

**Die Aktivierung von RIG-I durch 5'-triphosphorylierte
doppelsträngige RNA schützt vor einer letalen
Influenza Virus Infektion und bakteriellen
Superinfektion in vivo**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Jan-Phillip Weber, geb. Stümpel

aus Burgwedel

2023

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann
2. Gutachter: PD Dr. Felix Jansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.03.2023

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 1. Deutsche Zusammenfassung | 6 |
| 1.1 Einleitung | 6 |
| 1.2 Material und Methoden | 10 |
| 1.3 Ergebnisse | 12 |
| 1.4 Diskussion | 18 |
| 1.5 Zusammenfassung | 22 |
| 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung | 24 |
| 2. Veröffentlichung | 31 |
| Abstract | 31 |
| Introduction | 31 |
| Results | 32 |
| Discussion | 34 |
| Material and Methods | 38 |
| References | 39 |
| 3. Danksagung | 42 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| 3pRNA | 5'-triphosphorylierte doppelsträngige RNA |
| 9.2 s-RNA | RNA-Oligonukleotid und TLR7/8 Ligand |
| 20CA-RNA | Doppelsträngige 20-Basen 5'-Cytosin-Adenin RNA |
| C57BL/6 | C57 Black 6 Labormaus |
| CpG1826 | 1826 Basenpaare lange Cytosin-Guanin Sequenz mit Phosphatbindung zwischen den Basen |
| CXCL10 | C-X-C motif chemokine 10 (anderer Name: IP-10) |
| CFU | Colony forming units (Bakterien-Anzahl) |
| DOTAP | (1,2-Di-(9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammoniumpropan- Methylsulfat) = ein Transfektionsreagenz für Säugetierzellen der ersten Generation |
| ELISA | Enzym-linked immunosorbent Assay |
| hvPR/8 | Highly viral Puerto Rico 8 Influenza H1N1 |
| IFN | Interferon |
| Mx1 | Gen für das Interferon-induzierte GTP-bindende Protein Mx1 |
| MxA | Synonymer Wortgebrauch für Mx1 im humanen Modell |
| MDA5 | Melanoma-differentiation-associated protein 5 |
| NF-κB | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NS1 | Nicht-strukturelles Protein 1 |
| PFU | Pathology forming units (hier = Anzahl der Viren) |

| | |
|--------|--|
| PolyCA | Doppelsträngige 5'-Cytosin-Adenin RNA |
| PRR | Pattern-Recognition-Receptor |
| qPCR | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| RIG-I | Retinoic-acid-inducible gene I |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Setdb2 | SET Domain bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 2 |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TBP | TATA Box bindendes Protein |

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Form der Dissertation

Bei der vorgelegten Dissertation handelt es sich um eine Publikationsdissertation mit geteilter Erstautorenschaft. Der überwiegende Anteil der wissenschaftlichen Arbeit, insbesondere die Planung, Durchführung und Auswertung der gezeigten Versuche wurde hierbei vom Verfasser dieser Arbeit ausgeführt. In Kapitel 1 der vorlegten Arbeit werden die wissenschaftlichen Erkenntnisse der in Kapitel 2 gezeigten Publikation zusammengefasst und erläutert.

1.1.2 Influenza

Die Influenza A führt zu schweren systemischen und respiratorischen Infektionen und tritt in Abständen nicht nur als Epidemie sondern auch als Pandemie in Erscheinung.

Das Influenza Virus weist eine hohe genetische Variabilität auf und ist dadurch in der Lage die Oberflächenantigene, einschließlich des Hämagglutinins, langsam über die Jahre („antigenic drift“) oder auch sprunghaft zu verändern und neu zu kombinieren („antigenic shift“). Aufgrund dieser hohen Antigen-Variabilität des Influenza Virus muss die existierende Vakzine jährlich neu angepasst werden, um grundsätzlich wirksam zu bleiben. Die genaue Wirksamkeit der Vakzinierung schwankt jedoch in Abhängigkeit der Virusvariabilität und je nachdem wie es gelingt die Veränderungen des Virus prädiktiv zu erfassen. Damit wird eine jährliche Impfung erforderlich mit unterschiedlicher Wirksamkeit, wodurch der Prophylaxe gegen das Influenzavirus über eine Vakzine Grenzen gesetzt sind (Glezen, 2008; Hayden und Jong, 2011). Dies zusammen mit einer zunehmenden Mortalität und Morbidität sowie zunehmenden Kosten im Gesundheitsbereich (Bautista et al., 2010; Dawood et al., 2009) sowie eine jährliche Schwankung der gemeldeten Influenza Fälle mit unvorhergesehenen Mortalitätsspitzen wie in der Saison 2017/2018 (RKI Arbeitsgemeinschaft Influenza), machen die Entwicklung neuer Behandlungs- und Prophylaxe-Strategien dringend notwendig. Insbesondere da die zur Verfügung stehende Therapie mit Neuraminidasehemmern nur bei Verabreichung innerhalb der frühen Infektionsphase einen positiven Effekt auf den

Verlauf einer Influenza Erkrankung ausübt und überdies zu teilweise schweren u.a. gastrointestinalen und psychiatrischen Nebenwirkungen führen kann (Heneghan et al., 2016).

1.1.3 Zelluläre Viruserkennung und RIG-I

Das Immunsystem soll den Organismus vor pathogenen Erregern schützen. Es besteht aus dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem. Das angeborene Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Barrieren wie Haut und Schleimhäuten sowie zelluläre und molekulare Abwehrmechanismen wie Phagozyten, Granulozyten und antimikrobiellen Proteinen. Das angeborene Immunsystem hat zudem die Aufgabe pathogene Erreger zu erkennen und eine adaptive Immunantwort zu initiieren. Das adaptive Immunsystem schützt durch die Bildung von spezifischen Antikörpern durch die B-Zellen/ Plasmazellen und durch das Abtöten von infizierten Zellen über eine spezifische T-Zell Antwort. Erst durch das Zusammenspiel von angeborenem und adaptiven Immunsystem ist eine effektive Abwehr von Pathogenen wie dem Influenzavirus möglich. Die Erkennung der Krankheitserreger und die Initiierung des adaptiven Immunsystems durch das angeborene Immunsystem wird durch die so genannten ‚Pattern Recognition Rezeptoren‘ (PRR) ermöglicht. Die PRR erkennen Strukturen, die charakteristisch für Krankheitserreger sind (z.B. LPS) oder sich in einer abnormalen Lokalisation in der Zelle befinden (z.B. DNA im Zytosol). Zur Detektion von viralen Erregern, spielen die Nukleinsäure-erkennenden PRR eine wichtige Rolle, bei der Erkennung von Influenza Viren insbesondere der Rezeptor Retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I). Er ist im Zytosol lokalisiert, wo auch die Virusreplikation des Influenzavirus stattfindet. Der RIG-I Rezeptor wird durch kurzkettige, doppelsträngige RNA welche am 5'-Ende triphosphoryliert ist (3pRNA) aktiviert (Hornung et al., 2006; Schlee et al., 2009). Genau diese 3pRNA wird bei der intrazellulären Virusreplikation des Influenza Virus gebildet und kann vom RIG-I Rezeptor erkannt werden. Da eine ungeschützte 3pRNA physiologisch nicht in der Zelle vorkommt, kann die Zelle durch RIG-I eine Infektion durch Influenza (oder andere RNA Viren) detektieren. Durch die Aktivierung von RIG-I werden zahlreiche antivirale und proinflammatorische Proteine exprimiert, wie zum Beispiel Typ I Interferon, Interferon- λ , Mx-Proteine oder Adenosin-Deaminasen, die dann zu einer direkten antiviralen Wirkung

sowie zu der oben beschriebenen Aktivierung des adaptiven Immunsystems führen (Ramos und Gale, 2011).

1.1.4 Inhibierung des Immunsystems durch Influenza

Um der körpereigenen Immunabwehr zu entgehen und erfolgreich eine Infektion der Zelle durchführen zu können, hat das Influenzavirus eine Reihe von Mechanismen entwickelt um die Initiierung einer Immunantwort zu behindern. Unter anderem bildet das Influenzavirus das Nicht-strukturelle Protein 1 (NS1), welches potent die RIG-I Aktivierung inhibiert, so dass dessen antivirale Effekte ausbleiben und die Virusreplikation ungehindert bleibt (Mibayashi et al., 2007; Ramos und Gale, 2011). Auch die Polymerase PB1/PA des Influenza A Virus kann bestimmte Aminosäure-Sequenzen enthalten, die eine frühzeitige Typ I-Interferon Antwort durch die Zelle blockieren (Liedmann et al., 2014a). So kann die Virusreplikation in der frühen Phase der Infektion ungehindert ablaufen. Durch diese Mechanismen, den sogenannten Virulenzfaktoren des Influenzavirus, kann es zu schwereren klinischen Verläufen bis hin zu pandemischen Ausbrüchen des Virus kommen (Liedmann et al., 2014b).

1.1.5 Fragestellung der Arbeit

Aus dem oben Gesagten ergibt sich, dass neue Formen der Prophylaxe und Therapie gegen das Influenza Virus dringend erforderlich sind, deren Wirkung nicht durch die genetische Variabilität eingeschränkt wird und welche die Behinderung der Immunantwort durch das Influenzavirus überkommen. Eine gezielte Aktivierung der körpereigenen Virus-Erkennungsrezeptoren, die eine Immunantwort gegen Influenza auslöst und durch das Influenzavirus unterdrückt wird, bildet daher einen neuen vielversprechenden Ansatz zur Bekämpfung der potentiell tödlich verlaufenden Erkrankung. Hier bietet sich die Verwendung von synthetischer 3pRNA zur Aktivierung von RIG-I an. Von anderen Arbeitsgruppen wurde bereits untersucht, dass die Aktivierung von RIG-I die Viruslast bei einer Influenzainfektion im Mausmodell und in A549 Zellen senkt (Chakravarthy et al., 2010; Goulet et al., 2013). Allerdings wurde nicht gezeigt, ob diese Behandlung einen Überlebensvorteil in einem prophylaktischen versus einem therapeutischen Setting bietet. Zudem wurde kein physiologisches Mausmodell (keine Expression von Mx1) verwendet. Darüber hinaus wurde keine klar definierte synthetische 3pRNA verwendet, sondern nur

enzymatisch hergestellte 3pRNA, die i.d.R. einen gemischten RIG-I + TLR7/8-Ligand darstellt. Außerdem wurde kein Vergleich mit anderen PRR vorgenommen. In dieser Arbeit soll daher in einem relevanten präklinischen Tiermodell (der Mx1 positiven Maus) untersucht werden, ob die Applikation einer synthetischen 3pRNA und damit reinen RIG-I Liganden eine neue potentielle prophylaktische sowie eine therapeutische Behandlung gegen die Influenzainfektion darstellt. Dazu wurden folgende Fragestellungen im Einzelnen bearbeitet:

- Schützt die Behandlung mit 3pRNA vor einem letalen Verlauf der Influenzainfektion in einem prophylaktischen bzw. therapeutischen Einsatz im Mx1 positiven bzw. negativen Mausmodell?
- Wie lange dauert ein prophylaktischer Schutz an und schwächt sich der prophylaktische Schutz durch eine Mehrfachgabe ab?
- Welche Dosis 3pRNA ist für einen Schutz erforderlich?
- Schützt synthetische 3pRNA als reiner RIG-I Ligand genauso wie ein gemischter, enzymatisch-hergestellter RIG-I + TLR7 Ligand?
- Ist die Wirkung von 3pRNA abhängig von Typ I IFN bzw. lambda IFN?
- Ist die Wirkung von 3pRNA vergleichbar mit der Wirkung von Liganden anderer antiviraler PRR?
- Schützt die Behandlung mit 3pRNA nicht nur vor der Influenzainfektion, sondern zusätzlich vor einer bakteriellen Superinfektion, welche eine häufige und klinisch relevante Komplikation darstellt?

1.2 Material und Methoden

Zur Virusinfektion mit Influenza Typ A H1N1 wurden 10 - 12 Wochen alte Mäuse unter Isofluran® Narkose mit einer nicht-letalen Dosis von 10^5 pathology forming units (PFU) des Stammes A/PR/8/34 sowie einer letalen Influenza Dosis von 10^3 PFU der Variante hvPR/8 intranasal inokuliert. Die hvPR/8 Variante des Influenza Typ A Virus zeigt nach mehrfacher Passage in Mäuselungen eine gegenüber der Standardvariante des Cambridge Stammes A/PR/8/34 H1N1 gesteigerte Virulenz und führt in Mäusen bereits bei geringer Infektionslast zu tödlichen Krankheitsverläufen (Grimm et al., 2007) (siehe Kapitel 2, Seite 38, Absatz 4). Zur Simulation einer bakteriellen Superinfektion wurde *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 mit $4,4 \times 10^6$ colony forming units (CFU) intranasal inokuliert.

Die Viruslast wurde in den infizierten Mauslungen mittels Realtime qPCR gegen eine Standardkurve quantifiziert. Die Menge von exprimiertem, murinem CXCL10 wurde gegen das murine TATA Box bindende Protein (TBP) mittels Realtime qPCR quantifiziert sowie mittels Enzym-linked immunosorbent Assay (ELISA) (BD Biosciences) gemessen (siehe Kapitel 2, Seite 39, Absatz 5).

Als Mausmodell wurden jeweils Typ I Interferon und Interferon- λ Rezeptor positive oder Rezeptor-defiziente B6.A2G-Mx1 verwendet. Als Mx1 negative Kontrollen wurden C57BL/6 Mäuse benutzt (Grimm et al., 2007; Pavlovic et al., 1992; Goulet et al., 2013). Die Genehmigung der Tierstudien erfolgte durch den Tierversuchsantrag mit dem Aktenzeichen 887- 50103709110 und G13/54.

Zur Stimulation von RIG-I wurden zum einen chemisch synthetisierte 3pRNA (Goldeck et al., 2014a; Goldeck et al., 2014b; Schlee et al., 2009) verwendet als auch enzymatisch durch in vitro Transkription hergestellte 3pRNA. Mittels des bei Schlee et al. 2009 beschriebenen Protokolls wird die in vitro transkribierte 3pRNA mit einem kommerziell erhältlichen T7-Transkriptionskit hergestellt. Hierbei wird eine spezifische T7-Promoter-Template Sequenz (5'-TGT GTG TGT GTG TGT GTG TGT GTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC TG-3') mit der im Kit enthaltenen reversen Transkriptase in vitro hergestellt und anschließend purifiziert (Schlee et al., 2009) (siehe Kapitel 2, Seite 39, Absatz 2).

Die 3pRNA Produkte wurden analog zur Produktempfehlung mittels JetPEI® komplexiert und intravenös verabreicht. Das nicht RIG-I-aktivierende Kontroll-Oligonukleotid 20CA-RNA wurde ebenfalls mittel JetPEI® verabreicht. Die zum therapeutischen Vergleich verwendeten, publizierten TLR9 und TLR7/8 Liganden CpG1826 und 9.2 s-RNA (5'-AGCUUAACCUGUCCUCAA-3' (sense)) (Biomers GmbH) (Hornung et al., 2005) wurden unkomplexiert subkutan gegeben (TLR9) oder mit DOTAP komplexiert intravenös (TLR7/8) verabreicht.

Der klinische Verlauf der Infektion wurde täglich mittels Gewichtsverlauf sowie einem klinischen Bewertungssystem aus 5 Stufen ausgewertet. (0 = symptomfrei, 1 = leicht zerzaustes Fell, 2 = zerzaustes Fell mit Zittern 3 = zerzaustes Fell mit Inaktivität und langsamen Bewegungen 4 = zerzaustes Fell mit Buckelbildung und Apathie, 5 = tot) (Humphreys et al., 2003) (siehe Kapitel 2, Seite 38, Absatz 5).

Zur statistischen Analyse wurde bei abhängigen Variablen ein student's t-Test verwendet. Bei multiplen Paarvergleichen wurde die einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit Tukey's oder Holm-Sidak's Test angewendet. Die Überlebenskurven wurden mittels log rank Mantel-Cox Test analysiert. Als Signifikanz-Niveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Die prophylaktische Applikation von 3pRNA verbessert den klinischen Verlauf einer nicht-letalen Influenza Virus Infektion in vivo in Mx1 negativen C57BL/6 Mäusen

Um zu zeigen, dass der RIG-I Ligand 3pRNA in vivo in der Lage ist den Rezeptor zu stimulieren und eine antivirale Immunreaktion zu induzieren, injizierten wir C57BL/6 Mäusen 25 µg mit JetPEI® komplexierter 3pRNA intravenös und analysierten die Induktion des Typ I Interferon abhängigen Gens CXCL10 als Indikator für eine Typ I IFN Antwort. Sechs Stunden nach der Injektion konnten wir mittels qPCR einen deutlichen Anstieg der CXCL10 Expression in den Lungen der stimulierten Mäuse nachweisen. Als Negativkontrolle diente eine nicht-stimulatorische RNA mit einer 20 Basenpaare langen Cytosin-Adenin Abfolge, die eine deutlich geringere CXCL10 Expression zeigte. Diese Negativkontrolle wurde in den weiteren Versuchen ebenfalls benutzt.

Um im nächsten Schritt eine antivirale Wirkung der immunstimulatorischen 3pRNA gegen das Influenza Virus zu zeigen, untersuchten wir zunächst Mx1 negative C57BL/6 Mäuse, die häufig für immunologische Untersuchungen verwendet werden. Sechs Stunden vor einer intranasalen, nicht-letalen Influenza hvPR/8 Infektion applizierten wir den Mäusen intravenös 25 µg komplexierte 3pRNA. Der klinische Verlauf wurde anhand des Gewichtsverlaufs der Mäuse sowie eines klinischen Bewertungssystems analysiert (Humphreys et al., 2003). Die prophylaktische Gabe von 3pRNA führte zu einem reduzierten Gewichtsverlust, d.h. einem milderem Krankheitsverlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe in vivo (siehe Kapitel 2, Seite 33, Abbildung 1).

1.3.2 Die prophylaktische Applikation von 3pRNA schützt mehrere Tage vor einer letalen Influenza Virus Infektion in vivo in Mx1 positiven Mäusen

Im Mx1 negativen C57BL/6 Maus-Modell waren wir nicht in der Lage die Mäuse mit 3pRNA gegen eine letale Dosis des Influenza Virus zu schützen. Weder prophylaktisch konnten die Mäuse vor einer Infektion geschützt werden noch konnte der klinische Verlauf einer Infektion therapeutisch gebessert werden. Es ist in der Literatur beschrieben, dass

das Mx1 Protein in Mäusen eine dem MxA Protein im Menschen vergleichbare Rolle in der Typ I Interferon abhängigen antiviralen Immunantwort spielt (Pavlovic et al., 1992). In Mx1 negativen Mäusen kann daher bei Abwesenheit dieses zentralen Regulationsproteins der Typ I Interferon Antwort keine ausreichende Virusabwehr erreicht werden. In den weiteren Versuchen wurden daher statt C57BL/6 Mäuse die Mx1 homozygot positiven B6.A2G-Mx1 verwendet, da die antivirale Immunantwort, die durch Typ I IFN abhängige Therapien induziert wird, in diesem Modell deutlich effektiver ist und der menschlichen Virusabwehr mehr ähnelt (Grimm et al., 2007; Pavlovic et al., 1990; Staeheli et al., 1985; Zürcher et al., 1992). Zum Nachweis des letalitätssenkenden Effekts der 3pRNA infizierten wir Mäuse mit einer mehrfach in Mäuselungen passagierten und damit virulenteren Influenza Typ A Variante, hvPR/8 genannt, um die Mäuse einer in der Literatur vorbeschriebenen höheren Letalität auszusetzen (Grimm et al., 2007).

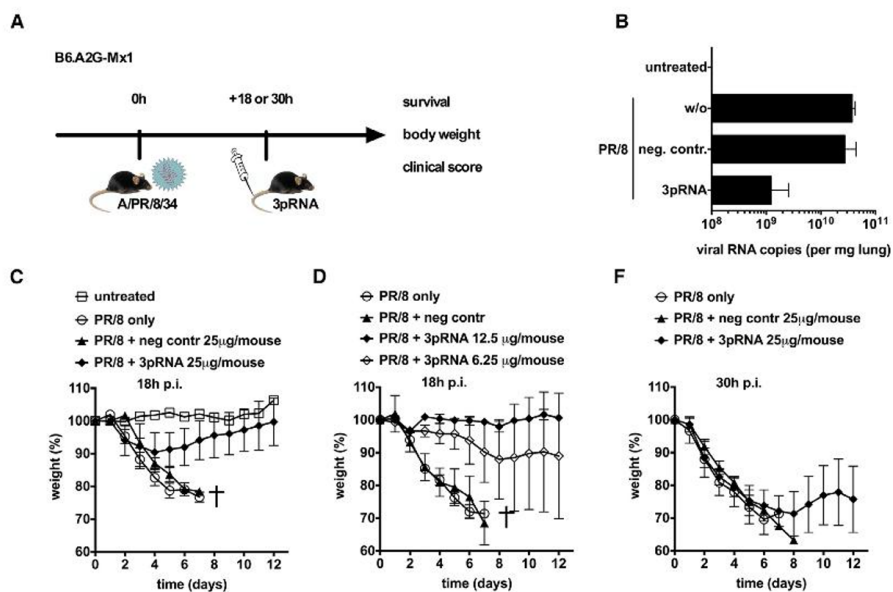
Zur Ermittlung, ob und wenn ja wie lange eine systemische 3pRNA Applikation in dem Mx1 positiven Mausmodell vor einer letalen Dosis des Influenza Virus schützt, applizierten wir intravenös 25 µg der mit JetPEI® komplexierten 3pRNA an Tag 7, Tag 3 oder einen Tag vor einer Influenza Virus Infektion. Es konnte gezeigt werden, dass die Mäuse nach nur einer einzelnen Injektion mit 3pRNA für mindestens sieben Tage vor dem tödlichen Verlauf einer Influenza geschützt sind (siehe Kapitel 2, Seite 34, Abbildung 2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die wiederholte intravenöse Applikation von komplexierter 3pRNA an den Tagen 1, 3, 5 und 7 vor einer Infektion den Schutz nicht abschwächt. Eine Desensibilisierung der RIG-I abhängigen Immunantwort (Tachyphylaxie) trat nicht auf. Zur Kontrolle des Infektionsverlaufs, der in der Regel für die Mäuse letalen Virusinfektion, verwendeten wir hier genauso wie in den weiteren Versuchen infizierte Mäuse, bei denen keine Applikation von Oligonukleotiden vorgenommen wurde.

1.3.3 Die therapeutische Applikation von 3pRNA schützt vor einer letalen Influenza Virus Infektion in vivo in Mx1 positiven Mäusen

Im Falle einer erfolgreichen Infektion des Wirts durch das Influenza Virus A wird das NS1-Protein gebildet und dadurch im frühen Infektionsverlauf eine RIG-I-induzierte Abwehr des Virus durch die befallene Zelle verhindert bzw. erschwert (Chakravarthy et al., 2010;

Mibayashi et al., 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass innerhalb eines gewissen Zeitfensters nach Infektion eine systemische RIG-I Aktivierung mittels intravenös applizierter 3pRNA einen tödlichen Krankheitsverlauf auch nach einer erfolgten Infektion verhindert. Hierfür injizierten wir B6.A2G-Mx1 Mäusen unterschiedliche Dosierungen von 3pRNA entweder 18 oder 30 Stunden nach einer potentiell letalen Influenza Virus Infektion. Bereits fünf Tage nach 3pRNA Applikation konnte eine deutlich reduzierte Viruslast im Vergleich zur Kontrollgruppe, die inerte RNA (polyCA) injiziert bekam mittels Realtime qPCR in den Mauslungen gemessen werden. Im weiteren Verlauf zeigte die Gewichtskurve sowie das klinische Bewertungssystem einen milderen Verlauf der Infektion, wenn eine Therapie mit 3pRNA durchgeführt wurde (siehe Abbildung 1).

Abb. 1:



(A) Versuchsaufbau: Injektion der 3pRNA 18h und 30h nach der Infektion mit Influenza A/PR/8/34 (B) Viruslast gemessen mittels qPCR aus Lungengewebe von n = 4 Mäusen 5 Tage nach Infektion (C)(D)(F) Gewichtsverläufe von n = 6 Mäusen nach Influenza Infektion und Injektion verschiedener Dosisstufen von 3pRNA sowie Kontrollgruppen. (Abbildungsquelle: Coch et al., 2017. Siehe Kapitel 2, Seite 35 und 36, Abbildung 3).

Passend dazu war die 3pRNA in der Lage das Überleben der Tiere zu verbessern und einen letalen Verlauf der Infektion zu verhindern. Dabei sank der therapeutische Effekt mit abnehmender Dosis sowie mit zunehmendem Abstand zur Infektion. Es konnte

gezeigt werden, dass selbst die niedrigste 3pRNA Dosierung (6,25 µg) sowie eine Applikation 30 Stunden nach Infektion eine das Überleben verbessert. Hierfür war lediglich eine Applikation von 3pRNA notwendig. Der prophylaktische Schutz der 3pRNA vor einer schwer verlaufenden Infektion als auch der therapeutische Nutzen konnte sowohl für die in vitro transkribierte 3pRNA (Schlee et al., 2009) als auch für die synthetisch erzeugte 3pRNA gezeigt werden. Da die synthetisch erzeugte 3pRNA ein reiner RIG-I Ligand ohne TLR7 oder 8 Aktivität ist, belegt dies, dass die Aktivierung von RIG-I für den therapeutischen Effekt ausreichend ist und keine zusätzliche TLR7 oder 8 Aktivität erforderlich ist (Goldeck et al., 2014a; Schuberth-Wagner et al., 2015) (siehe Kapitel 2, Seite 37, Abbildung 5).

1.3.4 Therapeutische Aktivität von 3pRNA ist Interferon Typ I abhängig

Im Rahmen der antiviralen Abwehr von Influenza Viren wurde nicht nur Typ I Interferon, sondern auch Interferon – λ als wichtiges antivirales Zytokin beschrieben (Mordstein et al., 2008; Mordstein et al., 2010). Um zu analysieren, welche dieser antiviralen Schlüsselzytokine bei dem oben beschriebenen durch RIG-I Aktivierung ausgelösten antiviralen Effekt ursächlich beteiligt sind, führten wir Experimente in Mx1 positiven Mäusen durch, die defizient für den Typ I IFN Rezeptor, den Interferon – λ Rezeptor bzw. beide Rezeptoren waren. Wir injizierten hierfür 3pRNA 18h nach einer letalen Influenza Virus Infektion sowohl in Interferon – λ Rezeptor 1 oder Typ I IFN Rezeptor defiziente B6.A2G-Mx1 Mäuse und verfolgten den klinischen Verlauf (siehe Kapitel 2, Seite 38, Abbildung 4). Es zeigte sich, dass Mäuse ohne Interferon – λ Rezeptor durch 3pRNA durch 3pRNA immer noch vor einer Influenza Virus Infektion geschützt waren, wohingegen in Typ I IFN defizienten und doppelt defizienten Tieren kein schützender Effekt mehr vorhanden war. D.h. dass der durch i.v. Applikation von 3pRNA vermittelte Schutz vor einer letalen Influenza Virus Infektion in Abhängigkeit vom Typ I IFN Rezeptor vermittelt wird, aber unabhängig von Interferon – λ ist.

1.3.5 Vergleich vom therapeutischen Effekt gegen eine Influenza Virus Infektion von 3pRNA mit beschriebenen Nukleinsäure-erkennenden TLR-Agonisten

Auch für die Nukleinsäure erkennenden TLR7, 8 und 9 ist ein antiviraler Effekt gegen eine Influenza Virus Infektion beschrieben (Nguyen et al., 2012; St Paul et al., 2012). Im Gegensatz zum zytosolisch lokalisierten Rezeptor RIG-I, sind diese TLR nicht in Epithelzellen, sondern vor allem in spezifischen Immunzellen exprimiert. Um zu untersuchen wie eine Aktivierung dieser TLR im Vergleich zur Aktivierung von RIG-I sich auf eine Influenza Virus Infektion auswirkt, verglichen wir die Aktivierung von TLR7 und 8 durch 9.2 s-RNA (Herberhold et al., 2011; Hornung et al., 2005) sowie die Aktivierung von TLR 9 mit dem Liganden CpG1826 nach dem oben beschriebenen Therapieschema (Manegold et al., 2012; Nichani et al., 2010) mit der systemischen Aktivierung von RIG-I durch 3pRNA in der B6.A2G-Mx1 Maus. Der TLR7/8- sowie der TLR9-Ligand wurden dabei wie in der Literatur beschrieben intravenös bzw. subcutan appliziert. Hierbei ist zu beachten, dass bei dem gemischten TLR7/8 Agonisten 9.2 s-RNA in Mäusen die TLR7 Komponente überwiegt, da TLR8 in Nagetieren keine zum Menschen vergleichbare Aktivität zeigt. Trotz einer signifikanten Erhöhung von CXCL10 im Serum der Mäuse durch 9.2 s-RNA sahen wir keine Verbesserung des klinischen Verlaufs im Vergleich zur Negativkontrolle, wohingegen die 3pRNA erneut den oben beschriebenen therapeutischen Effekt zeigte. Die wie in der Literatur beschrieben durchgeführte Stimulierung von TLR 9 (subkutane Gabe von unkomplexiertem CpG1826) zeigte keine CXCL10 Induktion in der Maus und wirkte sich nicht auf den letalen Influenzaverlauf aus (siehe Kapitel 2, Seite 37, Abbildung 5).

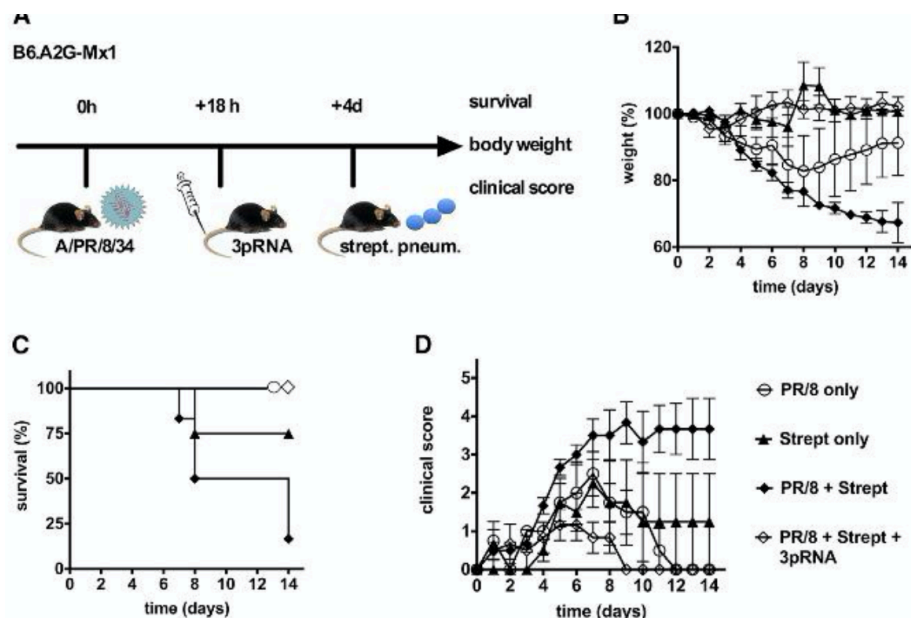
1.3.6 Auswirkung von systemischer RIG-I Aktivierung auf eine Superinfektion mit Streptokokkus pneumoniae bei einer Influenza Virus Infektion

Eine bakterielle Superinfektion der Lunge ist eine gefürchtete und häufige Komplikation der Influenza (Rothberg et al., 2008), z.B. die durch Streptococcus pneumoniae auftritt (Rothberg et al., 2008). Kontrovers diskutiert wird dabei eine ursächliche Verknüpfung der Superinfektion mit der Ausschüttung von Typ I Interferon im Rahmen des Virusinfektes (Li

et al., 2012; Navarini et al., 2006). Wenn Typ I Interferon wie beschrieben die Wahrscheinlichkeit einer bakteriellen Superinfektion erhöht, könnte eine Therapie mit der Typ I Interferon induzierenden RIG-I Aktivierung dazu führen, dass zwar die Influenza Virus Infektion abgeschwächt wird, jedoch eine bakterielle Superinfektion verstärkt wird. Dies wäre kontraproduktiv für einen therapeutischen Einsatz.

Um den Effekt einer systemischen RIG-I Aktivierung auf eine bakterielle Superinfektion zu untersuchen und die klinische Situation bestmöglich nachzustellen, führten wir bei B6.A2G-Mx1 Mäusen eine nicht-letale Infektion mit Influenza durch, gefolgt von einer letalen Superinfektion mit $4,4 \times 10^6$ CFU *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (Ye et al., 2006). Die 3pRNA Applikation erfolgte 18 Stunden nach der Influenzainokulation, die bakterielle Superinfektion erfolgte an Tag vier nach der Virusinfektion, um der klinischen Situation beim Menschen möglichst nahe zu kommen. Wir beobachteten, dass die bakterielle Superinfektion sowohl den klinischen Verlauf im Rahmen der Bewertungsskala als auch den Gewichtskurvenverlauf der Virus infizierten Mäuse drastisch verschlechtert und die Gesamtmortalität der Mäuse auch bei der nicht letalen Influenzainfektion erhöhte.

Abb. 2:



(A) Versuchsaufbau: Injektion mit 3pRNA 18 Stunden nach Influenza Infektion mit intratrachealer Superinfektion von *Streptococcus pneumoniae* nach 4 Tagen bei $n = 4$ und $n = 6$ Mäusen (B) Gewichtsverläufe (C) Überlebenskurve (D) Verlauf des klinischen Score (Abbildungsquelle: Coch et al., 2017. Siehe Kapitel 2, Seite 38, Abbildung 6)

Demnach war das Modell in der Lage den klinischen Verlauf einer Superinfektion beim Menschen widerzuspiegeln. Eine systemische RIG-I Aktivierung in der Maus zeigte keine klinische Verschlechterung, sondern wirkte sich im Gegenteil sogar günstig auf die Mortalität und den Krankheitsverlauf der doppelt infizierten Mäuse aus. Eine Verschlechterung des klinischen Verlaufs der Superinfektion durch eine Typ I Interferon Ausschüttung kann in dem hier untersuchten Modell der Aktivierung von RIG-I nicht bestätigt werden, im Gegenteil überwiegt der positive Effekt der RIG-I Aktivierung auf den Verlauf den potentiell negativen Auswirkung durch das ausgeschüttete Typ I Interferon.

1.4 Diskussion

Die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) durch ein intrazelluläres Nukleinsäure-Erkennungssystem übt massiven Druck auf die evolutionäre Weiterentwicklung der auf RNA-Polymerase angewiesenen Viren, wie zum Beispiel das Influenza Virus aus. Zur Verhinderung der intrazellulären Erkennung durch RIG-I und der daraufhin eingeleiteten Immunantwort schützt sich das Influenzavirus daher zum Beispiel durch Einkapselung der Erbinformation (Ye et al., 2006). Zudem konnte eine zentrale Rolle des Influenza Proteins NS1 bei der Verhinderung einer RIG-I Aktivierung gezeigt werden (Guo et al., 2007; Engel, 2013). Im Falle einer erfolgreichen RIG-I Inhibierung wird eine antivirale Antwort durch den Typ I Interferon induzierenden Signalweg gestoppt. Stattdessen findet in der Zelle nur die NF- κ B Aktivierung statt, die eine virale Replikation im Gegensatz zu einer Typ I Interferon Aktivierung sogar fördert (Guo et al., 2007; Flory et al., 2000; Wurzer et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine prophylaktische Applikation der 3pRNA zu einer spezifischen RIG-I Aktivierung führt, die den Wirt vor einer Influenza Infektion für eine längere Zeit komplett schützt. Dieses Prinzip konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal an einem relevanten Tiermodell gezeigt werden. Ein tachyphylaktischer Effekt, der bei Stimulation anderer intrazellulärer Signalwege (z.B. TLR4 Stimulation) bekannt ist, wurde auch bei mehrfacher Applikation von 3pRNA nicht beobachtet. In dieser Arbeit wurde auch nach wiederholter 3pRNA Gabe eine prophylaktische Wirkung gezeigt. Der gezeigte prophylaktische Effekt der 3pRNA über sieben Tage erscheint aus heutiger Sicht verlängerbar. In weiteren Experimenten sollte das maximale Intervall vor Infektion, bei

dem eine einmalige Applikation von 3pRNA den Wirt noch komplett vor einer Infektion mit dem Influenza A Virus schützt untersucht werden.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Stimulation von RIG-I mit 3pRNA in bereits mit Influenza Virus A infizierten Mäusen das Überleben sichert und außerdem zu einer deutlichen Abmilderung der klinischen Symptome führt. Die Gabe von 3pRNA vermittelt damit nicht nur einen prophylaktischen Schutz, sondern entfaltet sogar einen therapeutischen Effekt. Die erhobenen Daten zeigten daher einen klinischen Nutzen der Therapie mit 3pRNA bis mindestens 30 Stunden nach einer Virus Infektion mit Influenza A. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt zudem erstmalig unter in vivo Bedingungen am Mx1 positiven Mausmodell gezeigt werden, im Gegensatz zu vorherigen Studien, welche vor allem auf prophylaktischen Regimen und in vitro Stimulation von Zellkulturen fokussiert waren. Die Entwicklung eines am Menschen anwendbaren RIG-I Liganden zur Verhinderung eines potentiell tödlichen Verlaufs einer Influenza Infektion erscheint daher vielversprechend.

Im Gegensatz zu der vorgelegten Arbeit sind die inokulierten PFU bei der natürlichen Infektion des Menschen mit Influenzaviren deutlich geringer und sie erfolgt auch nicht direkt in die Lunge, sondern breitet sich langsamer über die Eintrittspforte der oberen Atemwege bis in die tiefen Atemwege aus. Daher könnte sogar eine deutlich niedrige Dosierung von 3pRNA als die hier verwendete Dosis einen suffizienten Schutz bieten. Dies muss im Verlauf bis zur potentiellen Anwendung im Menschen weiter untersucht werden.

Die Etablierung des dargestellten Prinzips der durch 3pRNA herbeigeführten RIG-I Aktivierung zur Infektionsprophylaxe und Therapie gegen das Influenza Virus erscheint auch auf weitere RNA-Virusinfektion wie SARS-Cov2 (Blanco et al., 2020), Ebola oder Zika anwendbar zu sein und bedarf weiterer Untersuchungen. Durch die prophylaktische Gabe eines RIG-I aktivierenden Liganden könnten beispielsweise Risikogruppen während pandemischer Infektionsgeschehen besser geschützt werden bis eine Vakzine entwickelt entwickelt wäre. Die regelmäßige breite Anwendung eines RIG-I Liganden in der Bevölkerung könnte bei epidemisch oder pandemisch verlaufenden RNA-Virusinfektionen

wie z.B. durch SARS-Cov2 womöglich die Ausbreitungsgeschwindigkeit senken und so weltweite Lockdown-Ereignisse verkürzen oder sogar verhindern.

In verschiedenen Arbeiten konnte ein antiviraler Effekt für Interferon- λ vor allem bei respiratorischen Effekten gezeigt werden (Mordstein et al., 2008; Mordstein et al., 2010). Überraschenderweise war in der vorliegenden Arbeit Typ I Interferon und nicht Interferon- γ das für die antivirale Aktivität entscheidende Zytokin. Die vorliegenden Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den bisher publizierten Daten, sie zeigen allerdings, dass eine direkte RIG-I Stimulation während einer ablaufenden Influenza Infektion zu einer Dominanz der Typ I IFN Antwort führt und dass Interferon- λ für die therapeutische Aktivität nicht zwangsläufig benötigt wird. Es bleibt offen ob die lokale Interferon Antwort, die beispielsweise durch eine Virusinfektion in der Lunge ausgelöst wird von der systemisch gemessenen Typ I IFN oder Interferon- γ Konzentration abweicht. Eine lokale Applikation von 3pRNA beispielsweise in die Lunge zur Behandlung einer lokalen Virusinfektion der Atemwege könnte ebenfalls eine andere lokale Interferon Antwort induzieren. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

Das dem humanen MxA analoge Protein Mx1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Typ I Interferon abhängigen Immunantwort in der Maus. In dieser Arbeit wurden erstmalig Mx1-positive kongenetische C57BL/6 Mäuse benutzt (Grimm et al., 2007; Staeheli et al., 1985), um einen prophylaktischen bzw. therapeutischen Effekt einer RIG-I Aktivierung zu untersuchen. Es kann vermutet werden, dass eine therapeutische Wirkung einer RIG-I Aktivierung über die Senkung der Viruslast hinaus bisher in der Literatur deswegen nicht beschrieben ist, weil immer nur klassische Stämme wie C57BL/6 Wildtyp-Mäuse verwendet worden sind. Damit zeigt diese Arbeit erstmals, dass 3pRNA einen relevanten therapeutischen Schutz gegen Influenza vermittelt, der potentiell auf die humane Situation übertragbar ist.

Mehrere Studien weisen auf eine höhere Anfälligkeit für bakterielle Superinfektion im Falle einer durch Typ I Interferon dominierten Immunantwort hin (Li et al., 2012; Navarini et al., 2006; Stegemann et al., 2009). In dieser Arbeit konnte allerdings eine Verbesserung des klinischen Verlaufs im Falle einer Superinfektion mit Pneumokokken bei einer Influenza A Virus Infektion gezeigt werden. Wie in verschiedenen Arbeiten vorgeschlagen wurde,

wirkt sich bei einer Influenza Virus Infektion vor allem die bakterielle Superinfektion sowie das Anwachsen der lokalen Bakterienflora und der damit verbundenen Aktivierung des Inflammasoms kritisch auf das Überleben aus (Pillai et al., 2016). Hierbei kommen vor allem die toxischen Eigenschaften der Inflammasom-Aktivierung, wie die Caspase-1/11 Aktivierung und der gewebsschädigenden Effekte der Degranulation von neutrophilen Granulozyten zum Tragen. Daher kann vermutet werden, dass sich die reduzierte Viruslast durch den antiviralen Effekt der 3pRNA positiv auf den epithelialen Schaden und somit auf das Gesamtüberleben bei Superinfektion auswirkt. Dieser positive Effekt scheint gegenüber dem beschriebenen nachteiligen Effekt durch das Typ I Interferon zu überwiegen. Ein zusätzlicher antibakterieller Effekt der RIG-I Aktivierung ist möglich, kann jedoch aufgrund des multifaktoriellen Geschehens bei bakterieller und viraler Infektion von Epithelzellen durch die hier durchgeführten Experimente nicht untersucht werden. Möglicherweise interagiert die RIG-I Aktivierung mit einer Reihe von Superinfektion begünstigenden Mechanismen der Influenza Infektion, wie beispielsweise die Suppression der NK-Zell-Antwort (Small et al., 2010), die Depletion der alveolären Makrophagen (Ghoneim et al., 2013) oder die Setdb2-abhängige Interaktion zwischen Typ I Interferon und NF- κ B Signalwegen (Schliehe et al., 2015).

Zusätzlich zu der in der vorliegenden Arbeit benutzten in vitro transkribierten 3pRNA wurden chemisch synthetisierte, definierte 20mer Doppelstrang-RNA Liganden benutzt. Im Gegensatz zu der in vitro transkribierten 3pRNA besitzt die chemisch synthetisierte 3pRNA Modifikationen, die eine zusätzliche Erkennung durch TLR7 verhindert. Damit sowie mit dem Vergleich zu einem TLR7/8 Liganden konnten wir ausschließen, dass eine RIG-I Aktivierung und nicht die TLR7 Aktivierung für den prophylaktischen und therapeutischen Schutz sorgt.

In dieser Arbeit wurde die 3pRNA intravenös appliziert. Für eine potentielle therapeutische Anwendung im Menschen erscheint diese Applikationsform ungeeignet, da vermutlich relevante systemische Nebenwirkungen auftreten würden, die im Mausmodell weniger ins Gewicht fallen, aber im Menschen limitierend sind. Eine inhalative Applikation der 3pRNA wäre erstrebenswert. Allerdings stellt die Entwicklung eines inhalativen Applikationsweges noch eine ungelöste Herausforderung dar, so dass hier nur der intravenöse Applikationsweg verwendet worden ist. Die RIG-I aktivierenden RNA muss

für den Transport an den Wirkort (d.h. ins Zytosol) komplexiert werden. Allerdings wirkt unter Umständen die komplexierende Substanz JetPEI® bei anderen Applikationsformen wie beispielsweise der inhalativen Gabe lokal toxisch auf die Zellmembran des intranasalen Epithels. Die potentiell schonendere inhalative Applikationsform könnte daher aufgrund des Schadens am respiratorischen Epithel durch die Trägersubstanz die lungenschädigenden Effekte einer Influenza-Infektion verstärken wie Pilotversuche in unserem Labor andeuten. Dies muss daher im Weiteren untersucht werden, um eine verträgliche lokale Applikationsform für 3pRNA zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein effektiver Schutz vor dem letalen Verlauf einer Influenza Infektion gezeigt werden. Offen bleibt die Frage, warum RIG-I im Rahmen der angeborenen Immunität nicht konstant aktiviert bleibt um so vor viralen respiratorischen Pathogenen besser geschützt zu sein.

Das vorgelegte Therapieprinzip ist potentiell unabhängig von evolutionären Resistenz-Strategien des Virus, die auf der Antigen-Variabilität beruhen. Der Effekt ist abhängig von der Anwesenheit von Mx1 sowie Typ I IFN jedoch unabhängig von Lambda Interferon und ist dem therapeutischen Effekt anderer nukleinsäure-erkennender PRR Agonisten überlegen.

1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals in einem relevanten Tiermodell gezeigt werden, dass die spezifische Aktivierung des RIG-I Rezeptors mit synthetischer 3pRNA eine vielversprechende klinische Strategie zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung schwerer und potentiell tödlicher Influenza A Infektionen mit und ohne bakterielle Superinfektionen darstellt. Dem Tiermodell unter Verwendung von Mx1-positiven Mäusen kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da die RIG-I abhängige Typ I Interferon Antwort der humanen Immunantwort gegenüber detaillierter nachempfunden ist. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die mit positivem klinischem Verlauf assoziierte Immunreaktion RIG-I abhängig vermittelt wird und auf einer Typ I Interferon Immunantwort basiert. Dieses Therapieprinzip lässt sich prinzipiell auf den Menschen übertragen. Somit wird in dieser Arbeit sowie der zugrunde liegenden Originalpublikation ein relevanter neuer Therapieansatz gegen den tödlichen

Verlauf einer Influenza A Infektion vorgelegt. Damit könnte die Behandlung mit einem RIG-I Liganden die ideale Ergänzung zu einer Vakzine sein, um im Falle einer Pandemie die Mortalität und auch die Belastung für die Menschen und die Wirtschaft so niedrig wie möglich zu halten. Die aktuelle Situation einer pandemische SARS-Cov2 Ausbreitung ist ein Beleg für die hohe Relevanz dieser Arbeit.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Barchet W, Wimmenauer V, Schlee M, Hartmann G. Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Current opinion in immunology* 2008; 4: 389–395

Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, Zaki SR, Hayden FG, Hui DS, Kettner JD, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, Nicholson KG. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *The New England journal of medicine* 2010; 18: 1708–1719

Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 2020; 181: 1036-1045

Chakravarthy KV, Bonoiu AC, Davis WG, Ranjan P, Ding H, Hu R, Bowzard JB, Bergey EJ, Katz JM, Knight PR, Sambhara S, Prasad PN. Gold nanorod delivery of an ssRNA immune activator inhibits pandemic H1N1 influenza viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 22: 10172–10177

Coch C, Stümpel JP, Lilien-Waldau V, Wohlleber D, Kümmerer BM, Bekeredjian-Ding I, Kochs G, Garbi N, Herberhold S, Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Barchet W, Schlee M, Hoerauf A, Bootz F, Staeheli P, Hartmann G, Hartmann E. RIG-I Activation Protects and Rescues from Lethal Influenza Virus Infection and Bacterial Superinfection. *Molecular Therapy* 2017; 25: 2093-2103

Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB, Uyeki TM. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England journal of medicine* 2009; 25: 2605–2615

Engel DA. The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target. *Antiviral research* 2013; 3: 409–416

Flory E, Kunz M, Scheller C, Jassoy C, Stauber R, Rapp UR, Ludwig S. Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase. *The Journal of biological chemistry* 2000; 12: 8307–8314

Ghoneim HE, Thomas PG, McCullers JA. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2013; 3: 1250–1259

Glezen WP. Clinical practice. Prevention and treatment of seasonal influenza. *The New England journal of medicine* 2008; 24: 2579–2585

Goldeck M, Schlee M, Hartmann G, Hornung V. Enzymatic synthesis and purification of a defined RIG-I ligand. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2014a: 15–25

Goldeck M, Tuschl T, Hartmann G, Ludwig J. Efficient solid-phase synthesis of pppRNA by using product-specific labeling. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2014b; 18: 4694–4698

Goulet M-L, Olagnier D, Xu Z, Paz S, Belgnaoui SM, Lafferty EI, Janelle V, Arguello M, Paquet M, Ghneim K, Richards S, Smith A, Wilkinson P, Cameron M, Kalinke U, Qureshi S, Lamarre A, Haddad EK, Sekaly RP, Peri S, Balachandran S, Lin R, Hiscott J. Systems analysis of a RIG-I agonist inducing broad spectrum inhibition of virus infectivity. *PLoS pathogens* 2013; 4: e1003298

Grimm D, Staeheli P, Hufbauer M, Koerner I, Martínez-Sobrido L, Solórzano A, García-Sastre A, Haller O, Kochs G. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 16: 6806–6811

Guo Z, Chen L-m, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2007; 3: 263–269

Hayden FG, Jong MD de. Emerging influenza antiviral resistance threats. *The Journal of infectious diseases* 2011; 1: 6–10

Heneghan CJ, Onakpoya I, Jones MA, Doshi P, Del Mar CB, Hama R, Thompson MJ, Spencer EA, Mahtani KR, Nunan D, Howick J, Jefferson T. Neuraminidase inhibitors for

influenza: a systematic review and meta-analysis of regulatory and mortality data. *Health Technology Assessment* 2016; 42: 1-242

Herberhold S, Coch C, Zillinger T, Hommertgen B, Busch N, Schuberth C, Hartmann E, Wimmenauer V, Hagmann CA, Lüdenbach B, Schlee M, Bootz F, Hartmann G, Barchet W. Delivery with polycations extends the immunostimulant Ribomunyl into a potent antiviral Toll-like receptor 7/8 agonist. *Antiviral therapy* 2011; 5: 751–758

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K-K, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science (New York, N.Y.)* 2006; 5801: 994–997

Hornung V, Guenthner-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, Fougerolles A de, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature medicine* 2005; 3: 263–270

Humphreys IR, Walzl G, Edwards L, Rae A, Hill S, Hussell T. A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. *The Journal of experimental medicine* 2003; 8: 1237–1242

Hwang S-Y, Sun H-Y, Lee K-H, Oh B-H, Cha YJ, Kim BH, Yoo J-Y. 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic acids research* 2012; 6: 2724–2733

Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults. *Lancet (London, England)* 2006; 9507: 303–313

Li W, Moltedo B, Moran TM. Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of $\gamma\delta$ T cells. *Journal of virology* 2012; 22: 12304–12312

Liedmann S, Hrinčius ER, Guy C, Anhlan D, Dierkes R, Carter R, Wu G, Staeheli P, Green DR, Wolff T, McCullers JA, Ludwig S, Ehrhardt C. Viral suppressors of the RIG-I-mediated interferon response are pre-packaged in influenza virions. *Nature Communications* 2014; 5: 5645

Liedmann S, Hrincius ER, Anhlan D, McCullers JA, Ludwig S, Ehrhardt C. New virulence determinants contribute to the enhanced immune response and reduced virulence of an influenza A virus A/PR8/34 variant. *The Journal of infectious diseases* 2014; 209(4): 532-541

Lin L, Liu Q, Berube N, Detmer S, Zhou Y. 5'-Triphosphate-short interfering RNA. *Journal of virology* 2012; 19: 10359–10369

Manegold C, van Zandwijk N, Szczesna A, Zatloukal P, Au JSK, Blasinska-Morawiec M, Serwatowski P, Krzakowski M, Jassem J, Tan EH, Benner RJ, Ingrosso A, Meech SJ, Readett D, Thatcher N. A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 2012; 1: 72–77

Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo Y-M, Cárdenas WB, Gale M, García-Sastre A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *Journal of virology* 2007; 2: 514–524

Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld J-C, Paludan SR, Klucher K, Staeheli P. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS pathogens* 2008; 9: e1000151

Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V, Sorgeloos F, Ehl S, Mayer D, Kochs G, Schwemmle M, Günther S, Drosten C, Michiels T, Staeheli P. Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *Journal of virology* 2010; 11: 5670–5677

Navarini AA, Recher M, Lang KS, Georgiev P, Meury S, Bergthaler A, Flatz L, Bille J, Landmann R, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 42: 15535–15539

Nguyen DN, Mahon KP, Chikh G, Kim P, Chung H, Vicari AP, Love KT, Goldberg M, Chen S, Krieg AM, Chen J, Langer R, Anderson DG. Lipid-derived nanoparticles for

immunostimulatory RNA adjuvant delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 14: E797-803

Nichani AK, Dar MA, Mirakhur KK, Krieg AM, Booth JS, Townsend HGG, Potter AA, Babiuk LA, Mutwiri GK. Subcutaneous, but not intratracheal administration of the TLR9 agonist, CpG DNA transiently reduces parainfluenza-3 virus shedding in newborn lambs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 2010; 6: e111-7

Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *Journal of virology* 1992; 4: 2564–2569

Pavlovic J, Zürcher T, Haller O, Staeheli P. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *Journal of virology* 1990; 7: 3370–3375

Pillai PS, Molony RD, Martinod K, Dong H, Pang IK, Tal MC, Solis AG, Bielecki P, Mohanty S, Trentalange M, Homer RJ, Flavell RA, Wagner DD, Montgomery RR, Shaw AC, Staeheli P, Iwasaki A. Mx1 reveals innate pathways to antiviral resistance and lethal influenza disease. *Science (New York, N.Y.)* 2016; 6284: 463–466

Ramos HJ, Gale M. RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Current opinion in virology* 2011; 3: 167–176

Ranjan P, Jayashankar L, Deyde V, Zeng H, Davis WG, Pearce MB, Bowzard JB, Hoelscher MA, Jeisy-Scott V, Wiens ME, Gangappa S, Gubareva L, García-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM, Fujita T, Sambhara S. 5'PPP-RNA induced RIG-I activation inhibits drug-resistant avian H5N1 as well as 1918 and 2009 pandemic influenza virus replication. *Virology journal* 2010: 102

Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *The American journal of medicine* 2008; 4: 258–264

Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nature reviews. Immunology* 2016; 9: 566–580

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009; 1: 25–34

Schliehe C, Flynn EK, Vilagos B, Richson U, Swaminathan S, Bosnjak B, Bauer L, Kandasamy RK, Griesshammer IM, Kosack L, Schmitz F, Litvak V, Sissons J, Lercher A, Bhattacharya A, Khamina K, Trivett AL, Tessarollo L, Mesteri I, Hladik A, Merkler D, Kubicek S, Knapp S, Epstein MM, Symer DE, Aderem A, Bergthaler A. The methyltransferase Setdb2 mediates virus-induced susceptibility to bacterial superinfection. *Nature immunology* 2015; 1: 67–74

Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, Herzner A, Zillinger T, Goldeck M, Schmidt T, Schmid-Burgk J, Kerber R, Wolter S, Stümpel JP, Roth A, Bartok E, Drosten C, Coch C, Hornung V, Barchet W, Kümmerer B, Hartmann G, Schlee M. A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA. *Immunity* 2015; 43: 41-45

Small C-L, Shaler CR, McCormick S, Jeyanathan M, Damjanovic D, Brown EG, Arck P, Jordana M, Kaushic C, Ashkar AA, Xing Z. Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2010; 4: 2048–2056

St Paul M, Mallick AI, Read LR, Villanueva AI, Parvizi P, Abdul-Careem MF, Nagy É, Sharif S. Prophylactic treatment with Toll-like receptor ligands enhances host immunity to avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 2012; 30: 4524–4531

Staeheli P, Dreiding P, Haller O, Lindenmann J. Polyclonal and monoclonal antibodies to the interferon-inducible protein Mx of influenza virus-resistant mice. *The Journal of biological chemistry* 1985; 3: 1821–1825

Stegemann S, Dahlberg S, Kröger A, Gereke M, Bruder D, Henriques-Normark B, Gunzer M. Increased susceptibility for superinfection with *Streptococcus pneumoniae* during

influenza virus infection is not caused by TLR7-mediated lymphopenia. *PloS one* 2009; 3: e4840

Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O, Ludwig S. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *The Journal of biological chemistry* 2004; 30: 30931–30937

Ye Q, Krug RM, Tao YJ. The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* 2006; 7122: 1078–1082

Zürcher T, Pavlovic J, Staeheli P. Mechanism of human MxA protein action. *The EMBO journal* 1992; 4: 1657–1661

2. Veröffentlichung

Molecular Therapy

Original Article



RIG-I Activation Protects and Rescues from Lethal Influenza Virus Infection and Bacterial Superinfection

Christoph Coch,^{1,9} Jan Phillip Stümpel,^{1,9} Vanessa Lilien-Waldau,¹ Dirk Wohlleber,² Beate M. Kümmerer,³ Isabelle Bekeredjian-Ding,^{4,5} Georg Kochs,⁶ Natalio Garbi,⁷ Stephan Herberhold,^{8,10} Christine Schuberth-Wagner,^{1,11} Janos Ludwig,¹ Winfried Barchet,¹ Martin Schlee,¹ Achim Hoerauf,⁵ Friedrich Bootz,⁸ Peter Staeheli,⁶ Gunther Hartmann,¹ and Evelyn Hartmann⁸

¹Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany; ²Institute of Molecular Immunology and Experimental Oncology, TU Munich, 81675 Munich, Germany; ³Institute of Virology, University Hospital Bonn, 53105 Bonn, Germany; ⁴Division of Microbiology, Paul-Ehrlich Institute, 63225 Langen, Germany; ⁵Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany; ⁶Institute of Virology, Medical Center Freiburg, 79104 Freiburg, Germany; ⁷Institute of Experimental Immunology, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany; ⁸Department of Otolaryngology, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany

Influenza A virus infection causes substantial morbidity and mortality in seasonal epidemic outbreaks, and more efficient treatments are urgently needed. Innate immune sensing of viral nucleic acids stimulates antiviral immunity, including cell-autonomous antiviral defense mechanisms that restrict viral replication. RNA oligonucleotide ligands that potently activate the cytoplasmic helicase retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I) are promising candidates for the development of new antiviral therapies. Here, we demonstrate in an Mx1-expressing mouse model of influenza A virus infection that a single intravenous injection of low-dose RIG-I ligand 5'-triphosphate RNA (3pRNA) completely protected mice from a lethal challenge with influenza A virus for at least 7 days. Furthermore, systemic administration of 3pRNA rescued mice with pre-established fulminant influenza infection and prevented the fatal effects of a streptococcal superinfection. Type I interferon, but not interferon- λ , was required for the therapeutic effect. Our results suggest that the use of RIG-I activating oligonucleotide ligands has the clinical potential to confine influenza epidemics when a strain-specific vaccine is not yet available and to reduce lethality of influenza in severely infected patients.

INTRODUCTION

Influenza A virus causes severe respiratory infections, and worldwide pandemics occur as in 2009.^{1,2} Current prophylactic vaccines and treatments bear significant limitations: vaccines induce antigen-specific immunity to hemagglutinin antigen, which is highly variable in different influenza A virus subtypes in humans and animals. Genomic variation through mutations or through reassortment of different genome segments (antigenic shift and drift) allows the virus to escape pre-established memory responses and requires a yearly adaptation of the commercial vaccine still with limited efficacy.³ Moreover, genetic instability leads to widespread resistance against

conventional antiviral drugs targeting specific viral components (neuraminidase inhibitors and M2-proton channel inhibitors).^{4,5} Therapeutic efficacy of neuraminidase and M2-protein inhibitors remains controversial.⁶ Therefore, new therapeutic principles that are less susceptible to mutational escape by the virus are highly desired.

The innate immune system provides an important barrier for viruses. A first barrier is the mucus of the respiratory epithelium containing defensins and cathelicidins. Once the virus enters cells, viral nucleic acids are detected by pattern recognition receptors, which trigger a signaling cascade that potently inhibits viral replication and in many cases eliminates the virus before a severe infection develops. Activation of nucleic-acid-sensing pattern recognition receptors (Toll-like receptor 3 [TLR3], TLR7, TLR8, TLR9) has been explored as a prophylactic strategy against influenza A virus replication in animal models.⁷⁻⁹ However, TLRs are expressed mainly on immune cell subsets, but not in target cells of viruses, such as epithelial cells. In contrast to TLRs, retinoic-acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs; RIG-I, MDA5 [melanoma differentiation antigen 5], and LGP2 [Laboratory of Genetics and Physiology 2]) detect viral RNA in the cytosol of all somatic cells that are targeted by viruses, including epithelial cells.^{10,11} Activation of RIG-I-like receptors in a cell before viral entry induces a broad spectrum of

Received 7 February 2017; accepted 5 July 2017;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.003>.

⁹These authors contributed equally to this work.

¹⁰Present address: Ev. Waldkrankenhaus Bad Godesberg, GmbH, Waldstraße 73, D-53177 Bonn, Germany

¹¹Present address: Rigotec, GmbH, 82152 Martinsried, Germany

Correspondence: Christoph Coch, MD, Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Straße 25, 53127 Bonn, Germany.

E-mail: ccoch@uni-bonn.de



antiviral activities that provide potent protection of this cell from viral replication.

Because the RIG-I-like receptor MDA5 is activated by RNA ligand structures containing long, irregular double-stranded RNA (dsRNA), and because such dsRNA also activates a number of additional pathways, including TLR3 on endothelial cells, protein kinase R (PKR), oligoadenylate synthetase 1 (OAS1), and the inflammasome, the clinical use of MDA5 ligands such as polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] is limited by toxicity.^{12,13} In contrast, RIG-I can be selectively activated by short double-stranded blunt end 5'-triphosphate RNA (3pRNA).^{14,15} Upon activation, RIG-I induces the expression of a set of antiviral cytokines such as type I interferon and type III interferon (interferon- λ), and upregulates the expression of antiviral genes with cell-autonomous antiviral effector functions (e.g., Mx proteins, interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1 [IFIT1], PKR, OAS1, and adenosine deaminase, RNA specific [ADAR]).^{16,17}

Influenza A virus is a member of the *Orthomyxoviridae* family of RNA viruses with a single-stranded negative sense RNA genome that forms blunt-end 5'-triphosphate panhandle structures that in principle are detected by RIG-I. It has been demonstrated that activation of RIG-I is critical to mount an effective antiviral immune response in the course of an influenza virus infection.^{16,18} However, like all pathogenic negative strand RNA viruses, influenza A virus has evolved strategies to counteract detection by RIG-I. The non-structural protein 1 (NS1) of influenza A virus potently inhibits RIG-I activation and signaling.^{19–21} As a consequence, once a cell is infected by influenza A virus, RIG-I becomes non-functional with regard to virus detection and activation of antiviral effector mechanisms. However, if cells are preactivated by synthetic RIG-I ligands, they are protected. The rationale for RIG-I ligand treatment of influenza A virus infection is the protection of yet uninfected cells *in vivo*, thereby restricting viral spread from cell to cell. This is obviously the situation in a prophylactic setting where RIG-I activation occurs before viral infection, but RIG-I activation may also be effective in the course of an ongoing viral infection when the virus has not yet infected all potential target cells. Thus, therapeutic administration of a synthetic RIG-I ligand may substitute for insufficient innate immune activation by influenza A virus due to immune escape from innate immunorecognition.

RIG-I stimulation in the context of influenza A virus has been reported in the literature.^{22–26} However, *in vivo* data are limited because mostly surrogate parameters such as viral load rather than survival were used as endpoints and Mx1-negative mouse strains (C57BL/6 or BALB/c) were used. Mx proteins are interferon-induced antiviral proteins that interfere with virus replication in the cell at several levels and are highly conserved among vertebrates.²⁷ Here, we make use of Mx1-positive B6.A2G-Mx1 mice, which in contrast to the often used Mx1-negative C57BL/6 strain more closely resemble the clinical situation in humans. We demonstrate that prophylactic treatment of Mx1-positive mice with a small dose of RIG-I agonist completely protects from an otherwise lethal challenge with influenza A virus for a

minimum of 7 days prior to challenge. Furthermore, RIG-I ligand treatment up to 30 hr after infection still rescued mice from a lethal course of infection. We also found that systemic RIG-I ligand treatment improved the survival of influenza A virus-infected mice that were additionally challenged by bacterial superinfection, a major complication well-known to be responsible for influenza-associated morbidity and mortality in patients.

RESULTS

Systemic Activation of RIG-I by Intravenous 3pRNA Application Induces CXCL10 in Lung Tissue and Ameliorates the Course of a Non-lethal Influenza A Virus Infection

To investigate whether RIG-I activation protects from influenza A virus infection *in vivo*, 3pRNA was complexed to *in vivo* jetPEI and administered to C57BL/6 mice intravenously. The dosage was adjusted as a result of our previous *in vitro* data (data not shown). At 6 hr after injection, high levels of the type I interferon-stimulated gene CXCL10 mRNA were detected in lung tissue, the primary target tissue of influenza virus (Figure 1A). Next, C57BL/6 mice were intravenously injected with 3pRNA and after 6 hr they received a non-lethal dose of influenza virus A/PR/8/34. 3pRNA-treated mice demonstrated a milder clinical course of the infection as indicated by body weight (Figure 1B). Of note, protection in this setting occurred despite the absence of Mx1 protein, which is the mouse homolog of human MxA.^{28,29} Mx1 in mice and MxA in humans are important antiviral effectors in the type I interferon pathway, and Mx1-positive mice represent a model that is much closer to the human situation.^{30,31} Therefore, in all subsequent studies, we used Mx1-positive congenic B6.A2G-Mx1 mice as a well-established *in vivo* model of influenza infection.^{28,32}

Systemic 3pRNA Leads to Long-Term Protection of Mice from Lethal Influenza Challenge

To study the time frame of protection, B6.A2G-Mx1 mice received a single injection of a low dose of 3pRNA (12.5 μ g), 3 or 7 days before mice were challenged with a lethal dose of a highly virulent PR/8 variant (hvPR/8) that is replicating faster than the A/PR/8/34 strain.²⁸ Although all mice without 3pRNA pre-treatment showed severe signs of infection and had to be sacrificed within 10 days (Figures 2A–2C), mice pre-treated with a single low dose of intravenous 3pRNA showed no weight loss or increased clinical disease score. 3pRNA pre-treatment resulted in an almost complete protection of mice for at least 7 days.

Repeated exposure to innate stimuli often leads to desensitization, which is a well-known phenomenon. Because repeated administration over a longer period of time would be required in case 3pRNA is used as prophylaxis against influenza, we investigated whether such repeated administration of 3pRNA would result in weaker protection. B6.A2G-Mx1 mice were intravenously injected four times with 3pRNA (days 7, 5, 3, and 1) before they were challenged with a lethal dose of influenza virus. Mice were still completely protected, indicating that repeated stimulation of RIG-I does not lead to desensitization (Figures 2D and 2E). Furthermore, repeated administration

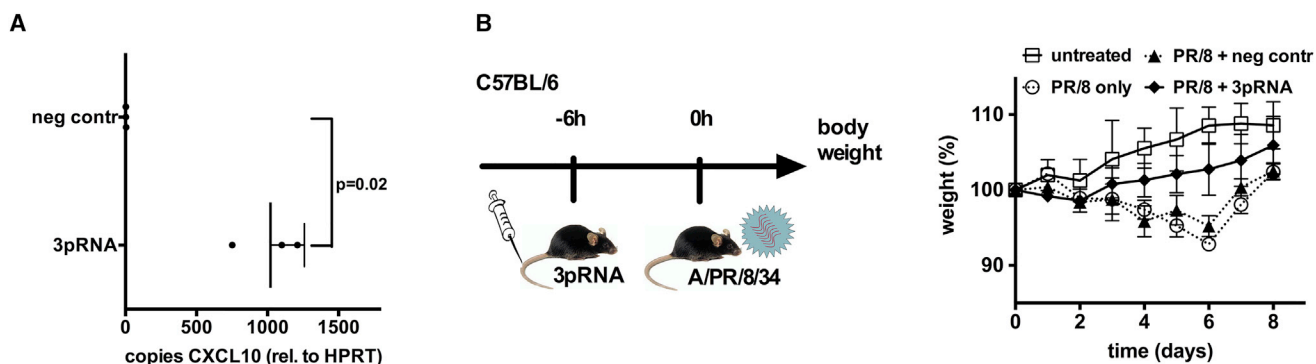


Figure 1. Systemic 3pRNA Induces CXCL10 in the Lungs and Ameliorates the Course of Non-lethal Influenza Virus Infection

(A) C57BL/6 mice were i.v. injected with 25 μ g of 3pRNA or the control RNA polycytidylic, polyadenylic acid (polyCA). After 6 hr, expression of CXCL10 in lung tissue was analyzed by qPCR ($n = 3$ mice). Result shows mean with SD. (B) Left panel shows the experimental setup. Right panel shows that C57BL/6 mice were i.v. injected with 25 μ g of 3pRNA or the control RNA polyCA 6 hr before intranasal infection with a non-lethal dose (10^5 PFU) A/PR/8/34. Body weight of mice was monitored daily. Results show the means and SD of $n = 6$ mice (ANOVA day 6: PR8 only versus PR8 + control [ctrl] RNA, not significant; PR8 only versus PR8 + 3pRNA, $p < 0.01$; PR8 + ctrl RNA versus PR8 + 3pRNA, $p < 0.05$).

of 3pRNA in vivo was well tolerated with no clinical signs of side effects. There was no decrease in body weight and a normal clinical score at day of infection after repeated 3pRNA administration (Figures 2D and 2E; data not shown; body weight in grams; day -7 versus day 0; mean, SEM: 3pRNA-treated mice 23.4 ± 0.7 versus 23.6 ± 0.5 and non-3pRNA-treated mice 23.9 ± 1.3 versus 23.9 ± 1.4).

Systemic 3pRNA Rescues Mice from an Ongoing Lethal Influenza Virus Infection

Once the virus has successfully entered the epithelium, the protection of yet uninfected cells may still ameliorate the course of the infection. To study the therapeutic activity of RIG-I activation in pre-established infection, B6.A2G-Mx1 mice received a single intravenous injection of a low dose of 3pRNA (12.5 μ g per injection) at 18 hr post-infection with a lethal dose of hvPR/8 (Figure 3A). 3pRNA, but not control RNA, strongly reduced the viral load in the lungs of mice on day 5 postinfection (Figure 3B). All mice receiving 3pRNA 18 hr after infection were rescued, whereas none of the mice in the control groups survived (Figure 3C). 3pRNA-treated infected mice showed a minor drop in body weight and a low clinical disease score compared with mice treated with control RNA that experienced a pronounced weight loss and a high clinical score (Figure 3C). This therapeutic effect was dose dependent, with the lowest dose used (6.25 μ g per injection) still completely protecting mice from a fatal course of the infection (Figure 3D). Similar therapeutic activity was observed with a short synthetic 5'-triphosphate dsRNA oligonucleotide (Figure 3E). When the start of 3pRNA treatment was delayed to 30 hr after infection (instead of 18 hr), the therapeutic effect indicated by weight loss and clinical score was reduced, but survival rate was still at 60% compared with the untreated mice that all died (Figure 3F).

Therapeutic Activity of 3pRNA in Influenza Virus Infection Requires Type I Interferon, but Not Interferon- λ

Interferon- λ has been reported to be involved in the antiviral response against respiratory viruses, including influenza.^{33,34} Whereas type I in-

terferons all bind to the same type I interferon receptor, interferon- λ binds to a distinct receptor, IFNLR1. To examine the contribution of interferon- λ versus type I interferon, we studied B6.A2G-Mx1 mice that lack functional IFNLR (B6.A2G-Mx1-*Ifnlr1*^{-/-} mice), interferon- α and - β receptor subunit 1 (IFNAR1) (B6.A2G-Mx1-*Ifnar*^{-/-}), or both (B6.A2G-Mx1-*Ifnar*^{-/-} *Ifnlr*^{-/-}) (Figure 4). Mice were infected with a lethal dose of hvPR/8 and 18 hr later intravenously injected with 12.5 μ g of 3pRNA or control RNA. Body weight, survival, and clinical score were monitored. Only mice with functional IFNAR1 showed the 3pRNA-mediated survival benefit, whereas the presence of functional IFNLR was dispensable, indicating that in the absence of type I interferon function, RIG-I-induced interferon- λ is not sufficient to improve the clinical course of infection.

Comparison of 3pRNA with Established Oligonucleotide Ligands of TLR7/8 and TLR9

Activation of TLR7/8 and TLR9 has been described to provide protection against subsequent influenza virus infection.⁷⁻⁹ Because expression of these TLRs is mostly restricted to immune cells, the lack of direct protection of yet uninfected epithelial cells by TLR ligands may limit the therapeutic use of TLR ligands as compared with RIG-I ligands that directly induce antiviral activity in epithelial cells. Therefore, we compared the therapeutic activity of RIG-I activation with TLR7/8 and TLR9 activation in the therapeutic setting of influenza A virus infection. The TLR7/8 agonist 9.2 s-RNA^{35,36} was complexed with N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate (DOTAP) and administered intravenously (i.v.) as described before.³⁷ The TLR9 ligand CpG1826 was injected subcutaneously as previously established to treat influenza infection in mouse models and as approved for clinical trials.^{38,39} First, we analyzed induction of CXCL10 in the serum as a systemic marker of a type I interferon response (Figure 5A). Although both the TLR7/8 ligand (9.2 s-RNA) and the RIG-I ligand (3pRNA) induced considerable amounts of CXCL10 in the serum of mice, the TLR9 ligand (CpG1826) did not induce systemic levels of CXCL10. Next,

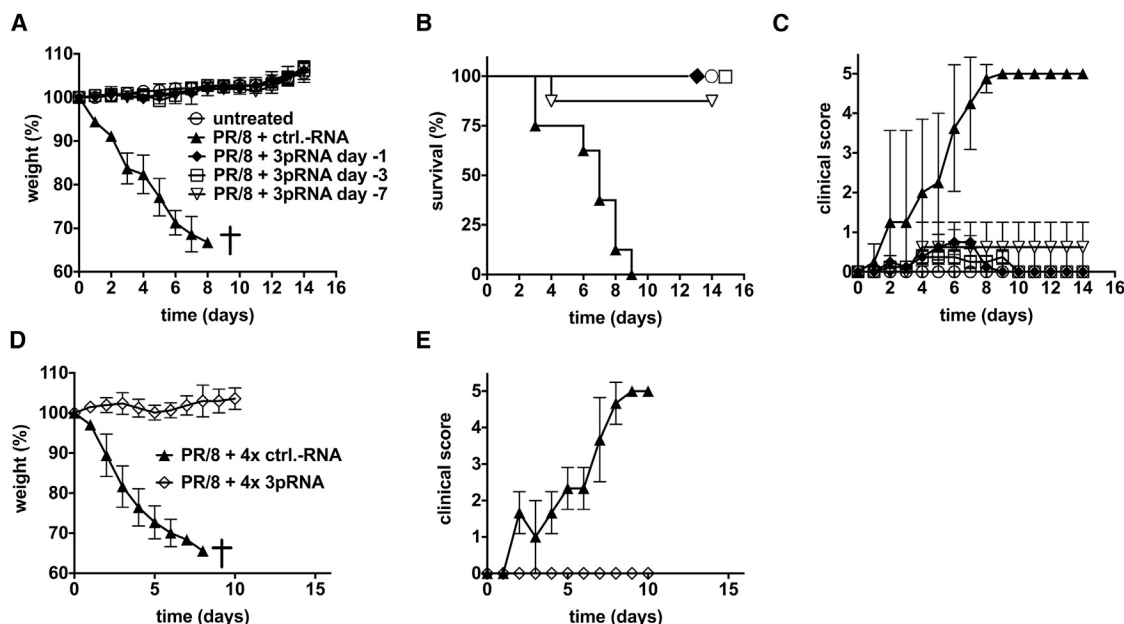


Figure 2. Prophylactic Treatment with 3pRNA Leads to Long-Term Protection of Mice against a Lethal Challenge with Influenza Virus

B6.A2G-Mx1 mice received a single i.v. injection of 12.5 µg of 3pRNA at 1, 3, or 7 days before they were challenged with a lethal dose of 10^3 PFU of hvPR/8, a highly virulent variant of A/PR/8/34 ($n = 8$; untreated: $n = 5$). (A–C) Body weight (A), survival (B) (log-rank [Mantel-Cox] test: control [ctrl]-RNA versus PR/8 + 3pRNA day –3, $p < 0.0001$; ctrl-RNA versus PR/8 + 3pRNA day –7, $p < 0.0009$; PR/8 + 3pRNA day –7 versus PR/8 + 3pRNA day –3, $p < 0.32$), and clinical score (C) were monitored. (D and E) Mice received repeated i.v. injections of 3pRNA or control RNA on days 7, 5, 3, and 1 before they were challenged with a lethal dose of 10^3 PFU of hvPR/8. (D and E) Body weight (D) and clinical score (E) were measured ($n = 8$; ctrl-RNA: $n = 3$). Results are presented as mean values. Error bars represent the SD.

the three ligands were administered to mice at 18 hr after a lethal challenge with influenza A virus. Whereas the RIG-I-stimulating ligand 3pRNA showed the expected amelioration of the clinical course of infection, no effect was seen for the TLR9 ligand CpG1826. Furthermore, despite the induction of substantial levels of CXCL10 in the serum, the TLR7/8 ligand 9.2 s-RNA showed no improvement of clinical signs (Figures 5B–5D).

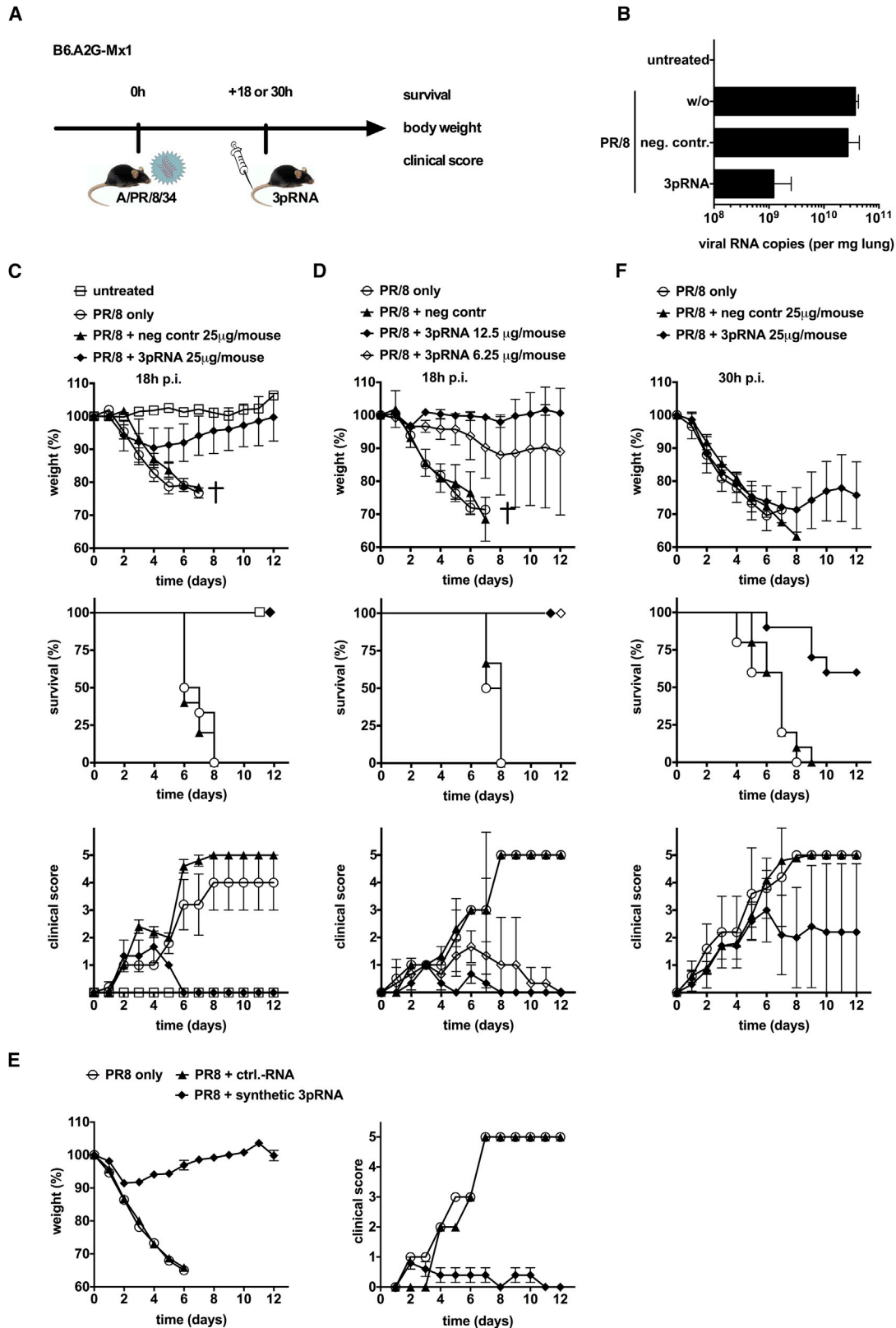
Systemic RIG-I Activation by 3pRNA Improves Outcome of Influenza Virus Infection with Bacterial Superinfection

Bacterial superinfection causes severe complications during influenza virus infection.^{40–42} It has been proposed that induction of type I interferon may aggravate bacterial superinfection.^{43,44} Although this point remains controversial,⁴⁵ RIG-I-induced type I interferon may even promote bacterial superinfection. To evaluate the utility of 3pRNA in the case of bacterial superinfection, we infected B6.A2G-Mx mice with a non-lethal dose of influenza virus and 18 hr later treated them with 3pRNA. Four days after viral infection, mice were additionally challenged by superinfection with *S. pneumoniae* (Figure 6A). In this model, bacterial infection alone did not cause a substantial weight loss (Figure 6B, closed triangles), but it aggravated the weight loss induced by the non-lethal dose of influenza virus (Figure 6B, open circles versus closed diamonds). Intravenous treatment with 3pRNA at 18 hr after influenza infection not only prevented the moderate weight loss induced by the non-lethal dose of influenza virus, but also the aggravation of weight loss

following bacterial superinfection (Figure 6B). All mice treated with 3pRNA survived, whereas 80% of the mice exposed to a non-lethal dose of influenza virus followed by bacterial superinfection died (Figures 6C and 6D). Together, these data demonstrate that RIG-I does not facilitate or aggravate bacterial (super)infection in the course of influenza virus infection.

DISCUSSION

The different pathways of innate immune sensing of viral nucleic acids heavily restrict the evolution of pathogenic viruses. As a consequence, successful pathogenic viruses need to develop molecular strategies to escape from the detection of their viral nucleic acids by the innate immune system. The RNA polymerase-based replicative principle of most negative strand RNA viruses, including influenza virus, implicates the formation of RNA molecules with triphosphate groups at the 5' end. Because this nucleic acid structure represents a pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) recognized by RIG-I, negative strand RNA viruses have to counteract RIG-I sensing in the cytoplasm. The negative strand RNA virus influenza A virus employs different strategies to evade detection by RIG-I, including encapsidation of the nascent RNA.^{46,47} Furthermore, influenza A virus targets the type I interferon system and the immunorecognition of its RNA by innate immune sensors. Influenza A virus encodes the non-structural protein NS1^{20,48,49} and the PB1-F2 protein,^{19,50} which inhibit the induction of type I interferon by RIG-I while maintaining NF-κB activation supporting viral replication.^{20,51,52} This highlights



(legend on next page)

the fundamental role of RIG-I in antiviral defense against influenza A virus. Because inhibition of RIG-I by NS1 occurs only in infected cells, the induction of RIG-I-induced antiviral activities in yet uninfected cells provides a strong rationale for the use of RIG-I ligands not only for prophylaxis, but also to ameliorate the clinical signs of an ongoing influenza virus infection.

Our results support this rationale and the clinical development RIG-I ligands for the treatment of influenza virus infection. First, we demonstrate that a prophylactic small dose of the RIG-I ligand 3pRNA completely protects the host from a subsequent lethal challenge with influenza A virus for an extended period of time. Second, the same small dose of 3pRNA profoundly ameliorates the clinical signs and secures survival of mice if administered in the course of an ongoing influenza A virus infection that otherwise causes 100% lethality. The data demonstrate that therapeutic application of the RIG-I ligand 3pRNA is highly effective for a period of at least 30 hr after viral challenge. Notably, unlike other innate pathways such as TLR4, we did not observe desensitization or tachyphylaxis of RIG-I activation upon repeated dosing of 3pRNA. Third, we demonstrate that, unexpectedly, type I interferons, but not interferon- λ , were required for the therapeutic activity. And fourth, RIG-I activation had a positive effect on the course of influenza virus infection even in the situation of bacterial superinfection.

Our results are consistent with several studies in the literature reporting an effect of RIG-I activation on influenza virus replication, but these studies have a different focus and some technical limitations. Studies in the literature are *in vitro* studies or studies on the prophylactic treatment.^{23–25} Furthermore, these studies used C57BL/6 mice lacking functional Mx1, the mouse homolog to human MxA,^{28,29} an important antiviral effector in the type I interferon pathway.^{30,31} In our study, we used Mx1-positive congenic B6.A2G-Mx1 mice that are well established to resemble the human situation much more closely than C57BL/6 mice lacking Mx1.^{28,29} Using this highly relevant model, we for the first time provide evidence for a long-lasting prophylactic, as well as therapeutic effect, in a severe and lethal influenza virus infection setting. The effective prophylactic period of 7 days as examined in this study may be further prolongable. Future studies will have to determine which dosing and which intervals of RIG-I activation are optimal for a complete and permanent protection against influenza virus infection. Because, unlike in our study,

the viral challenge with influenza in natural habitats usually is much lower, and non-lethal, sufficient protection may be achieved on a low-dose and long-interval application scheme. Furthermore, it will be interesting to study whether the *i.v.* route can be replaced by subcutaneous (*s.c.*) or inhaled administration of 3pRNA, which would be a more practical approach for routine prophylactic use on a population basis.

An important technical issue that needs to be considered is the identity of RIG-I ligands in different studies.^{22,26} Generation of 3pRNA by *in vitro* transcription leads to the formation of unexpected additional complementary short RNA sequences resulting in an unpredictable mixture of undefined RIG-I-stimulatory and non-stimulatory sequences, unless the *in-vitro*-transcribed RNA products are adequately purified. In addition to adequate purification of *in-vitro*-transcribed RNA, we used a chemically well-defined synthetic 5'-triphosphate dsRNA RIG-I ligand (20-mer), which is too short to activate MDA5, in order to confirm that the therapeutic activity is not dependent on the formation of *in vitro* transcription-dependent unintended longer RNA by-products.

Although in our study type I interferon is clearly required for the therapeutic activity, type I interferon may not be sufficient. It has been proposed that interferon- λ , as another RIG-I-inducible cytokine, has antiviral properties that are complementary to type I interferon, especially in case of respiratory infections such as influenza virus.^{33,34,53} Although the type I interferon receptor is expressed at the surface of all cells, expression of the type III interferon receptor is primarily restricted to epithelial cells in the respiratory and gastrointestinal tracts.^{34,54} This differential expression of the type III interferon receptor might generate an antiviral response in airway epithelium while preventing exaggerated activation of immune cells and associated lung pathology.⁵⁴ Moreover, it has been demonstrated that type III interferon, and not type I interferon, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells, and that type III interferon, rather than type I interferon, represents the main first-line defense via the RIG-I-dependent pathway.¹⁶ Our results do not contradict these findings, but they demonstrate that upon actual RIG-I ligand treatment in the situation of an established influenza A virus infection, the activity of type I interferon dominates over type III interferon, and RIG-I-induced type III interferon does not contribute to the therapeutic activity.

Figure 3. Therapeutic Administration of 3pRNA Rescues Mice from a Pre-established Lethal Influenza Virus Infection

(A) Experimental setup: *i.v.* 3pRNA treatment at 18 or 30 hr after challenge with influenza virus. (B) B6.A2G-Mx1 mice were infected with 10^3 PFU of hvPR/8. 18 hr later, 3pRNA or control RNA was injected *i.v.* (both at 25 μ g). Viral RNA was analyzed in lung tissue at day 5 postinfection ($n = 4$ mice). (C) B6.A2G-Mx1 mice were treated as in (B). Body weight ($n = 6$ mice; untreated: $n = 2$), survival ($n = 6$ mice; untreated: $n = 2$), and clinical score ($n = 5$ mice; PR/8+3pRNA: $n = 3$; untreated: $n = 2$) are depicted (log-rank [Mantel-Cox test]: PR/8 only versus PR/8 + control [ctrl]-RNA, $p = 0.65$; PR/8 only versus PR/8 + 3pRNA, $p = 0.0016$; PR/8 + ctrl-RNA versus PR/8 + 3pRNA, $p = 0.0015$). (D) Mice were treated as in (B) except that 3pRNA was used at a dose of 12.5 and 6.25 μ g per injection (means of $n = 10$ mice; PR/8 without treatment, $n = 5$ [log-rank (Mantel-Cox) test: PR/8 + ctrl-RNA versus PR/8 + 6.25 3pRNA, $p = 0.03$; PR/8 + ctrl-RNA versus PR/8 + 12.5 3pRNA, $p = 0.03$; PR/8 + 12.5 3pRNA versus PR/8 + 6.25 3pRNA, $p = 1$)). (E) Done as in (C), but chemically synthesized 3pRNA was used ($n = 5$). (F) Mice were treated as in (B) except injection of 3pRNA was at 30 hr postinfection (log-rank [Mantel-Cox] test: PR/8 only versus PR/8 + ctrl-RNA, $p = 0.66$; PR/8 only versus PR/8 + 3pRNA, $p = 0.0005$; PR/8 + ctrl-RNA versus PR/8 + 3pRNA, $p = 0.0002$). Results are presented as mean values. Error bars represent the SD.

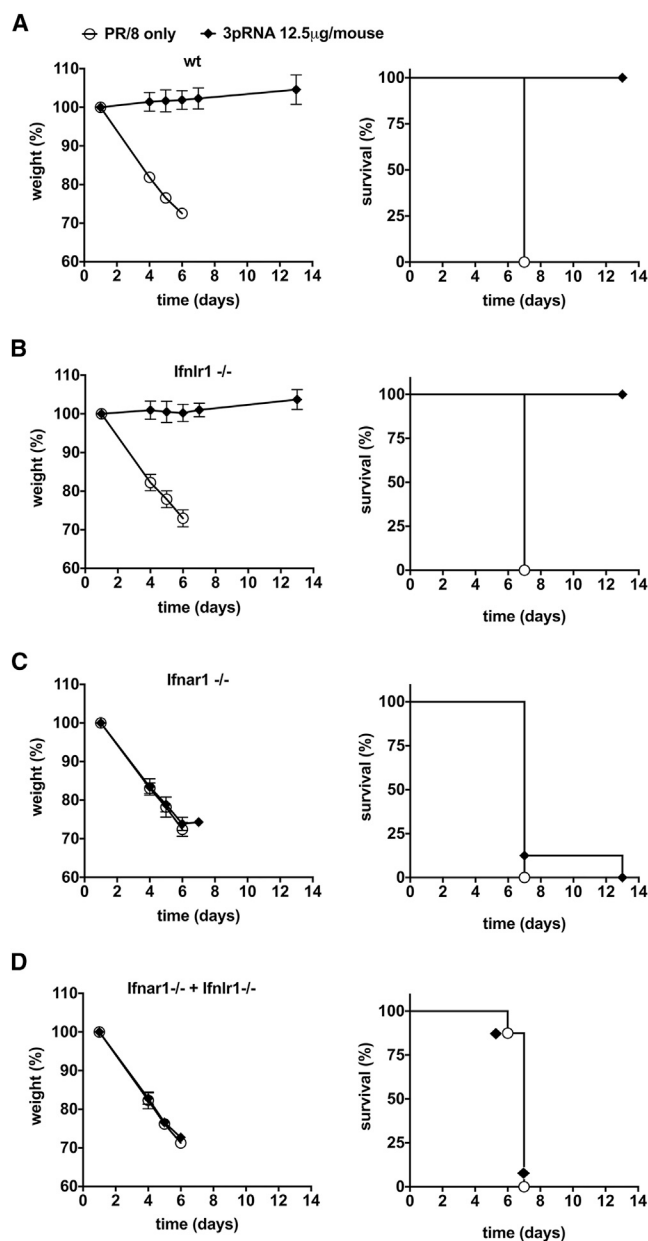


Figure 4. Rescue from Lethal Influenza Virus Infection by Therapeutic Administration of 3pRNA Requires the Type I Interferon Receptor but Is Independent of Interferon- λ

(A–D) B6.A2G-Mx1 mice (A) ($n = 8$, $p = 0.0003$), B6.A2G-Mx1-*Ifnlr1*^{-/-} mice lacking functional interferon- λ receptors (B) ($n = 6$, $p = 0.0009$), B6.A2G-Mx1-*Ifnar1*^{-/-} mice lacking functional type I interferon receptors (C) ($n = 8$, $p = 0.35$), or B6.A2G-Mx1-*Ifnar1*^{-/-} *Ifnlr1*^{-/-} double-knockout mice lacking receptors for both interferon types (D) ($n = 8$, $p = 1.00$) were infected with 10^3 PFU hvPR/8. After 18 hr, mice were i.v. injected with 12.5 μ g of 3pRNA or the control RNA polyCA. Body weight and survival were monitored. Results are presented as mean values. Error bars represent the SD. Log-rank (Mantel-Cox) test was used.

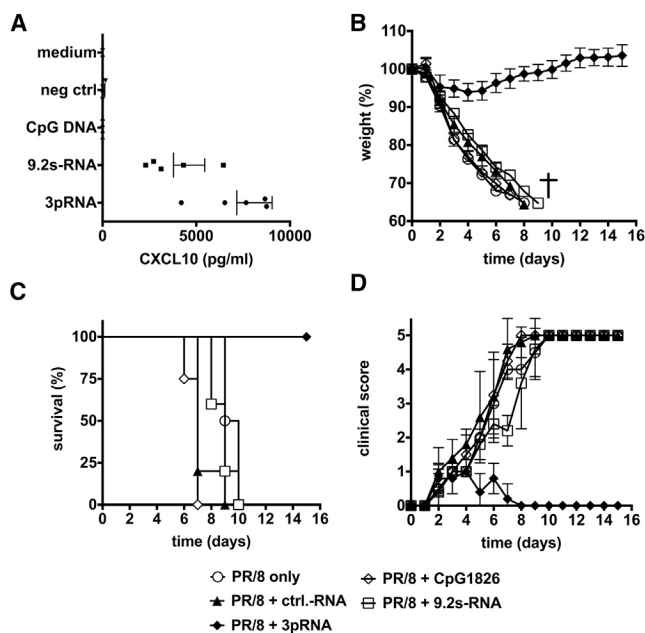


Figure 5. Comparison of 3pRNA with Established Oligonucleotide Ligands of TLR7/8 and TLR9

B6.A2G-Mx1 mice were infected with 10^3 PFU of hvPR/8. 18 hr later, mice were i.v. injected with 3pRNA or the control RNA polyCA (both delivered with jetPEI), i.v. injected with the TLR7/8 ligand 9.2s RNA (delivered with DOTAP), or i.p. injected with CpG1826 (all 12.5 μ g per injection). Infected mice without treatment served as control (PR/8 only). (A) At 6 hr after treatment, levels of CXCL10 were analyzed in serum of mice by ELISA (ANOVA: 3pRNA versus negative control [ctrl], $p < 0.01$; 3pRNA versus 9.2 s, $p < 0.05$; 9.2 s versus negative ctrl, $p < 0.05$). (B–D) Body weight (B), survival (log-rank [Mantel-Cox] test: PR/8 + ctrl-RNA versus PR/8 + 3pRNA, $p = 0.0016$; PR/8 + ctrl-RNA versus PR/8 + 9.2s RNA, $p = 0.065$; PR/8 + 3pRNA versus PR/8 + 9.2s RNA, $p = 0.0019$) (C), and clinical score (D) were monitored daily. Results show means of $n = 4$ or $n = 5$ animals and $n = 2$ for PR/8 only. Results are presented as survival curve or mean values with SD.

There are conflicting reports about increased susceptibility to bacterial infection in the context of a type I interferon-dominated response.^{43–45,55} Therefore, one might speculate that the protection from influenza virus infection by RIG-I may come at the expense of a higher risk to develop bacterial superinfection. In our study, we find that RIG-I treatment improved the overall clinical outcome of a combined infection with influenza virus and bacterial superinfection by *Streptococcus pneumoniae*. Thus, a potential aggravation of bacterial superinfection in the presence of RIG-I-induced type I interferon seems to be outweighed by the protective antiviral activity. On the other hand, RIG-I may even exhibit antibacterial activities. The experimental dissection of antiviral and antibacterial activities of therapeutic RIG-I activation is challenging because viral infection of epithelial cells and bacterial outgrowth are tightly intertwined. RIG-I activation may positively or negatively interfere with multiple mechanisms reported to promote bacterial superinfection in the context of influenza infection: impaired NK cell response,⁵⁶ depletion of alveolar macrophages,⁵⁷ suppressed phagocytic bacterial clearance,⁵⁸ Setdb2-mediated crosstalk between the type I interferons and

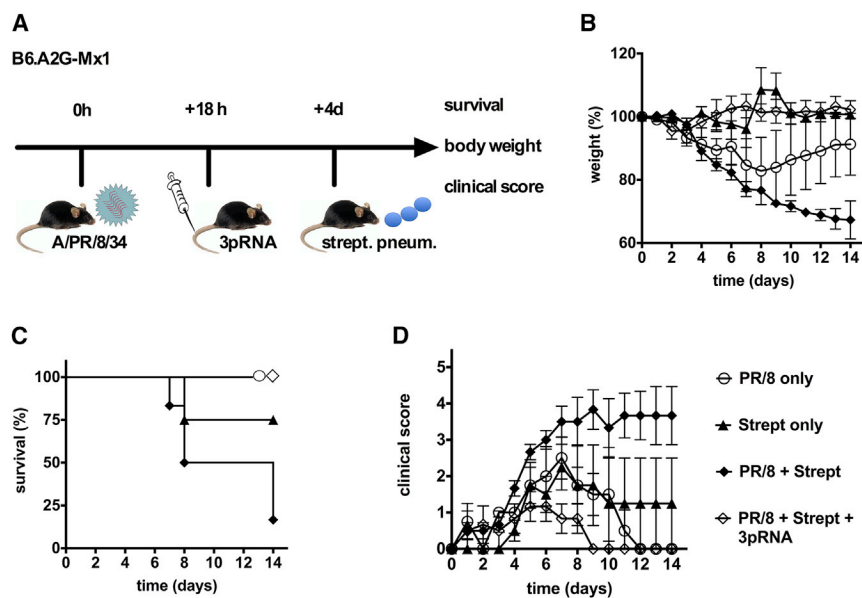


Figure 6. Therapeutic Administration of 3pRNA Improves the Outcome of Influenza-Infected Mice Superinfected with *S. pneumoniae*

B6.A2G-Mx1 mice were infected with 50 PFU of hvPR/8. 18 hr later, mice received an i.v. injection of 25 μ g of 3pRNA. At 4 days after influenza virus infection, mice were challenged with 4.4×10^6 CFU of *S. pneumoniae* (strain TIGR4). Mice infected with either influenza or *S. pneumoniae* but without 3pRNA treatment served as controls (PR/8 only, *Streptococcus pneumoniae* [strept] only, and PR/8 + strept). (A) Experimental setup. (B) Body weight. (C) Survival (log-rank [Mantel-Cox] test: strept versus PR/8 + strept, $p = 0.11$; strept versus PR/8 + strept + 3pRNA, $p = 0.22$; PR/8 + strept versus PR/8 + strept + 3pRNA, $p = 0.005$). (D) Clinical score. Results show mean values of $n = 4$ –6 mice. Error bars represent the SD.

NF- κ B pathways,⁵⁹ and downregulation of IL12 p70.⁶⁰ Interestingly, there is recent evidence from the literature that death in influenza viral infection is due to endogenous bacterial burden, even in the absence of additional exogenous bacterial challenge. Pillai and colleagues⁶¹ conclusively demonstrate that mice infected with influenza virus died of bacterial bloom in the lungs on the basis of virus-induced tissue damage. Their work showed that mortality is due to bacterial burden, caspase-1/11, and neutrophil-dependent tissue damage, and that mortality was reversed by a functional blockade of the inflammasome despite even enhanced viral replication. In our experimental setting it is likely that the reduced viral load as a consequence of 3pRNA treatment is associated with reduced virus-induced epithelial damage leading to reduced bacteria-induced lethality. The future characterization of potential antibacterial activities of RIG-I in the absence of viral infection requires an elaborate set of experiments that are specifically designed to answer this question.

The fact that enhanced RIG-I activity obviously provides a robust protection against infection with respiratory viruses provokes the question why RIG-I is not permanently activated by nature. One could speculate that increased sensitivity of the RIG-I pathway for prolonged periods of time has negative effects for the host, because this may increase the detection of endogenous RIG-I ligands, and thus may lead to a chronic activity resulting in generalized inhibition of translation of proteins contributing to the normal homeostasis of the cell. Consequently, fine-tuning of RIG-I function most likely is a trade between protection from viral infection and proper biological homeostasis. Therefore, prophylactic treatment with RIG-I ligands should be limited to times of enhanced viral threat.

In conclusion, with this work we establish the activation of the innate immune sensor RIG-I as a promising strategy to treat influenza virus infection in both therapeutic and prophylactic settings. Specifically,

for influenza, this novel therapeutic strategy has the advantage of acting independently of the specific virus strain and independently of viral resistance mechanisms to other established targeted anti-viral treatments. Furthermore, our results suggest that activation of RIG-I may be useful to limit outbreaks of infections with other newly emerging RNA viruses such as Ebola or Zika before vaccination becomes available.

MATERIALS AND METHODS

Pathogens

The influenza A virus variant hvPR/8 is closely related to the Cambridge strain of A/PR/8/34 (H1N1),⁶² which is moderately pathogenic for *Mx1*^{+/+} mice and was generated by serial lung passages in *Mx1*^{+/+} mice.⁶³ hvPR/8 is closely related to the Mount Sinai strain of A/PR/8/34,⁶⁴ which is non-pathogenic for *Mx1*^{+/+} mice even at high doses. Virus stocks were produced in embryonated chicken eggs. *Streptococcus pneumoniae* strain TIGR4 (provided by S. Hammerschmidt, Greifswald, Germany) was plated on Columbia sheep red blood agar and incubated at 37°C and 5% CO₂ overnight. For infections, bacteria were resuspended in sterile NaCl 0.9% solution adjusted to an optical density of 1 McFarland unit, which corresponds to 3×10^8 CFU/mL in a Densimat (BD Biosciences), a standard method to measure the inoculum size.⁶⁵

In Vivo Infection Models

C57BL/6 mice and *Mx1*-positive B6.A2G-*Mx1* mice with or without defective receptors for type I interferon or interferon- λ ^{28,29} were treated according to animal welfare. Mice were anesthetized with isoflurane (Baxter) and intranasally inoculated with a non-lethal dose (10^5 plaque-forming units [PFU]) of A/PR/8/34 or a lethal dose (10^3 PFU) of hvPR/8 in 50 μ L of PBS. Weight loss, survival, and a clinical score (0 = normal; 1 = slightly ruffled fur, cold sensation; 2 = ruffled fur, shivering; 3 = ruffled fur, inactivity, slowed movements; 4 = ruffled fur, inactivity, hunched; 5 = dead)⁶⁶ was determined daily. 3pRNA was injected i.v. at concentrations and time

points indicated using in vivo jetPEI in an N/P ratio of 8 as recommended by the manufacturer (Polyplus-transfection) CXCL10, chemokine (C-X-C motif) ligand 10. In case of bacterial superinfection, mice were intranasally inoculated with a non-lethal dose (50 PFU) of hvPR/8 and in addition with 4.4×10^6 CFU of *S. pneumoniae* (TIGR4).

Oligonucleotides

Synthetic 3pRNA was chemically synthesized by solid-phase synthesis using product-specific labeling as described.^{15,67,68} CA20-RNA (5'-CACACACACACACACACA-3'), CpG 1826,⁶⁹ and 9.2 s-RNA³⁶ were purchased from Biomers. Base-paired in-vitro-transcribed 3pRNA was generated as described previously⁶¹ and purified by separation in a Quick Spin DNA/RNA column (Roche) to eliminate short oligonucleotides (<8 nt). Activity of in-vitro-transcribed 3pRNA was functionally monitored by type I interferon induction in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which were prepared as previously described⁷⁰ and stimulated with 1.2 µg/mL 3pRNA complexed to Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Analysis of Viral Copy Number

RNA was purified by using Nucleo Spin RNA Virus kit (Macherey & Nagel) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was quantified by RT-PCR using One Step RT-PCR Kit (QIAGEN). The following primers (TIB Molbiol) were used: 5'-AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3' and 5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG-3' with the probe: 5'-FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA-3'. A standard curve (7.95×10^9 copies/mL to 7.95×10^5 copies/mL) was used for quantification. Data were obtained using the LightCycler 480 Software (Roche).

Real-Time qPCR

cDNA synthesis was performed using VILO cDNA Synthesis Kit from Life Technologies (11754050) as described in the manual. For mouse CXCL10, cDNA was amplified in a total volume of 20 µL using LightCycler 480 System (Roche). Primer and probe designs were performed using Universal Probe Library (Roche). Used probes from Roche were 18 for mouse CXCL10 and 51 for mouse TATA box binding protein (TBP). The following primers were used: mCXCL10 fwd: 5'-gctgccgtcattttctgc-3', mCXCL10 rev: 5'-tctcactggcccgtcatc-3'; and mTBP fwd: 5'-ccaatgactcctatgacccta-3', mTBP rev: 5'-cagccaagattc acgtagat-3'.

Cytokine Assays

CXCL10 was measured in the supernatant using ELISA (BD Biosciences) according to the manufacturer's recommendations.

Statistics

Results of multiple donors are presented as means with error bars indicating SD. Statistical analysis was performed using two-sided paired Student's t test for dependent samples. In case of multiple comparisons, ANOVA was applied with Tukey's or Holm-Sidak's test for multiple comparison. Survival curves were analyzed using log rank Mantel-Cox test. The p values less than 0.05 were considered

statistically significant. GraphPad Prism 6 for Mac OS X was used for analysis.

Study Approval

Animal studies were performed after approval by the responsible animal welfare authority under approval number TVA 887-50103709110 and G13/54.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.C., G.H., M.S., and E.H. conceived and designed most of the experiments. C.C., E.H., V.L.-W., and J.P.S. performed most of the experiments. C.C., G.H., M.S., F.B., S.H., C.S.-W., V.L.-W., J.P.S., and E.H. analyzed the data. C.C., E.H., M.S., and N.G. supervised most of the experiments. C.C., E.H., and G.H. co-wrote the manuscript. All authors substantially revised the manuscript. B.M.K., D.W., W.B., and N.G. helped to conceive and design the in vivo experiments. J.L. chemically synthesized the RNA. P.S. and G.K. provided virus stocks and helped to conceive, design, perform, and analyze the experiments with knockout mice. I.B.-D. and A.H. helped to conceive, design, perform, and analyze the in vivo superinfection experiments. A.H. contributed the bacterial strain and helped to conceive, design, and analyze the co-infection experiments.

CONFLICTS OF INTEREST

G.H. and C.S.-W. are founders and hold shares of the company Rigontec, GmbH.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bastian Putschli (Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Germany) for skillful technical support. G.H., W.B., and M.S. received financial support from the DFG excellence cluster ImmunoSensation. This study was supported by grants from the German Center for Infection Research (DZIF) (to W.B. and G.H.) and the German Research Foundation (DFG) (SFB 670, SFB704, and KFO177 to G.H. and C.C.). This work is part of the thesis of V.L.-W. and J.P.S. at the University of Bonn and was supported by grants to E.H., V.L.-W., and J.P.S. of the BONFOR program of the Medical Faculty Bonn.

REFERENCES

1. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood, F.S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.V., Xu, X., Bridges, C.B., and Uyeki, T.M. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 2605–2615.
2. Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza, Bautista, E., Chotpitayasunondh, T., Gao, Z., Harper, S.A., Shaw, M., Uyeki, T.M., Zaki, S.R., Hayden, F.G., Hui, D.S., et al. (2010). Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N. Engl. J. Med.* 362, 1708–1719.
3. Glezen, W.P. (2008). Clinical practice. Prevention and treatment of seasonal influenza. *N. Engl. J. Med.* 359, 2579–2585.
4. Hayden, F.G., and de Jong, M.D. (2011). Emerging influenza antiviral resistance threats. *J. Infect. Dis.* 203, 6–10.
5. Ison, M.G. (2011). Antivirals and resistance: influenza virus. *Curr. Opin. Virol.* 1, 563–573.

6. Jefferson, T., Demicheli, V., Rivetti, D., Jones, M., Di Pietrantonj, C., and Rivetti, A. (2006). Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet* 367, 303–313.
7. Nguyen, D.N., Mahon, K.P., Chikh, G., Kim, P., Chung, H., Vicari, A.P., Love, K.T., Goldberg, M., Chen, S., Krieg, A.M., et al. (2012). Lipid-derived nanoparticles for immunostimulatory RNA adjuvant delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E797–E803.
8. St Paul, M., Mallick, A.I., Read, L.R., Villanueva, A.I., Parvizi, P., Abdul-Careem, M.F., Nagy, É., and Sharif, S. (2012). Prophylactic treatment with Toll-like receptor ligands enhances host immunity to avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 30, 4524–4531.
9. Wong, J.P., Christopher, M.E., Viswanathan, S., Karpoff, N., Dai, X., Das, D., Sun, L.Q., Wang, M., and Salazar, A.M. (2009). Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine* 27, 3481–3483.
10. Barchet, W., Wimmenauer, V., Schlee, M., and Hartmann, G. (2008). Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 389–395.
11. Schlee, M., and Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 566–580.
12. Freeman, A.I., Al-Bussam, N., O'Malley, J.A., Stutzman, L., Bjornsson, S., and Carter, W.A. (1977). Pharmacologic effects of polyinosinic-polycytidylic acid in man. *J. Med. Virol.* 1, 79–93.
13. Cunningham, C., Campion, S., Teeling, J., Felton, L., and Perry, V.H. (2007). The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav. Immun.* 21, 490–502.
14. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994–997.
15. Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., et al. (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31, 25–34.
16. Okabayashi, T., Kojima, T., Masaki, T., Yokota, S., Imaizumi, T., Tsutsumi, H., Himi, T., Fujii, N., and Sawada, N. (2011). Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus Res.* 160, 360–366.
17. Ramos, H.J., and Gale, M., Jr. (2011). RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.* 1, 167–176.
18. Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101–105.
19. Dudek, S.E., Wixler, L., Nordhoff, C., Nordmann, A., Anhlan, D., Wixler, V., and Ludwig, S. (2011). The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity. *Biol. Chem.* 392, 1135–1144.
20. Guo, Z., Chen, L.-M., Zeng, H., Gomez, J.A., Plowden, J., Fujita, T., Katz, J.M., Donis, R.O., and Sambhara, S. (2007). NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36, 263–269.
21. Mibayashi, M., Martínez-Sobrido, L., Loo, Y.-M., Cárdenas, W.B., Gale, M., Jr., and Garcia-Sastre, A. (2007). Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J. Virol.* 81, 514–524.
22. Chakravarthi, K.V., Bonoiu, A.C., Davis, W.G., Ranjan, P., Ding, H., Hu, R., Bowzard, J.B., Bergey, E.J., Katz, J.M., Knight, P.R., et al. (2010). Gold nanorod delivery of an ssRNA immune activator inhibits pandemic H1N1 influenza viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 10172–10177.
23. Goulet, M.-L., Olagnier, D., Xu, Z., Paz, S., Belnaoui, S.M., Lafferty, E.I., Janelle, V., Arguello, M., Paquet, M., Ghneim, K., et al. (2013). Systems analysis of a RIG-I agonist inducing broad spectrum inhibition of virus infectivity. *PLoS Pathog.* 9, e1003298.
24. Hwang, S.-Y., Sun, H.-Y., Lee, K.-H., Oh, B.-H., Cha, Y.J., Kim, B.H., and Yoo, J.Y. (2012). 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic Acids Res.* 40, 2724–2733.
25. Lin, L., Liu, Q., Berube, N., Detmer, S., and Zhou, Y. (2012). 5'-Triphosphate-short interfering RNA: potent inhibition of influenza A virus infection by gene silencing and RIG-I activation. *J. Virol.* 86, 10359–10369.
26. Ranjan, P., Jayashankar, L., Deyde, V., Zeng, H., Davis, W.G., Pearce, M.B., Bowzard, J.B., Hoelscher, M.A., Jeisy-Scott, V., Wiens, M.E., et al. (2010). 5'PPP-RNA induced RIG-I activation inhibits drug-resistant avian H5N1 as well as 1918 and 2009 pandemic influenza virus replication. *Virol. J.* 7, 102.
27. Pavlovic, J., Haller, O., and Staeheli, P. (1992). Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J. Virol.* 66, 2564–2569.
28. Grimm, D., Staeheli, P., Hufbauer, M., Koerner, I., Martínez-Sobrido, L., Solórzano, A., García-Sastre, A., Haller, O., and Kochs, G. (2007). Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 6806–6811.
29. Staeheli, P., Dreiding, P., Haller, O., and Lindenmann, J. (1985). Polyclonal and monoclonal antibodies to the interferon-inducible protein Mx of influenza virus-resistant mice. *J. Biol. Chem.* 260, 1821–1825.
30. Pavlovic, J., Zürcher, T., Haller, O., and Staeheli, P. (1990). Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *J. Virol.* 64, 3370–3375.
31. Zürcher, T., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (1992). Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J.* 11, 1657–1661.
32. Horisberger, M.A., Staeheli, P., and Haller, O. (1983). Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1910–1914.
33. Mordstein, M., Kochs, G., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., Paludan, S.R., Klucher, K., and Staeheli, P. (2008). Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog.* 4, e1000151.
34. Mordstein, M., Neugebauer, E., Ditt, V., Jessen, B., Rieger, T., Falcone, V., Sorgeloos, F., Ehl, S., Mayer, D., Kochs, G., et al. (2010). Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J. Virol.* 84, 5670–5677.
35. Herberhold, S., Coch, C., Zillinger, T., Hommertgen, B., Busch, N., Schubert, C., Hartmann, E., Wimmenauer, V., Hagmann, C.A., Lüdenbach, B., et al. (2011). Delivery with polycations extends the immunostimulant Ribomunyl into a potent antiviral Toll-like receptor 7/8 agonist. *Antivir. Ther. (Lond.)* 16, 751–758.
36. Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., et al. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 11, 263–270.
37. Bourquin, C., Schmidt, L., Lanz, A.-L., Storch, B., Wurzenberger, C., Anz, D., Sandholzer, N., Mocikat, R., Berger, M., Poeck, H., et al. (2009). Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK cell response through the TLR7. *J. Immunol.* 183, 6078–6086.
38. Manegold, C., van Zandwijk, N., Szczesna, A., Zatloukal, P., Au, J.S.K., Blasinska-Morawiec, M., Serwatowski, P., Krzakowski, M., Jassem, J., Tan, E.H., et al. (2012). A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 23, 72–77.
39. Nichani, A.K., Dar, M.A., Mirakhor, K.K., Krieg, A.M., Booth, J.S., Townsend, H.G.G., Potter, A.A., Babiuk, L.A., and Mutwiri, G.K. (2010). Subcutaneous, but not intratracheal administration of the TLR9 agonist, CpG DNA transiently reduces parainfluenza-3 virus shedding in newborn lambs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, e111–e117.
40. Ballinger, M.N., and Standiford, T.J. (2010). Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone awry. *J. Interferon Cytokine Res.* 30, 643–652.
41. Peltola, V.T., Murti, K.G., and McCullers, J.A. (2005). Influenza virus neuraminidase contributes to secondary bacterial pneumonia. *J. Infect. Dis.* 192, 249–257.

42. Rothberg, M.B., Haessler, S.D., and Brown, R.B. (2008). Complications of viral influenza. *Am. J. Med.* *121*, 258–264.
43. Li, W., Moltedo, B., and Moran, T.M. (2012). Type I interferon induction during influenza virus infection increases susceptibility to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection by negative regulation of $\gamma\delta$ T cells. *J. Virol.* *86*, 12304–12312.
44. Navarini, A.A., Recher, M., Lang, K.S., Georgiev, P., Meury, S., Berghaler, A., Flatz, L., Bille, J., Landmann, R., Odermatt, B., et al. (2006). Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 15535–15539.
45. Stegemann, S., Dahlberg, S., Kröger, A., Gereke, M., Bruder, D., Henriques-Normark, B., and Gunzer, M. (2009). Increased susceptibility for superinfection with *Streptococcus pneumoniae* during influenza virus infection is not caused by TLR7-mediated lymphopenia. *PLoS ONE* *4*, e4840.
46. Killip, M.J., Fodor, E., and Randall, R.E. (2015). Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Res.* *209*, 11–22.
47. Ye, Q., Krug, R.M., and Tao, Y.J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* *444*, 1078–1082.
48. Engel, D.A. (2013). The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target. *Antiviral Res.* *99*, 409–416.
49. Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* *89*, 2359–2376.
50. Varga, Z.T., Ramos, I., Hai, R., Schmolke, M., García-Sastre, A., Fernandez-Sesma, A., and Palese, P. (2011). The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. *PLoS Pathog.* *7*, e1002067.
51. Flory, E., Kunz, M., Scheller, C., Jassoy, C., Stauber, R., Rapp, U.R., and Ludwig, S. (2000). Influenza virus-induced NF- κ B-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 8307–8314.
52. Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., Planz, O., and Ludwig, S. (2004). NF- κ B-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J. Biol. Chem.* *279*, 30931–30937.
53. Jewell, N.A., Cline, T., Mertz, S.E., Smirnov, S.V., Flaño, E., Schindler, C., Grieves, J.L., Durbin, R.K., Kottenko, S.V., and Durbin, J.E. (2010). Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J. Virol.* *84*, 11515–11522.
54. Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P., and Michiels, T. (2008). IFN- λ (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. *PLoS Pathog.* *4*, e1000017.
55. Tian, X., Xu, F., Lung, W.Y., Meyerson, C., Ghaffari, A.A., Cheng, G., and Deng, J.C. (2012). Poly I:C enhances susceptibility to secondary pulmonary infections by gram-positive bacteria. *PLoS ONE* *7*, e41879.
56. Small, C.-L., Shaler, C.R., McCormick, S., Jeyanathan, M., Damjanovic, D., Brown, E.G., Arck, P., Jordana, M., Kaushic, C., Ashkar, A.A., and Xing, Z. (2010). Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. *J. Immunol.* *184*, 2048–2056.
57. Ghoneim, H.E., Thomas, P.G., and McCullers, J.A. (2013). Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *J. Immunol.* *191*, 1250–1259.
58. Sun, K., and Metzger, D.W. (2014). Influenza infection suppresses NADPH oxidase-dependent phagocytic bacterial clearance and enhances susceptibility to secondary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* *192*, 3301–3307.
59. Schliebe, C., Flynn, E.K., Vilagos, B., Richson, U., Swaminathan, S., Bosnjak, B., Bauer, L., Kandasamy, R.K., Griesshammer, I.M., Kosack, L., et al. (2015). The methyltransferase Setdb2 mediates virus-induced susceptibility to bacterial superinfection. *Nat. Immunol.* *16*, 67–74.
60. Noone, C.M., Lewis, E.A., Frawley, A.B., Newman, R.W., Mahon, B.P., Mills, K.H., and Johnson, P.A. (2005). Novel mechanism of immunosuppression by influenza virus haemagglutinin: selective suppression of interleukin 12 p35 transcription in murine bone marrow-derived dendritic cells. *J. Gen. Virol.* *86*, 1885–1890.
61. Pillai, P.S., Molony, R.D., Martinod, K., Dong, H., Pang, I.K., Tal, M.C., Solis, A.G., Bielecki, P., Mohanty, S., Trentalange, M., et al. (2016). Mx1 reveals innate pathways to antiviral resistance and lethal influenza disease. *Science* *352*, 463–466.
62. Winter, G., Fields, S., and Brownlee, G.G. (1981). Nucleotide sequence of the haemagglutinin gene of a human influenza virus H1 subtype. *Nature* *292*, 72–75.
63. Haller, O. (1981). Inborn resistance of ice to orthomyxoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *92*, 25–52.
64. Schickli, J.H., Flandorfer, A., Nakaya, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (2001). Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *356*, 1965–1973.
65. Perry, J.D., Morris, K.A., James, A.L., Oliver, M., and Gould, F.K. (2007). Evaluation of novel chromogenic substrates for the detection of bacterial beta-glucosidase. *J. Appl. Microbiol.* *102*, 410–415.
66. Humphreys, I.R., Walzl, G., Edwards, L., Rae, A., Hill, S., and Hussell, T. (2003). A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. *J. Exp. Med.* *198*, 1237–1242.
67. Goldeck, M., Schlee, M., Hartmann, G., and Hornung, V. (2014). Enzymatic synthesis and purification of a defined RIG-I ligand. *Methods Mol. Biol.* *1169*, 15–25.
68. Goldeck, M., Tuschl, T., Hartmann, G., and Ludwig, J. (2014). Efficient solid-phase synthesis of pppRNA by using product-specific labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *53*, 4694–4698.
69. Jiang, T., Zhao, H., Li, X.-F., Deng, Y.-Q., Liu, J., Xu, L.-J., Han, J.F., Cao, R.Y., Qin, E.D., and Qin, C.F. (2011). CpG oligodeoxynucleotides protect against the 2009 H1N1 pandemic influenza virus infection in a murine model. *Antiviral Res.* *89*, 124–126.
70. Coch, C., Lück, C., Schwickart, A., Putschli, B., Renn, M., Höller, T., Barchet, W., Hartmann, G., and Schlee, M. (2013). A human in vitro whole blood assay to predict the systemic cytokine response to therapeutic oligonucleotides including siRNA. *PLoS ONE* *8*, e71057.

3. Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken.

Bei Professor Gunther Hartmann bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die umfangreiche finanzielle Unterstützung sowie den umfassenden fachlichen Rat.

Bei meinem Betreuer Christoph Coch bedanke ich mich sehr herzlich für das umfangreiche jahrelange Mentoring, die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die wertvolle Einführung in das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten. Er hat mich zu jedem Zeitpunkt der Promotion überaus engagiert betreut und stets ein offenes Ohr gehabt. Ebenfalls danken möchte ich Martin Schlee, Sebastian Putschli, Juliane Dassler-Plenker und Anna Schwickert-Halbe für die intensive Unterstützung und die gemeinsame Zeit im Labor. Weiterhin danke ich unserer gesamten Arbeitsgruppe für die hilfsbereite Unterstützung und angenehme Zusammenarbeit, die mich gerne an die gemeinsame Laborzeit zurückdenken lassen werden.

Bei Dirk Wohlleber bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei den Mausexperimenten.

Der BONFOR-Kommission der Medizinischen Fakultät danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstipendiums.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie für den kontinuierlichen Rückhalt und die liebevolle Begleitung in den letzten Jahren. Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter, meiner Frau Charlotte Weber sowie Familie D'Araio Tho Pesch und Familie Meißner für die bedingungslose Unterstützung.