gestörten zentralen Toleranz eine wichtige Rolle zu (21–23,121). In den letzten zehn Jahren haben genomweite Assoziationsstudien die Hoffnung geweckt, die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen weiter aufklären zu können (60,61). *CLEC16A* stach unter vielen neu identifizierten Assoziationsgenen heraus, da es mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen assoziiert ist, unter anderem Typ-1-Diabetes (18–20). Dazu passend zeigten Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe Kissler, dass ein KD von *Clec16a* in NOD-Mäusen mit einem Schutz vor Diabetes einherging (78). Anknüpfende Untersuchungen konnten zeigen, dass der Schutz von hyporeaktiven T-Zellen getragen wurde und von der Expression von *Clec16a* in TECs abhängig war. In den meisten APCs bilden endozytierte Proteine die wichtigste Quelle für die Präsentation von Peptiden auf MHC II-Komplexen (42). In TECs könnte Autophagie aber für die Erstellung eines ausreichend vielfältigen T-Zell-Repertoires im Rahmen der zentralen Toleranz essentiell sein (41). Die Funktion von *CLEC16A* ist bisher unbekannt. DiAntonios Arbeitsgruppe hatte jedoch 2012 zeigen können, dass *Ema*, das Homolog von *CLEC16A*, in *Drosophila*, autophagosomales Wachstum unterstützt und dass Autophagie in *ema*-Mutanten funktionell gestört ist. Die Expression von menschlichem *CLEC16A* stellte physiologisches Wachstum und normale Autophagie wieder her (80). *Ema* ist in späten Endosomen zu finden und so ist es bemerkenswert, dass jüngst erschienene Studien in einer menschlichen Zelllinie *CLEC16A* im endoplasmatischen Retikulum identifizierten, was die Hypothese einer Rolle von *CLEC16A* bei der Antigenprozessierung unterstützt (76). Weitere Studien zeigten 2014 in einem Mausmodell, dass *Clec16a*

in β -Zellen des Pankreas Autophagie stört (122).

Diese Arbeit untersuchte zunächst *in vitro*, ob ein KD von CLEC16A in einer menschlichen Zelllinie Autophagie verändert. Darüber hinaus führte die potentiell wichtige Rolle von Autophagie für die Entwicklung zentraler Toleranz zu der Frage, ob *CLEC16A* ein mit Autoimmunität assoziiertes Gen ist, weil es Autophagie in TECs verändert. Um dieser Fragestellung nachzugehen, untersuchte diese Arbeit *in vivo*, ob Autophagie in TECs von *Clec16a*-KD-Mäusen verändert ist.

4.1 Die Darstellung von Autophagie

Immunzytochemische Untersuchungen von vollernährten HEK-Zellen mit LC3 und p62 zeigten eine robuste autophagische Aktivität (Abb. 6A). Gleichwohl wurden für weitere Versuche HEK-Zellen auch mangelernährt bzw. mit Protease-Inhibitoren behandelt, um den autophagischen Prozess zu stimulieren bzw. anzuhalten. Zunächst war so die Möglichkeit gegeben, Autophagie-Marker auf ihre Verlässlichkeit eines Nachweises autophagischer Aktivität zu prüfen. Darüber hinaus konnten dadurch etwaige Unterschiede der autophagischen Aktivität verstärkt und damit deutlicher dargestellt werden. Ein probatorisch durchgeführter Vergleich voll- und mangelernährter HEK-Zellen mit MDC-Durchflusszytometrie ergab, dass in Übereinstimmung mit vorbeschriebenen Daten mangelernährte Zellen mehr MDC aufwiesen als vollernährte Zellen (104). Dies schien eine Initiierung von Autophagie durch Mangelernährung bestätigen zu können, sollte aber durch spezifischere Methoden weiter geprüft werden. Daher wurden Immunoblot-Untersuchungen der Autophagie-Marker LC3 und p62 in vollernährten HEK-Zellen, mangelernährten HEK-Zellen sowie HEK-Zellen, die mit einem Protease-Inhibitor behandelt worden waren, durchgeführt. Wie in der Literatur beschrieben (106), fielen LC3-I und p62 nach Mangelernährung ab, während LC3-II bei Mangelernährung anstieg (Abb. 6C). Der Abfall von LC3-I und der Anstieg von LC3-II könnten dabei der Umwandlung von LC3-I zu LC3-II bei der Bildung von Autophagosomen in einem

frühen Stadium des Autophagie-Prozesses entsprechen. Der Abfall von p62 könnte auf eine autophagische Degradation von p62 hinweisen. Diese Ergebnisse waren reproduzierbar, aber abgesehen vom Abfall von LC3-I unter Mangelernährung statistisch nicht signifikant. Nach der Behandlung mit Protease-Inhibitoren stiegen sämtliche Marker an, was zu einem allgemeinen Rückstau der Marker bei Inhibierung des Autophagie-Prozesses in einem späten Stadium passen würde. Eine hohe Streuung der Ergebnisse zeigte sich dabei vor allem unter der Behandlung mit Protease-Inhibitoren, weswegen nachfolgend auf eine Manipulation des Autophagieprozesses durch Protease-Inhibitoren verzichtet wurde. Insgesamt kann jedoch festgehalten werden, dass alle Ergebnisse der Autophagie-Marker MDC, LC3 und p62 unter sämtlichen Behandlungsmethoden reproduzierbar waren und in ihrem Verhalten der vorbeschriebenen Literatur entsprachen. Daher wurden diese Ergebnisse trotz der fehlenden statistischen Signifikanz bei einer gleichwohl kleinen Stichprobe so gewertet, dass mit den Autophagie-Markern LC3 und p62 Autophagie ausreichend zuverlässig dargestellt werden kann.

4.2 CLEC16A und Autophagie in humanen und murinen Zellen

Um den Einfluss von CLEC16A auf Autophagie zu testen, wurde zunächst in einer menschlichen Zelllinie ein KD von CLEC16A und, als Positivkontrolle, ein KD von ATG5 durchgeführt (Abb. 7). Immunoblot-Untersuchungen dieser Zellen konnten zeigen, dass das Verhältnis von LC3-II zu LC3-I und die Zellspiegel von p62 in CLEC16A- und ATG5-KD-HEK-Zellen abfielen (Abb. 8). CLEC16A-KD-HEK-Zellen zeigten dabei ein statistisch nahezu signifikant geringeres Verhältnis von LC3-II zu LC3-I als Kontrollplasmid-HEK-Zellen ($p = 0,07$). Die Tendenz eines geringeren Verhältnisses von LC3-II zu LC3-I konnte in allen Einzelexperimenten auch bei ATG5-KD-HEK-Zellen beobachtet werden. Die LC3-Befunde wurden in vollernährten HEK-Zellen erhoben. Mangelernährte HEK-Zellen lieferten für LC3 nicht interpretierbare Daten, da sich LC3-I und LC3-II bereits in den Kontrollzellen inkonsistent verhielten.

Wie die immunzytochemische Darstellung von Autophagie in vollernährten HEK-Zellen zeigen konnte, waren HEK-Zellen bereits im vollernährten Zustand autophagisch aktiv (Abb. 6A). Dies machte eine Untersuchung von Autophagie auch in vollernährten HEK-Zellen möglich. Konsistente Ergebnisse von mangelernährten HEK-Zellen hätten jedoch die schon in vollernährten HEK-Zellen beobachteten Unterschiede des Verhältnisses von LC3-II zu LC3-I verstärken können. Aus diesem Grund wurde für die Darstellung von p62 der Umstand genutzt, dass sowohl für vollernährte als auch für mangelernährte HEK-Zellen konsistente Daten vorlagen, und daher das Verhältnis von p62 in mangelernährten zu p62 in vollernährten HEK-Zellen wiedergegeben. Die Untersuchung zeigte, dass CLEC16A- und ATG5-KD-HEK-Zellen eine gestörte p62-Clearance aufwiesen, wenn Autophagie durch Mangelernährung initiiert wurde. Die Ergebnisse waren wiederum statistisch nicht signifikant, gaben aber abgesehen von einer Ausnahme eine Tendenz wieder, die sich in allen Einzelexperimenten wiederfand. Damit fanden sich in einer menschlichen Zelllinie Hinweise darauf, dass CLEC16A Autophagie fördert. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die *in vitro*-Ergebnisse sowohl für CLEC16A als auch für ATG5 stets ähnlich ausfielen und dass Hinweise für eine Rolle von ATG5 bei der Pathophysiologie der Autoimmunkrankheit Systemischer Lupus erythematoses beschrieben sind (123).

Die Immunoblot-Untersuchung einer „TECs“-Zellgruppe aus Clec16a-KD-Mäusen wies ähnlich viel LC3-I, aber weniger LC3-II als das WT-Äquivalent auf (Abb. 13). Die Ergebnisse mit dem Autophagie-Marker p62 waren inkonsistent und somit nicht beurteilbar. Dies, ebenso wie die fehlende statistische Signifikanz für den LC3-II-Unterschied, könnte Ausdruck eines eigentlich nicht vorhanden gewesenen Unterschiedes sein. Der beobachtete fast signifikante Unterschied ($p = 0,09$) bei einer derartig kleinen Fallzahl von insgesamt drei Mäusen in zwei unterschiedlichen Experimenten könnte jedoch auch darauf hindeuten, dass es einen wirklichen Unterschied gibt. Wiederholungen des Experimentes waren in dem Zeitrahmen der Dissertation und wegen eines Mangels an Clec16a-KD-Mäusen nicht möglich, würden aber die Fallzahl erhöhen und somit eine validere Aussage zulassen.

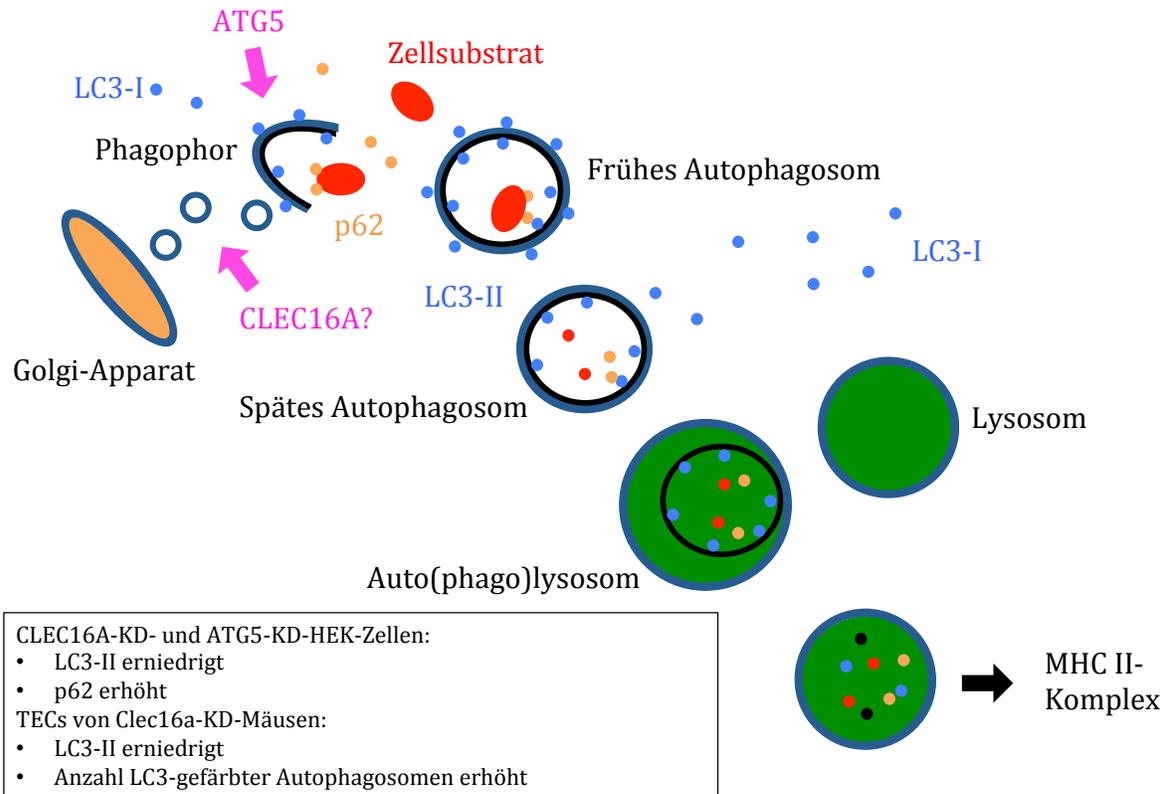


Abbildung 14 CLEC16A und Autophagie, angelehnt an Mizushima, Levine und Klionsky (52,58,59,102). In CLEC16A-KD- und ATG5-KD-HEK-Zellen fanden sich erniedrigte LC3-II- und erhöhte p62-Spiegel. In der „TECs“-Zellgruppe von Clec16a-KD-Mäusen fanden sich ebenfalls erniedrigte LC3-II-Spiegel. Diese Befunde deuten auf eine Störung des Autophagie-Prozesses vor der Inkorporation von LC3-II und der sich daran anschließenden Degradation von p62 hin. Die erhöhte Anzahl LC3-gefärbter Autophagosomen (Abb. 11) könnte kompensatorisch sein.

Ein KD von CLEC16A bewirkte damit *in vitro* und *in vivo* eine vergleichbare Veränderung des Autophagie-Markers LC3. LC3-II fiel im Verhältnis zu LC3-I ab. Der dazu passende Anstieg von p62 *in vitro* konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. *In vitro* fand sich zudem eine ähnliche Veränderung von Autophagie bei ATG5-KD-HEK-Zellen. LC3 und ATG5 sind für die Bildung von frühen Autophagosomen notwendig (51). Die gestörte Prozessierung von LC3-I zu LC3-II in CLEC16A- und ATG5-KD-HEK-Zellen, sowie in TECs aus Clec16a-KD-Mäusen, legt daher nahe, dass der KD von CLEC16A eine Störung des Autophagie-Prozesses vor der Bildung früher Autophagosomen zur

Folge hatte (Abb. 14). Die Clearance von p62 ist ein Maß für die autophagische Funktion (106). Die gestörte p62-Clearance in CLEC16A- und ATG5-KD-HEK-Zellen weist daher auf die funktionelle Relevanz des KD von CLEC16A hin.

Zusammenfassend sind diese Daten mit den Ergebnissen von DiAntonios Arbeitsgruppe vereinbar, die für das Drosophila-Ortholog von CLEC16A ebenfalls eine Rolle bei der Bildung von Autophagosomen vorschlug (80). Um dies weiter zu prüfen, wäre es notwendig, die Immunoblot-Experimente zu wiederholen oder alternative Assays zu verwenden, um mit einer größeren Stichprobe bzw. durch einen komplementären methodischen Ansatz eine validere Aussage treffen zu können.

4.3 Der Einfluss von Clec16a auf Autophagie in TECs

Nachdem Hinweise für die Förderung der Autophagie durch CLEC16A in humanen und murinen Zellen vorlagen, sollte aufgrund der angenommenen Bedeutung von Clec16a für die Entwicklung zentraler Toleranz der Einfluss von Clec16a auf Autophagie in TECs untersucht werden. Thymi aus Clec16a-KD-Mäusen und aus WT-Kontrollmäusen wurden auf die Kolo-kalisierung von Autophagosomen und mTECs bzw. cTECs geprüft. Die kolo-kalisierenden Autophagosomen wurden durch einen Untersucher ausgezählt. Eine Alternative zur Auszählung von Hand ist die Auszählung durch eine Software, welche ebenfalls durchgeführt wurde. Bei dieser Methode wurde der Software vorgegeben, alle Punkte zu zählen, die von der Größe und Morphologie her Autophagosomen entsprachen und mit der für Autophagosomen spezifischen Farbe angefärbt worden waren. Für die Zählung durch die Software wurden alle grünen Strukturen als Autophagosomen definiert, die eine Querschnittsfläche von 3-50 Pixel² (entspricht 0,061-1,015 μm^2) aufwiesen. Der Durchmesser von Autophagosomen in Säugetierzellen beträgt im Allgemeinen etwa 0,5-1,5 μm (124). Die Autophagosomen der murinen Thymus-Proben überschritten jedoch kaum einen Durchmesser von 0,5 μm . Dass es sich bei den definierten Strukturen dennoch um Autophagosomen handelte, war durch die Spezifität des Antikörpers, die Morphologie

der Autophagosomen, sowie ihre Lage innerhalb der TECs hochwahrscheinlich (Abb. 11A und 11B, Vergrößerungsfenster). Die Software hätte nur die Autophagosomen, die sowohl mit der für Autophagosomen spezifischen Farbe (in diesem Fall grün) als auch mit der für TECs spezifischen Farbe (in diesem Fall rot) gefärbt worden waren, zählen können. Demnach wäre eine Zählung der Mischfarbe (in diesem Fall gelb) erfolgt. Allerdings gab es aufgrund der Variabilität der Färbung neben einem Spektrum von Mischfarben auch Autophagosomen, die von der Lokalisierung eindeutig kolokalisierten, aber nicht zusätzlich die für TECs spezifische Anfärbung aufwiesen (Abb. 11B, Vergrößerungsfenster). In der vorliegenden Arbeit wurden daher vorzugsweise die Ergebnisse verwendet, bei denen die kolokalisierenden Autophagosomen von Hand ausgezählt worden waren. Nichtsdestotrotz korrelierte die Auszählung durch einen Untersucher stark mit der Auszählung durch die Software (Abb. 11F). Auf der einen Seite validiert dieses Ergebnis die Auszählung von Hand. Auf der anderen Seite deutet das Ergebnis darauf hin, dass Autophagosomen vor allem in TECs und nicht in anderen Zellarten des Thymus vorkamen.

Die Zählung von mit TECs kolokalisierenden Autophagosomen ergab, dass cTECs deutlich mehr Autophagosomen aufwiesen als mTECs (Abb. 10). Dies war sowohl für WT-Mäuse als auch für Clec16a-KD-Mäuse der Fall. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Vorbefunden der Arbeitsgruppen Klein und Mizuochi (41,55). Kleins Labor identifizierte jedoch auch eine Untergruppe reifer MHC II^{hi} CD80^{hi} mTECs, die autophagisch besonders aktiv waren (41). In diesem mTEC-Zelltyp ist Aire aktiv und fördert die promiskuitive Expression Gewebe-spezifischer Antigene (41). In der vorliegenden Arbeit konnte keine räumliche Häufung von Autophagosomenreichen mTECs festgestellt werden. Eine genaue Untersuchung von MHC II^{hi} CD80^{hi} mTECs hätte allerdings eine Mikroskopie von zuvor durchflusszytometrisch sortierten Zellen verlangt. Dies war in der für die Arbeit vorgesehenen Zeit nicht durchführbar, stellt aber einen lohnenswerten Folgeversuch dar.

Dennoch waren besonders cTECs in den Mittelpunkt des Interesses der Arbeitsgruppe Kissler gerückt, da das cTEC-Kompartiment in Clec16a-KD-Mäusen vergrößert war und mehr MHC II als sein WT-Äquivalent aufwies, während dies für mTECs nicht der Fall war (78). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die Anzahl von Autophagosomen in mTECs aus Clec16a-KD-Mäusen gegenüber mTECs aus WT-Mäusen unverändert ist, während die Anzahl von Autophagosomen in cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen gegenüber cTECs aus WT-Mäusen erhöht ist (Abb. 11C und 11D). Der Unterschied in cTECs war statistisch nicht signifikant, zeigte aber gegenüber dem Vergleich von mTECs ein qualitativ anderes Bild: Während es in mTECs aus WT-Mäusen und Clec16a-KD-Mäusen, sowie in cTECs aus WT-Mäusen, eine geringe Abweichung der Anzahl von Autophagosomen gab, variierte die Anzahl von Autophagosomen in cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen erheblich (Abb. 11C und 11D). Neben der Möglichkeit eines Artefaktes könnte die Streuung bei cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen auch auf eine unterschiedliche KD-Effizienz in unterschiedlichen Mäusen zurückzuführen sein. Dieses Ergebnis einer erhöhten Anzahl von Autophagosomen in cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen passt zu den Befunden veränderter cTECs der Arbeitsgruppe Kissler. Darüber hinaus bestätigt das Ergebnis wiederum Arbeiten von DiAntonios Arbeitsgruppe. Diese stellte fest, dass die Ausschaltung des Orthologes von *CLEC16A* in *Drosophila* mit einer erhöhten Anzahl von Autophagosomen einherging (80).

Gleichzeitig berichtete DiAntonios Gruppe von einer verminderten Größe von Autophagosomen (80). Die vorliegende Arbeit konnte in Clec16a-KD-Mäusen keinen Größenunterschied von cTEC-Autophagosomen feststellen (Abb. 11E). Es muss aber angemerkt werden, dass die Autophagosomen von der *ema*-Mutante *Drosophila* etwa 10 mal so groß wie Autophagosomen der Clec16a-KD-Maus waren. Etwaige Größenunterschiede sind demnach in *Drosophila* relativ gesehen leichter zu entdecken. Darüber hinaus waren die Autophagosomen der Clec16a-KD-Maus bei 40-facher Vergrößerung nur wenige Pixel groß. Daher war eine Größenbeurteilung nicht ausreichend diskriminierend. Der Einsatz des verfügbaren Konfokal-Mikroskops hätte

nur eine 63-fache Vergrößerung bewirken können, womit die Größe muriner Autophagosomen immer noch nicht hinreichend hätte erfasst werden können. Schließlich muss beachtet werden, dass ein größerer Zoomfaktor auch eine vergrößerte Stichprobenverzerrung nach sich gezogen hätte.

Zusammenfassend wurde im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass cTECs mehr Autophagie aufwiesen als mTECs (41,55). Gleichzeitig deutete sich an, dass Autophagie in cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen gegenüber Autophagie in cTECs aus Kontrolltieren verändert war: cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen hatten eine höhere Anzahl an Autophagosomen, wobei die Größe der Autophagosomen unverändert war. Die Tatsache, dass Clec16a-KD-Tiere eine höhere Anzahl von Autophagosomen in cTECs hatten, scheint dem Befund einer Inhibierung des Autophagie-Prozesses zu widersprechen. Bemerkenswerterweise überkompensierte jedoch in der *ema*-Mutante die Verkleinerung der Autophagosomen die erhöhte Anzahl von Autophagosomen, so dass sich eine erniedrigte Gesamtgröße an autophagosomalen Membranen ergab (80). Neben diesen morphologischen Befunden fanden sich in der Fruchtfliege auch Hinweise auf eine funktionelle Beeinträchtigung des Autophagie-Prozesses durch den Rückstau von p62 (80). Die aufgrund der eingeschränkten quantitativen Aussagekraft der morphologischen Versuche notwendige funktionelle Untersuchung einer „TECs“-Zellgruppe der vorliegenden Arbeit ergab dazu passend einen Defekt bei der LC3-Umwandlung: Die „TECs“-Zellgruppe aus Clec16a-KD-Mäusen wies weniger LC3-II auf (Abb. 13). Der Unterschied war wiederum statistisch grenzwertig nicht signifikant ($p = 0,09$). Die TECs in der „TECs“-Zellgruppe stellten jedoch nur etwa 2 % aller Zellen der Zellgruppe dar (Abb. 12). Dies bedeutet, dass sich in der „TECs“-Zellgruppe fast alle TECs wiederfanden, die es im Thymus gab, auch wenn diese nur einen geringen Anteil aller Zellen darstellten, die sich in der „TECs“-Zellgruppe befanden. Bei der Beurteilung der Befunde der „TECs“-Zellgruppe ist es daher wichtig zu beachten, dass der Unterschied, der zwischen „TECs“-Zellgruppen von Clec16a-KD-Mäusen und WT-Mäusen gemessen worden war, in Wahrheit noch stärker sein könnte. In diesem Fall

würden die 98 % nicht-TECs den Unterschied teilkompensieren. Alternativ könnte der Unterschied nicht auf die TECs, sondern auf eine andere Zellart der Zellgruppe zurückzuführen sein. Gegen die letzte Möglichkeit spricht, dass in der „Thymozyten“-Zellgruppe kein Autophagie-Unterschied zwischen Clec16a-KD-Mäusen und WT-Mäusen sichtbar war (Daten nicht gezeigt). Selbstverständlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Gruppe von nicht-TECs, die sich nur in der „TECs“-Zellgruppe wiederfindet, für den Unterschied in dieser Zellgruppe verantwortlich war. Eine durchflusszytometrisch gesteuerte Isolierung von TECs würde die Spezifität des Experimentes deutlich erhöhen. Da der Thymus jedoch nur wenige TECs enthält (pro Thymus etwa 100.000 TECs), wären für den Immunoblot durchflusszytometrisch isolierter TECs pro Experiment etwa 5-10 Mäuse notwendig. In dem für diese Arbeit vorgesehenen Zeitrahmen war eine solche zusätzliche Anzahl transgener Mäuse nicht verfügbar. Nichtsdestotrotz stellte die Isolierung der „TECs“-Zellgruppe eine gute, einfache Methode dar, um eine gewisse TECs-Spezifität der Immunoblot-Untersuchung zu erreichen. Die Gruppe von Leopold Eckhart verwendete beispielsweise ganze Thymi für die Immunoblot-Analysen autophagischer Aktivität (57). Da bei der Isolierung der „TECs“-Zellgruppe ein großer Teil von nicht-TECs mit der „Thymozyten“-Zellgruppe herausgefiltert wird, ist die Betrachtung der „TECs“-Zellgruppe immerhin sehr viel spezifischer als die Analyse ganzer Thymi (2,48 % (WT) bzw. 1,25 % (KD) CD45-EpCAM⁺-Zellen in der „TEC“-Zellgruppe gegenüber 0,19 % (WT) bzw. 0,05 % (KD) CD45-EpCAM⁺-Zellen in der „Thymozyten“-Zellgruppe).

4.4 CLEC16A als Bindeglied zwischen Autophagie und Autoimmunität

Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, dass CLEC16A Autophagie verändern könnte, in dem es Autophagie in TECs fördert. Eine Förderung von Autophagie durch CLEC16A wirft aber einen scheinbaren Widerspruch auf, da gezeigt

wurde, dass gestörte Autophagie in TECs zu Autoimmunität führt (41). Dies steht den Ergebnissen gegenüber, dass Clec16a-KD-Mäuse vor der Entwicklung von Typ-1-Diabetes geschützt sind (78). Im Folgenden werden Erklärungsansätze für diesen scheinbaren Widerspruch aufgezeigt. Vorher sollte jedoch betont werden, dass noch wenig über das Zusammenspiel von Autophagie und Autoimmunität bekannt ist und daher die bloße – von der Richtung unabhängige – Veränderung von Autophagie durch CLEC16A ein bemerkenswerter Befund ist. Dies gilt insbesondere, da diese Veränderung auch in vor Typ-1-Diabetes geschützten Mäusen festgestellt wurde.

Erklärungsansätze, inwiefern ein fördernder Einfluss von CLEC16A auf Autophagie in TECs mit einem Schutz vor Typ-1-Diabetes vereinbar ist, müssen zwischen einem Einfluss auf Höhe positiver Selektion und einem Einfluss auf Höhe negativer Selektion differenzieren. Die TECs-Untergruppen mit einer konstant hohen Autophagie-Aktivität sind cTECs und reife MHC II^{hi} CD80^{hi} mTECs. In MHC II^{hi} CD80^{hi} mTECs ist Aire aktiv und fördert die promiskuitive Expression Gewebe-spezifischer Selbstantigene (41). Bei der negativen Selektion ist ein Autoimmunität fördernder Einfluss von verminderter Autophagie somit leicht vorstellbar: Durch verminderte Autophagie kommt es zu mangelhafter Präsentation von den Selbstantigenen, deren Prozessierung auf Autophagie angewiesen ist, und so verlassen selbstreaktive T-Zellen den Thymus (41). Dass der KD von Clec16a gleichzeitig Autophagie beeinträchtigt und vor einer autoimmunen Krankheit wie Typ-1-Diabetes schützt, scheint dem zu widersprechen. Eine mögliche Erklärung wurde von Kleins Labor selber vorgeschlagen: Einige Selbstantigene sind für ihre Präsentation auf Autophagie angewiesen und werden bei beeinträchtigter Autophagie nicht präsentiert. Die für diese Selbstantigene reaktiven T-Zellen führen etwa im Fall der Arbeitsgruppe Klein zu autoimmuner Aktivität in Kolon, Leber, Lunge, Uterus und Harder'scher Drüse (41). Andere Selbstantigene sind im Rahmen ihrer zellulären Prozessierung nicht auf Autophagie angewiesen und werden bei beeinträchtigter Autophagie relativ vermehrt präsentiert. Eine solche relative Überexpression eines Selbstantigens bei fehlerhafter Autophagie wurde in der Tat von Kleins Gruppe beobachtet (56). Wenn Typ-1-

Diabetes-Selbstantigene Autophagie-unabhängig präsentiert werden, würde dies erklären, warum eine Blockade von Autophagie in Clec16a-KD-Mäusen zu einem Schutz vor Diabetes führt. Insulin gilt als das wichtigste körpereigene Antigen bei der Pathogenese von Typ-1-Diabetes (125,126) und die Zellen, die Insulin im Thymus präsentieren, scheinen eine spezifische Untergruppe AIRE-positiver mTECs zu sein (23,127,128). Es erscheint daher möglich, dass eine durch Clec16a bedingte Veränderung der Autophagie in MHC II^{hi} CD80^{hi} mTECs zu einer MHC II-Präsentation von Insulin führt, die mit einem Schutz vor Typ-1-Diabetes einhergeht. Der weiteren Aufklärung wird ein Experiment der Arbeitsgruppe Kissler dienen, bei dem Clec16a-KD-Mäusen mit Mäusen gekreuzt werden, die eine einzelne T-Zell-Rezeptor-Spezifität für Insulin (B9-23-Peptid) aufweisen (129). Vorherige erste Analysen, die zehn verschiedene V β -Ketten in WT und Clec16a-KD miteinander verglichen, konnten kein verändertes T-Zell-Repertoire zeigen. Dies könnte jedoch auch Ausdruck dessen sein, dass durch den KD von Clec16a das T-Zell-Repertoire nicht anders selektiert wird (wie z. B. durch veränderte TCR-Spezifitäten), sondern eher die Stärke der Signaltransduktion verändert wird.

Die bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kissler und die Ergebnisse dieser Arbeit weisen allerdings nicht auf eine entscheidende Rolle der mTECs hin, sondern beschreiben vielmehr beim KD von Clec16a eine Veränderung der cTECs. Der Einfluss von Clec16a scheint sich eher auf Ebene der positiven Selektion abzuspielen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kissler hatten gezeigt, dass cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen mehr MHC II-Komplexe hatten (78). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen eine höhere Anzahl von Autophagosomen aufwiesen, die autophagische Funktion aller TECs in Clec16a-KD-Mäusen jedoch eingeschränkt war (Abb.11 und 13). Weiterhin beobachtete die Arbeitsgruppe Kissler, dass in cTECs aus Clec16a-KD-Mäusen die kostimulatorischen Moleküle CD 80 und 86 erhöht, und dass doppelpositive Thymozyten sensitiver gegenüber der Stimulation mit einem anti-CD3-Antikörper waren (78). Gleichzeitig waren periphere T-Zellen aus Clec16a-KD-Mäusen hyporeaktiv (78). Den

genannten Befunden zufolge wäre es denkbar, dass in Clec16a-KD-Mäusen hyperstimulatorische cTECs im Stadium der positiven Selektion eine relativ gesteigerte negative Selektion, hyporeaktive T-Zellen und schließlich den Schutz vor autoimmunen Diabetes zur Folge hätten. Diese Hypothese setzt voraus, dass gestörte Autophagie die Präsentation von Selbstantigenen in cTECs fördert. Als Erklärung für diese Mutmaßungen könnte wie schon für die Ebene negativer Selektion eine vermehrte Präsentation Autophagie-unabhängiger Selbstantigene herangezogen werden. Eine alternative Erklärung könnten Ergebnisse von Brigitta Stockingers Arbeitsgruppe aus dem Jahr 1997 liefern. Dort führte eine leicht gestörte Autophagie zu einer effizienteren Beladung von MHC II-präsentierten Peptiden (45). Exzessive lysosomale Degradation in Makrophagen verhinderte die MHC II-Präsentation von intrazellulären Proteinen, während eine nur leicht gestörte Proteolyse eine normale MHC II-Präsentation zur Folge hatte (45). In diesem Zusammenhang wäre die fluoreszenzmikroskopische Überprüfung von Autophagosomen, die mit MHC II-Komplexen koloalisieren, interessant. Ein solches Experiment wurde im Rahmen dieser Arbeit begonnen, konnte jedoch aufgrund von technischen Schwierigkeiten mit der MHC II-Färbung im vorgegebenen Zeitrahmen nicht weiter verfolgt werden.

Zusammengefasst sind die vorliegenden Befunde aus Clec16a-KD-Mäusen mit dem Modell von hyperstimulatorischen cTECs und einer nachfolgend vermehrten negativen Selektion vereinbar. Der Einfluss von CLEC16A auf Autophagie, auf den diese Arbeit hinweist, müsste zunächst durch Wiederholungsversuche validiert werden. Darüber hinaus verlangt eine Positionierung des CLEC16A-Effektes im Prozess der zentralen Toleranzentwicklung spezifischere Experimente. Ein Beispiel für einen solchen Versuch wäre die durchflusszytometrische Sortierung und darauffolgende Autophagie-Testung von cTECs bzw. mTECs. Auch wenn diese Experimente noch ausstehen und so spekulativ der genaue Einflussmechanismus von Autophagie im Rahmen der positiven oder negativen Selektion noch ist: Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen Vorbefunde einer Förderung von Autophagie und

einer Änderung zentraler Toleranz durch *CLEC16A*. Damit münden sie in einem Erklärungsansatz der Assoziation von *CLEC16A* und Typ-1-Diabetes: *CLEC16A* fördert Autophagie in TECs, was die Selbstantigen-Beladung von MHC II-Komplexen verändert. Selbstreaktive CD4⁺-Thymozyten führen so zum Verlust zentraler Toleranz und zu der Entwicklung von Typ-1-Diabetes.

4.5 Ausblick

Neben Typ-1-Diabetes ist *CLEC16A* mit zahlreichen anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert (63–66). Weitere Untersuchungen der Funktion von *CLEC16A* in anderen Krankheitsmodellen – wie bei experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis, dem Tiermodell für Multiple Sklerose (130) – könnten die vermutete Allgemeinheit der Rolle von *CLEC16A* für die Entstehung von Autoimmunität überprüfen und die Pathogenese dieser Autoimmunerkrankungen weiter beleuchten. Auch außerhalb des Bereichs der Autoimmunität sind viele grundlegende Fragen zum Zellprozess Autophagie unbeantwortet. Dessen Einfluss auf Gesundheit und Krankheit ist – neben der Antigenpräsentation im Rahmen zentraler Toleranz – auch für andere zelluläre Funktionen in weiteren Körperorganen und bei weiteren Krankheiten beschrieben worden (51).

Betrachtet man noch einmal die Ätiologie von Typ-1-Diabetes, so ist die Genetik für die Entstehung der Erkrankung bedeutend, aber nicht hinreichend (11). Zudem zeigt eine Form des Gens *CLEC16A* eine auffällige, jedoch bei weitem nicht die stärkste Assoziation mit Typ-1-Diabetes (18). Dies wirft die Frage der translationalen Relevanz einer Erforschung der Funktion von *CLEC16A* auf. Eine mögliche Antwort liefern die *Clec16a*-KD-Mäuse, deren sonst unausweichliche Entwicklung von Diabetes durch die Ausschaltung von *Clec16a* aufgehoben wurde. Die Beobachtung zeigt, dass ein milder physiologischer Effekt ein ausgeprägtes therapeutisches Potential nicht ausschließt. Die therapeutische Nutzung des Angriffspunktes Autophagie steht bereits im Fokus der Wissenschaft. So wurde kürzlich gezeigt, dass etablierte Arzneimittel in vivo

basale Autophagie-Aktivitäten modulieren können und damit einhergehend auch Einfluss auf wichtige Funktionen im Immunsystem nehmen, wie die Interleukin-1 β -Produktion oder die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (131). Die meisten Therapieformen von Autoimmunerkrankungen haben den Nachteil, das Immunsystem global zu unterdrücken und so etwa das Risiko für opportunistische Infektionen zu erhöhen (131). Die Modulation von Autophagie weckt die Hoffnung, in Zukunft Autoimmunerkrankungen spezifischer behandeln zu können.

5. Zusammenfassung

Das Gen *CLEC16A* ist mit der Autoimmunerkrankung Typ-1-Diabetes assoziiert (18-20). NOD-Mäuse mit einem *Clec16a*-KD sind vor der Entwicklung von Diabetes geschützt, der entscheidende Wirkungsort für *Clec16a* sind dabei TECs (78). Im Rahmen zentraler Toleranz präsentieren TECs CD4⁺-Thymozyten Selbstantigene auf MHC II-Komplexen. Autophagie ist ein Zellprozess, der in TECs MHC II-Komplexen Selbstantigene zuführt und so für die Entwicklung zentraler Toleranz essentiell ist (41,55). Das Ortholog von *CLEC16A*, *ema*, fördert die Bildung von Autophagosomen (80). So wurde vermutet, dass *CLEC16A* ein Suszeptibilitäts-gen für Typ-1-Diabetes ist, weil es Autophagie in TECs und somit deren MHC II-Beladung verändert. Die vorliegende Arbeit schaltete *CLEC16A* in einer humanen Zelllinie durch RNAi aus und untersuchte die autophagische Aktivität dieser Zellen. Außerdem untersuchte sie die Autophagie von TECs aus NOD-*Clec16a*-KD-Mäusen. Die Beurteilung erfolgte morphologisch durch Immunzytochemie bzw. -histochemie und funktionell durch Immunoblots. Es wurde gezeigt, dass der KD von *CLEC16A* in vitro und in vivo Autophagie funktionell beeinträchtigt. Damit liefert die vorliegende Arbeit zusammen mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Kissler einen möglichen Erklärungsansatz, warum *CLEC16A* ein mit Typ-1-Diabetes assoziiertes Gen ist (s. Abb. 15). *CLEC16A* fördert Autophagie in TECs, was die Selbstantigen-Beladung von MHC II-Komplexen verändert. Selbstreaktive CD4⁺-Thymozyten führen so zum Verlust zentraler Toleranz und der Entwicklung von Typ-1-Diabetes. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu bekräftigen.

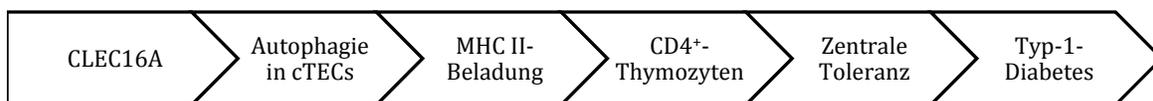


Abbildung 15 Erklärungsansatz der Assoziation von *CLEC16A* mit Typ-1-Diabetes. *CLEC16A* fördert Autophagie in cTECs. Das verändert die Selbstantigen-Beladung von MHC II-Komplexen. Selbstreaktive CD4⁺-Thymozyten führen so zum Verlust zentraler Toleranz und der Entwicklung von Typ-1-Diabetes.

6. Literaturverzeichnis

1. Hauner H, Landgraf R, Hoffmann R, Schwarz PEH, Siegel EG, Siegel E, et al. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2012. 2012.
2. Giani G, Janka HU, Hauner H, Standl E, Schiel R, Neu A, et al. Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. 2011.
3. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes*. 2007 Oct;8 Suppl 6:6–14.
4. Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999 Dec;42(12):1395–403.
5. Green A, Brutti G, Patterson C, Dahlquist G. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet*. 2000 Mar 11;355(9207):873–6.
6. Eehalt S, Dietz K, Willasch AM, Neu A. Epidemiological perspectives on type 1 diabetes in childhood and adolescence in germany: 20 years of the Baden-württemberg Diabetes Incidence Registry (DIARY). *Diabetes Care*. 2010 Feb;33(2):338–40.
7. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*. 2011 Jan;91(1):79–118.
8. Castaño L, Eisenbarth GS. Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol*. 1990 Jan;8:647–79.
9. Eisenbarth GS. Insulin autoimmunity: immunogenetics/immunopathogenesis of type 1A diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Nov;1005:109–18.
10. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*. 1994 Sep 8;371(6493):130–6.
11. Polychronakos C, Li Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nat Rev Genet*. Nature Publishing Group; 2011 Nov;12(11):781–92.
12. Singal DP, Blajchman MA. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. 1973 Jun;22(6):429–32.
13. Field LL. Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia*. 2002 Jan;45(1):21–35.
14. Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984 Feb;33(2):176–83.
15. Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with,

- type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet*. 1996 Jul;5(7):1075–80.
16. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2004 Apr;36(4):337–8.
 17. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ, Bailey R, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1074–82.
 18. Todd J a, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):857–64.
 19. Wellcome T, Case T, Consortium C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661–78.
 20. Hakonarson H, Grant SF a, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):591–4.
 21. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med*. 1985 Aug 8;313(6):353–60.
 22. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*. 2003 Mar;46(3):305–21.
 23. Geenen V. Thymus and type 1 diabetes: An update. *Diabetes Res Clin Pract*. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Oct;98(1):26–32.
 24. Like AA, Kislauskis E, Williams RR, Rossini AA. Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science*. 1982 May 7;216(4546):644–6.
 25. Georgiou HM, Bellgrau D. Thymus transplantation and disease prevention in the diabetes-prone Bio-Breeding rat. *J Immunol*. 1989 May 15;142(10):3400–5.
 26. Georgiou HM, Mandel TE. Induction of insulinitis in athymic (nude) mice. The effect of NOD thymus and pancreas transplantation. *Diabetes*. 1995 Jan;44(1):49–59.
 27. Matsuyama M, Wiadrowski MN, Metcalf D. Autoradiographic analysis of lymphopoiesis and lymphocyte migration in mice bearing multiple thymus grafts. *J Exp Med*. 1966 Mar 1;123(3):559–76.
 28. Shortman K, Jackson H. The differentiation of T lymphocytes. I. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. *Cell Immunol*. 1974 May;12(2):230–46.
 29. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 1994 Nov 3;372(6501):100–3.
 30. Benoist C, Mathis D. Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell*. 1989 Sep 22;58(6):1027–33.
 31. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. Positive selection of thymocytes. *Annu Rev*

- Immunol. 1995 Jan;13:93–126.
32. Pircher H, Bürki K, Lang R, Hengartner H, Zinkernagel RM. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*. 1989 Nov 30;342(6249):559–61.
 33. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987 Apr 24;49(2):273–80.
 34. Smith KM, Olson DC, Hirose R, Hanahan D. Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol*. 1997 Sep;9(9):1355–65.
 35. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2009 Dec;9(12):833–44.
 36. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):301–6.
 37. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*. 2002 Aug;3(8):756–63.
 38. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 2002 Nov 15;298(5597):1395–401.
 39. Björnses P, Aaltonen J, Horelli-Kuitunen N, Yaspo ML, Peltonen L. Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity. *Hum Mol Genet*. 1998 Jan;7(10):1547–53.
 40. Pitkänen J, Peterson P. Autoimmune regulator: from loss of function to autoimmunity. *Genes Immun*. 2003 Jan;4(1):12–21.
 41. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*. 2008 Sep 18;455(7211):396–400.
 42. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005 Jan;23:975–1028.
 43. Tewari MK, Sinnathamby G, Rajagopal D, Eisenlohr LC. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol*. 2005 Mar;6(3):287–94.
 44. Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, et al. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity*. 2005 May;22(5):571–81.
 45. Brazil MI, Weiss S, Stockinger B. Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol*. 1997 Jun;27(6):1506–14.
 46. Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, et al. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol*. 2003 May;33(5):1250–9.
 47. Dörfel D, Appel S, Grünebach F, Weck MM, Müller MR, Heine A, et al. Processing

- and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood*. 2005 Apr 15;105(8):3199–205.
48. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*. 2005 Jan 28;307(5709):593–6.
 49. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 31;102(22):7922–7.
 50. Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 2007 Jan;26(1):79–92.
 51. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728–41.
 52. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):463–77.
 53. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004 Mar;15(3):1101–11.
 54. Klein L, Roettinger B, Kyewski B. Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance. *Eur J Immunol*. 2001 Aug;31(8):2476–86.
 55. Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T, et al. Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. *J Immunol*. 2009 Dec 1;183(11):7278–85.
 56. Nedjic J, Aichinger M, Mizushima N, Klein L. Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol*. 2009 Feb;21(1):92–7.
 57. Sukserree S, Mildner M, Rossiter H, Pammer J, Zhang C-F, Watanapokasin R, et al. Autophagy in the thymic epithelium is dispensable for the development of self-tolerance in a novel mouse model. *PLoS One*. 2012 Jan;7(6):e38933.
 58. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Nov;8(11):931–7.
 59. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2491–502.
 60. Bradfield JP, Qu H-Q, Wang K, Zhang H, Sleiman PM, Kim CE, et al. A genome-wide meta-analysis of six type 1 diabetes cohorts identifies multiple associated loci. *PLoS Genet*. 2011 Sep;7(9):e1002293.
 61. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC a, Patsopoulos N a, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 Aug 11;476(7359):214–9.
 62. Winkler C, Krumsiek J, Lempainen J, Achenbach P, Grallert H, Giannopoulou E, et al. A strategy for combining minor genetic susceptibility genes to improve prediction of disease in type 1 diabetes. *Genes Immun. Nature Publishing*

- Group; 2012 Oct;13(7):549–55.
63. Communication S. The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes. *Genes Immun.* 2009 Jan;10(1):11–4.
 64. Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung S a, Sun X, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2009 Nov;41(11):1228–33.
 65. Mells GF, Floyd J a B, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin S-Y, et al. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2011 Apr;43(4):329–32.
 66. Skinningsrud B, Lie B a, Husebye ES, Kvien TK, Førre Ø, Flatø B, et al. A CLEC16A variant confers risk for juvenile idiopathic arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Aug;69(8):1471–4.
 67. Swanberg M, McGuigan FE, Ivaska KK, Gerdhem P, Akesson K. Polymorphisms in the Inflammatory Genes CIITA, CLEC16A and IFNG Influence BMD, Bone Loss and Fracture in Elderly Women. *PLoS One.* 2012 Jan;7(10):e47964.
 68. Ensembl genome browser: CLEC16A [Internet]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000038532;r=16:11038345-11276046
 69. National Center for Biotechnology Information: CLEC16A [Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_015226.2
 70. BioGPS Gene Annotation Portal: CLEC16A [Internet]. Available from: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=23274>
 71. Berge T, Leikfoss IS, Harbo HF. From Identification to Characterization of the Multiple Sclerosis Susceptibility Gene CLEC16A. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan;14(3):4476–97.
 72. Tomlinson MJ, Pitsillides A, Pickin R, Mika M, Keene K, Hou X, et al. Fine Mapping and Functional Studies of Risk Variants for Type 1 Diabetes at Chromosome 16p13.13. *Diabetes.* 2014 Jul 9;1–37.
 73. Fujikado N, Saijo S, Yonezawa T, Shimamori K, Ishii A, Sugai S, et al. Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):176–80.
 74. McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol.* 2004 Nov;41(11):1109–21.
 75. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 2005 Dec;272(24):6179–217.
 76. Zouk H, D’Hennezel E, Du X, Ounissi-Benkhalha H, Piccirillo C a, Polychronakos C. Functional evaluation of the role of C-type lectin domain family 16A at the chromosome 16p13 locus. *Clin Exp Immunol.* 2014 Mar;175(3):485–97.
 77. Underhill DM, Goodridge HS. The many faces of ITAMs. *Trends Immunol.* 2007 Feb;28(2):66–73.
 78. Schuster C, Gerold KD, Schober K, Probst L, Boerner K, Kim M-J, et al. The Autoimmunity-Associated Gene CLEC16A Modulates Thymic Epithelial Cell

- Autophagy and Alters T Cell Selection. *Immunity*. Elsevier Inc.; 2015;42(5):942–52.
79. Kim S, Wairkar YP, Daniels RW, DiAntonio A. The novel endosomal membrane protein Ema interacts with the class C Vps-HOPS complex to promote endosomal maturation. *J Cell Biol*. 2010 Mar 8;188(5):717–34.
 80. Kim S, Naylor SA, DiAntonio A. Drosophila Golgi membrane protein Ema promotes autophagosomal growth and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 1;109(18):E1072-81.
 81. Fire a, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*. 1991 Oct;113(2):503–14.
 82. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806–11.
 83. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):343–9.
 84. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*. 2005 Mar 1;19(5):517–29.
 85. Kissler S. From genome-wide association studies to etiology: probing autoimmunity genes by RNAi. *Trends Mol Med*. Elsevier Ltd; 2011 Nov;17(11):634–40.
 86. Leirdal M, Sioud M. Gene silencing in mammalian cells by preformed small RNA duplexes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jul 19;295(3):744–8.
 87. Gerold KD, Zheng P, Rainbow DB, Zerneck A, Wicker LS, Kissler S. The soluble CTLA-4 splice variant protects from type 1 diabetes and potentiates regulatory T-cell function. *Diabetes*. 2011 Jul;60(7):1955–63.
 88. Fellmann C, Zuber J, McJunkin K, Chang K, Malone CD, Dickins RA, et al. Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay. *Mol Cell*. 2011 Mar 18;41(6):733–46.
 89. Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilesley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods*. 2006 Mar;3(3):199–204.
 90. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977 Jul;36(1):59–74.
 91. Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*. 1997 Jul 7;233(2):423–9.
 92. Davis MM. A prescription for human immunology. *Immunity*. 2008 Dec 19;29(6):835–8.
 93. Anderson MS, Bluestone J. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005 Jan;23:447–85.
 94. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980 Jan;29(1):1–13.

95. Wekerle H, Flügel A, Fugger L, Schett G, Serreze D. Autoimmunity's next top models. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2012 Jan;18(1):66–70.
96. Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol*. 1995 Jan;13:179–200.
97. Guerau-de-Arellano M, Martinic M, Benoist C, Mathis D. Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1245–52.
98. Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol*. 1992 Jan;51:285–322.
99. Gerold K. CTLA4 and CLEC16A in Type 1 Diabetes Looking behind the association. University of Würzburg; 2011.
100. Ensembl genome browser: Clec16a [Internet]. Available from: http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000068663;r=16:10545339-10744878
101. Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*. 2007;3(3):181–206.
102. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):313–26.
103. Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol*. 1995 Jan;66(1):3–14.
104. Munafó DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 20):3619–29.
105. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto a, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000 Nov 1;19(21):5720–8.
106. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445–544.
107. He H, Dang Y, Dai F, Guo Z, Wu J, She X, et al. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem*. 2003 Aug 1;278(31):29278–87.
108. Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. 1st ed. Vol. 452, *Methods in enzymology*. Elsevier Inc.; 2009. 1-12 p.
109. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008 Jan;445(2):77–88.
110. Kuma A, Matsui M, Mizushima N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy*. 2007;3(4):323–8.
111. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21;171(4):603–14.

112. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007 Aug 17;282(33):24131-45.
113. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-5.
114. Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Kohtz S, Mizushima N, Cristea IM, et al. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci*. 2006 Aug 2;26(31):8057-68.
115. Kuusisto E, Suuronen T, Salminen a. Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12;280(1):223-8.
116. Bardag-Gorce F, Francis T, Nan L, Li J, He Lue Y, French B a, et al. Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life Sci*. 2005 Sep 30;77(20):2594-602.
117. Nakaso K, Yoshimoto Y, Nakano T, Takeshima T, Fukuhara Y, Yasui K, et al. Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease. *Brain Res*. 2004 Jun 25;1012(1-2):42-51.
118. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):237-48.
119. Promega: Transfection [Internet]. Available from: <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/>
120. Amaxa transfection guide [Internet]. Available from: [http://teachers.sduhsd.net/ahaas/Quest Rsearch Methods/stem cells cell culture/TechRefGuide_AnIntroTransMeth.pdf](http://teachers.sduhsd.net/ahaas/Quest%20Research%20Methods/stem%20cells%20cell%20culture/TechRefGuide_AnIntroTransMeth.pdf)
121. Burnet FM. A reassessment of the forbidden clone hypothesis of autoimmune disease. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1972 Feb;50(1):1-9.
122. Soleimanpour S a, Gupta A, Bakay M, Ferrari AM, Groff DN, Fadista J, et al. The diabetes susceptibility gene *clec16a* regulates mitophagy. *Cell*. 2014 Jun 19;157(7):1577-90.
123. Zhou X, Lu X, Lv J, Yang H, Qin L, Zhao M, et al. Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jul;70(7):1330-7.
124. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*. 2002 Dec;27(6):421-9.
125. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature*. 2005 May 12;435(7039):220-3.
126. Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, et al. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*. 2005 May 12;435(7039):224-8.

127. Sabater L, Ferrer-Francesch X, Sospedra M, Caro P, Juan M, Pujol-Borrell R. Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus. *J Autoimmun.* 2005 Dec;25(4):312–8.
128. Fan Y, Rudert W a, Grupillo M, He J, Sisino G, Trucco M. Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J.* Nature Publishing Group; 2009 Sep 16;28(18):2812–24.
129. Fousteri G, Jasinski J, Dave A, Nakayama M, Pagni P, Lambolez F, et al. Following the fate of one insulin-reactive CD4 T cell: conversion into Tregs and Tregs in the periphery controls diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2012 May;61(5):1169–79.
130. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med.* 1933 Jun 30;58(1):39–53.
131. Shaw SY, Tran K, Castoreno AB, Peloquin JM, Lassen KG, Khor B, et al. Selective modulation of autophagy, innate immunity, and adaptive immunity by small molecules. *ACS Chem Biol.* 2013;8(12):2724–33.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Martin Fassnacht und Prof. Dr. Stephan Kissler. Martin Fassnacht für seine Bereitschaft, die Promotion unter in mehrfacher Hinsicht ungewöhnlichen Umständen als Doktorvater von Deutschland aus zu betreuen. Stephan Kissler für seine Bereitschaft, mich als forschungsunerfahrenen Studenten in sein junges Labor in den USA aufzunehmen und dort den experimentellen Teil meiner Arbeit anfertigen zu lassen. Seiner ruhigen Ausstrahlung während der Aufbauzeit des Labors und hapernden Experimenten, seiner immer offenen Tür, seiner Expertise. Auch Prof. Dr. Bruno Allolio möchte ich danken, der sich zunächst bereit erklärt hatte, die Arbeit zu betreuen.

Großen Dank bin ich auch Dr. Celia Caballero-Franco und Dr. Cornelia Schuster vom „Kissler lab“ schuldig. Sie brachten mir die praktische Umsetzung von Experimenten bei, mit bemerkenswert großer Geduld.

Vom Immunologieflur des Joslin Diabetes Center möchte ich danken: Jade Doolan für ihre infrastrukturelle und persönliche Unterstützung; Dr. Eric Vroegindeweij und Dr. Mi-Jeong Kim, die mir bei der Mikroskopie halfen; Dr. Tata Nageswara Rao für seine Hilfsbereitschaft und seine Antikörper; und Prof. Dr. Aldo Rossini, für seine konstruktive Kritik.

Mit Dipl.-Math. Johannes Hain vom Lehrstuhl für Mathematik VIII (Statistik) der Universität Würzburg hielt ich Rücksprache bezüglich der angewandten statistischen Tests.

Das Cusanuswerk unterstützte den Forschungsaufenthalt in Boston mit einem Forschungsstipendium.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern verdanke ich neben so vielem meine Ausbildung und damit die Wurzeln dieser Arbeit.