

**Identifikation immunstimulatorischer  
Nukleinsäureliganden zur Stimulation von  
Rezeptoren der angeborenen Immunantwort**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Vera Wimmenauer

aus Aachen

Bonn 2008

---

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann  
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Waldemar Kolanus  
  
Tag der Promotion: 17.03.2009  
Erscheinungsjahr: 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Das humane Immunsystem während einer viralen Infektion</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Die angeborene Immunantwort</b>	<b>4</b>
1.2.1 Die Erkennung viraler Nukleinsäuren	6
1.2.2 Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs)	7
1.2.3 Liganden für die TLRs	8
1.2.3.1 Liganden für TLR7 und TLR8	10
1.2.4 Signalwege der Nukleinsäure-erkennenden TLRs	12
1.2.4.1 Der MyD88-abhängige Signalweg	12
1.2.5 Die RNA-Helikasen RIG-I, MDA-5 und LGP2	14
1.2.6 Liganden für MDA-5	15
1.2.6.1 MDA-5 erkennt mit Picornaviren assoziierte Agonisten	16
1.2.6.2 Inosin und die dsRNA-spezifische Adenosindesaminase (ADAR)	17
1.2.7 Immunerkennung von DNA im Zytosol	18
1.2.8 Signalwege nach Erkennung zytosolischer Nukleinsäuren	19
1.2.9 Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“ – Lokalisation und Modifikationen	20
<b>1.3 Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort</b>	<b>22</b>
1.3.1 Die dendritischen Zellen (DCs)	23
1.3.2 Die plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)	24
1.3.3 Die humanen Monozyten	26
<b>1.4 Zytokine</b>	<b>27</b>
1.4.1 Typ I Interferon (IFN)	27
1.4.2 IFN-vermittelte antivirale Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort	28
1.4.3 Proinflammatorische Zytokine als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort	29
<b>1.5 Nukleinsäuren für einen therapeutischen Einsatz</b>	<b>30</b>
<b>1.6 Ziel der Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>33</b>
2.1.1 Geräte	33
2.1.2 Mikroskopie-Zubehör	34
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	34
2.1.4 Transfektionsreagenzien	35

2.1.5	Kit	35
2.1.6	PCR-Zubehör und Größenstandards	35
2.1.7	Größenstandards	35
2.1.8	Enzyme	35
2.1.9	ELISA	36
2.1.10	MACS	36
2.1.11	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	36
2.1.12	Materialien für die Zellkultur	36
2.1.13	Medien und Pufferlösungen	37
2.1.14	Zellen	38
2.1.15	Nukleinsäuren	38
<b>2.2</b>	<b>Allgemeine Zellkulturbedingungen</b>	<b>38</b>
2.2.1	Kultivierung von Zellen	39
2.2.2	Zellzahlbestimmung	39
2.2.3	Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen	39
2.2.4	Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen	40
2.2.5	Isolation von Monozyten	41
2.2.6	Isolation von Knochenmarkszellen aus Mäusen – Differenzierung zu PDC oder mDC	41
2.2.7	Genotypisierung von Mäusen	42
2.2.8	Qualitative PCR (Polymerasekettenreaktion)	42
<b>2.3</b>	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>43</b>
2.3.1	<i>In vitro</i> -Transkription	43
2.3.2	Herstellung von langer RNA mit Polynukleotidphosphorylase	44
2.3.3	Doppelsträngige Oligoribonukleotide (ORNs)	45
2.3.4	Konkatemerisierung bipalindromischer Oligodesoxynukleotide (bpcODNs)	45
2.3.5	Produktion von EMCV (Encephalomyocarditis Virus)	45
2.3.6	Isolation viraler RNA	46
2.3.7	Sonifizieren von RNA im Ultraschallbad	46
2.3.8	Chloroform-Phenol-Fällung	46
2.3.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	47
2.3.10	Gelelektrophorese	48
2.3.10.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
2.3.10.2	Agarose-Gelelektrophorese	48
<b>2.4</b>	<b>Stimulation von Zellen mit Nukleinsäuren</b>	<b>49</b>
2.4.1	Stimulation mit Nukleinsäuren komplexiert mit Poly-L-Arginin oder Protamin	49
2.4.2	Transfektion von Oligonukleotiden mit Dotap	49
2.4.3	Transfektion von Oligonukleotiden mit TransIT-LT1 Transfektion Reagent	50
<b>2.5</b>	<b>Zytokinmessung</b>	<b>50</b>
2.5.1	ELISA zur Bestimmung humaner Zytokine	50
2.5.2	ELISA zur Bestimmung von murinem IFN- $\alpha$	51
<b>2.6</b>	<b>FACS-Analyse (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)</b>	<b>52</b>
2.6.1	Direkte FACS-Färbung	53

<b>2.7</b>	<b>Mikroskopie</b>	<b>54</b>
2.7.1	Fluoreszenzmikroskopie	54
2.7.2	Elektronenmikroskopie	54
<b>2.8</b>	<b>Maus <i>in vivo</i> Versuche</b>	<b>55</b>
<b>2.9</b>	<b>Validierung der Experimente</b>	<b>55</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1.1	Isolation von PBMC, Monozyten und PDC aus humanem Blut	56
3.1.2	Stimulation von PBMC, Monozyten und PDC mit Nukleinsäureliganden	58
<b>3.2</b>	<b>Immunstimulierende Aktivität von mit kationischen Peptiden komplexierter isRNA</b>	<b>61</b>
3.2.1	Die Inkubationszeit von isRNA 9.2s mit Poly-l-Arginin beeinflusst die Zytokinproduktion der stimulierten humanen PBMC	61
3.2.2	Aufnahme von isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin, durch Monozyten und PDC	62
3.2.3	Zytokinprofil humaner PBMC nach Stimulation mit isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin	64
3.2.4	Bestimmung der Partikelgröße der komplexierten isRNA	66
3.2.5	Sequenzmotive der isRNA beeinflussen das nach Stimulation produzierte Zytokinmuster	68
3.2.6	Die Produktion von IL-10 und TNF- $\alpha$ nach Stimulation mit isRNA	71
3.2.7	Stimulation humaner PBMC mit isRNA komplexiert mit Protamin Valeant	74
<b>3.3</b>	<b>Die Erkennung von RNA-Sekundärstrukturen im Endosom humaner Immunzellen</b>	<b>76</b>
3.3.1	Erkennung langer Doppelstrang-RNA durch endosomale TLRs	76
3.3.2	Einzelne G:U-Basenpaare verstärken die stimulatorische Aktivität von einzelsträngigem pU	78
3.3.3	G:U-Basenpaare werden von humanen PBMC erkannt und induzieren IFN- $\alpha$	80
3.3.4	Die Erkennung von G:U-Basenpaaren durch murine Flt3-L-PDC	82
3.3.5	G:U-Basenpaare werden über TLR7 erkannt	83
3.3.6	pG+805 induziert <i>in vivo</i> die Produktion von IFN- $\alpha$	85
3.3.7	G:U-Basenpaaren werden in humanen Immunzellen selektiv über TLR7 erkannt	86
3.3.8	G:U-Basenpaare in kurzen doppelsträngigen ORNs induzieren IFN- $\alpha$	88
3.3.9	G:U-Basenpaare in doppelsträngigen Bereichen kurzer „Hairpin“-Strukturen stimulieren TLR7	89
3.3.10	pG+R805 stimuliert humane PDC auch ohne Einsatz von Transfektionsreagenzien oder kationischen Peptiden	93
3.3.11	Lange pG-RNA ermöglicht die Aufnahme des „nackten“ TLR7-Ligandens pG+R805	95
<b>3.4</b>	<b>Die zytosolische Erkennung von dsRNA</b>	<b>96</b>
3.4.1	Zytosolische Erkennung von langer dsRNA in PBMC und Monozyten	97
3.4.2	Virale RNA von EMCV kann Zellen MDA-5-abhängig stimulieren	98
3.4.3	Inosinnukleotide sind nicht ausreichend für eine Stimulation	100
3.4.4	Die Länge von pl:C beeinflusst die IFN- $\alpha$ -Induktion	102
3.4.5	pl:C – was macht die Erkennung durch MDA-5 aus?	103

---

<b>3.5</b>	<b>Zytosolische Erkennung von DNA</b>	<b>106</b>
3.5.1	Erkennung zytosolischer DNA	106
3.5.2	Kurze bipalindromische konkatemerisierende ODNs (bpcODNs) induzieren IFN- $\alpha$ in Monozyten	107
3.5.3	ODNs ohne palindromische Ankerregion sind inaktiv	108
3.5.4	PTO-Bindungen und 3'-Monophosphate steigern die stimulatorische Aktivität von bpcODNs	110
3.5.5	3'-Monophosphate verstärken die stimulierende Aktivität von bpcODNs sequenzunabhängig	112
3.5.6	bpcODNs induzieren kein IFN- $\alpha$ in PDC	114
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>117</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifikation spezifischer Nukleinsäureliganden für Rezeptoren der angeborenen Immunantwort</b>	<b>117</b>
4.1.1	Protamin komplexierte isRNA zur Stimulation von TLR7 und TLR8	117
4.1.2	Beeinflussung des Zytokinmusters durch Sequenzmotive der isRNA	122
4.1.3	Stimulation mit isRNA komplexiert mit Protamin Valeant	125
<b>4.2</b>	<b>Die Erkennung von G:U-Basenpaaren in RNA-Sekundärstruktur</b>	<b>126</b>
4.2.1	TLR7 und TLR8 in Mensch und Maus und die Erkennung von RNA-Motiven	128
4.2.2	Ein selektiver Ligand für TLR7	129
<b>4.3</b>	<b>Stimulation von TLR7 mit „nackter“ RNA</b>	<b>131</b>
<b>4.4</b>	<b>Erkennung von langer dsRNA im Zytosol</b>	<b>132</b>
4.4.1	Inosin bei der zytosolischen Erkennung von dsRNA	134
<b>4.5</b>	<b>Zytosolische Erkennung von DNA</b>	<b>136</b>
4.5.1	3'-Monophosphat steigert die IFN- $\alpha$ -Induktion durch bpcODNs im Zytosol	138
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>140</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>151</b>
6.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	151
6.2	Abkürzungsverzeichnis	153
6.3	Abbildungsverzeichnis	156
6.4	Tabellenverzeichnis	157
6.5	Danksagung	158

## Zusammenfassung

Eine zentrale Rolle der angeborenen Immunität ist die unverzügliche Eingrenzung und Abwehr von Virusinfektionen, bevor Mechanismen der angeborenen Immunität induziert werden, die spezifisch dem Virus entgegenwirken. Dabei ist die Erkennung viraler Nukleinsäuren durch Rezeptoren der angeborenen Immunität entscheidend.

Um diese antiviralen Immunmechanismen auch therapeutisch nutzbar zu machen, müssen selektive Agonisten zur Stimulation von endosomalen und zytosolischen Rezeptoren der angeborenen Immunität identifiziert werden. Ebenso muss ein effizienter und sicherer Transfer der Nukleinsäureliganden in die Zellkompartimente, in denen die Rezeptoren lokalisiert sind, sichergestellt werden, um eine zukünftige Anwendung im Menschen zu ermöglichen.

- 1) In dieser Arbeit wurde die Komplexierung von immunstimulatorischer Ribonukleinsäure (isRNA) mit einem anderweitig bereits für die Klinik zugelassenen Medikament – dem kationischen Peptid Protamin – etabliert. Dabei wurde in Abhängigkeit der isRNA-Sequenz und des Präparats zur Komplexierung das induzierte Zytokinmuster analysiert.
- 2) Einzelstrang-RNA – einschließlich viraler RNA – bildet spontan Sekundärstrukturen aus. Bei der Untersuchung der Auswirkung von RNA-Sekundärstrukturen auf die Erkennung durch die Toll-like Rezeptoren (TLR)7 und TLR8 konnte die Wobble-Basenpaarung Guanodin:Uridin in doppelsträngiger RNA als selektiver TLR7 RNA-Agonist identifiziert werden. Bestimmte Formen dieses Agonisten werden spontan von Zellen aufgenommen und stellen die bisher einzig bekannte Phosphodiester-RNA dar, die ohne vorherige Komplexierung Immunzellen stimuliert.
- 3) Doppelstrang-RNA (dsRNA), insbesondere pl:C, gilt als Agonist für den zytosolischen Rezeptor MDA-5. Bei der Untersuchung einer zytosolischen Erkennung von dsRNA über MDA-5 waren die meisten getesteten dsRNAs inaktiv. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Länge der dsRNA insbesondere die Basenpaarung Inosin:Cytidin (I:C) ein entscheidendes Kriterium für eine Stimulation von MDA-5 ist. Bei einer dsRNA, die neben I:C-Basenpaarungen zusätzlich Guanodin:Cytidin-Basenpaarungen enthält, wird – im Vergleich zu pl:C – die Erkennung über MDA-5 verstärkt. Inosin:Uridin-Paarungen dagegen verhindern die zytosolische Erkennung über MDA-5.

- 4) Neben RNA wird auch Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch Nukleinsäurerezeptoren erkannt, wenn sie ins Zytosol von Zellen gelangt. Das enzymatisch hergestellte DNA-Polymer pdAdT ist bisher der stärkste bekannte Agonist der zytosolischen DNA-Erkennung. In dieser Arbeit wurden bipalindromische konkatemerisierende Oligondesoxynukleotide (bpcODNs) identifiziert, die agonistische Aktivität zeigen. Die Modifikation von bpcODNs mit einem 3'-Monophosphat steigerte deren Aktivität. Mit diesen bpcODNs kann erstmals eine Stimulation mit kurzen DNA Oligonukleotiden in myeloiden Zellen erreicht und die Produktion von Interferon  $\alpha$  induziert werden.

In dieser Arbeit wurden folglich neue immunstimulatorische Nukleinsäurestrukturen identifiziert, die eine selektive Stimulation von Rezeptoren der angeborenen Immunität ermöglichen. Diese könnten für die gezielte Aktivierung und Modellierung der Immunantwort eingesetzt und als chemisch definierte Agonisten für eine therapeutische Nutzung weiterentwickelt werden.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem während einer viralen Infektion

Durch jahrtausendelange Koevolution mit Pathogenen ist das Immunsystem höherer Organismen gut gerüstet, virale Infektionen unverzüglich zu erkennen, einzudämmen und Viren weitgehend zu eliminieren. Um eine effektive Virusabwehr zu gewährleisten, ist das Zusammenspiel der angeborenen (innaten) und der erworbenen (adaptiven) Immunantwort entscheidend. Nach der Detektion einer Virusinfektion werden unverzüglich Mechanismen der angeborenen Immunität ausgelöst, um die Verbreitung der Viren einzugrenzen. Darüber hinaus steuert die innate Immunreaktion die darauf folgende adaptive Immunantwort, bei der virusspezifische Antigene durch Antikörper oder durch T-Zellen auf der Oberfläche infizierter Zellen erkannt werden. Anschließend verbleiben Zellen der spezifischen Immunantwort als immunologisches Gedächtnis zurück. Dabei sind die Rezeptoren von T- und B-Lymphozyten wesentlich für die Erkennung der infizierten Zellen und deren Beseitigung. Die Rezeptoren der adaptiven Immunität entstehen durch somatische Genrekombination [1, 2] und erreichen dadurch eine große Variabilität und Spezifität.

Für die angeborene Immunität sind Zellen mit keimbahnkodierten Rezeptoren ausgestattet, die spezialisiert sind, konservierte Strukturen von Pathogenen (pathogen associated molecular patterns; PAMPs) zu erkennen. Sie sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität und werden als „pattern recognition receptors“ (PRR) bezeichnet. Zu der Gruppe der keimbahnkodierten PRRs gehören all die Rezeptoren, die aufgrund der Erkennung von Krankheitserregern das Transkriptom regulieren. Dadurch werden Zytokine und Chemokine induziert, die das Zusammenspiel von angeborener und adaptiver Immunität koordinieren.

Erkennungsmuster für eine virale Infektion sind virale Nukleinsäuren, die bei einer Infektion in die Zelle gelangen. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Präsenz doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA), die bei der Replikation viraler Viren vorkommt, das hauptsächliche Erkennungsmerkmal eines Virus durch die PRRs sei [3]. Die dsRNA-bindende Proteinkinase PKR (proteine kinase activated by RNA) wurde zunächst als verantwortlich für die Erkennung viraler Infektionen und die Induktion antiviraler Mechanismen erklärt, bis gezeigt wurde, dass PKR alleine nicht essentiell für die Erkennung von Viren war [4].

In den vergangenen Jahren hat sich das Bild der Rezeptoren, die für die Erkennung viraler Nukleinsäuren zuständig sind, sehr verändert. Es wurden weitere Rezeptoren identifiziert, die virale Nukleinsäuren erkennen und für die Induktion des antiviralen Typ I Interferons (IFNs) verantwortlich sind. Toll-like Rezeptoren (TLRs), die in den endosomalen Kompartimenten von Zellen lokalisiert sind, können Nukleinsäuren – RNA und Desoxyribonukleinsäure (DNA) – viraler und bakterieller Herkunft erkennen. Eine Erkennung viraler Nukleinsäuren über TLR7 und TLR9 führt zur Produktion von IFN durch die IFN-produzierende plasmazytoide dendritische Zelle (PDC).

Die Erkennung viraler Nukleinsäuren im Zytosol von infizierten Zellen führen zusätzlich zur PDC auch in anderen Zelltypen zur Produktion von IFN. Neben PKR können die RNA-Helikasen RIG-I (retinoic inducible gene I) [5] und MDA-5 (melanoma differentiation antigen 5) [6, 7] virale RNA detektieren. Zusätzlich zu viraler RNA wird DNA im Zytosol der Zellen erkannt [8].

Das Typ I IFN, insbesondere IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ , ist der zentrale Botenstoff der antiviralen Immunreaktion. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden unmittelbar nach der Erkennung viraler Nukleinsäuren durch die PRRs von verschiedenen Zellen produziert und beeinflussen die Replikation der Viren. Typ I IFN wirkt sowohl autokrin als auch parakrin auf Zellen und induziert die Transkription IFN-regulierter Gene. Dadurch wird ein antiviraler Zustand in Zellen induziert. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  sind in verschiedene antivirale Mechanismen involviert und sind unentbehrlich für eine effektive Abwehr einer Virusinfektion.

Die Nukleinsäureerkennung durch die angeborene Immunantwort stellt somit ein wichtiges System zur Erkennung von Pathogenen dar, das für eine Abwehr von Infektionen ausschlaggebend ist. Durch gezielte Stimulation der PRR kann die Produktion der Zytokine und dadurch die Transkription IFN-regulierter Gene sowie die adaptive Immunantwort beeinflusst werden. Durch eine spezifische Stimulation von Zellen mit Nukleinsäureliganden eröffnet sich die Möglichkeit, gezielt die Immunantwort bei viralen Infektionen und Krebserkrankungen zu manipulieren, ohne eine Infektion hervorzurufen. Daher ist die Suche nach synthetischen, gut definierten und spezifischen Nukleinsäureliganden für einen potentiellen klinischen Einsatz von großer Wichtigkeit.

## **1.2 Die angeborene Immunantwort**

Die angeborene Immunantwort ist eine sehr schnelle und effektive Reaktion auf Krankheitserreger. Sie ist verantwortlich für eine erste Abwehrreaktion und aktiviert

darüber hinaus die etwas später auftretende adaptive Immunantwort [9]. Eine Vielzahl verschiedener Zellen sind an der Erkennung der eindringenden Pathogene durch die angeborene Immunität beteiligt. Dazu gehören insbesondere die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen (DCs), Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und die neutrophilen Granulozyten. Sie exprimieren verschiedene genetisch festgelegte Rezeptoren, die für die Erkennung von Pathogenen, für die Phagozytose und die Migration essentiell sind:

- die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs)
- die RNA-Helikasen (RIG-I-ähnlichen Rezeptoren, RLRs)
- die NOD-like Rezeptoren (NLRs)
- ein oder mehrere Rezeptoren für eine zytosolische DNA Erkennung
- die Scavenger Rezeptoren
- die Mannose Rezeptoren
- die chemotaktischen Rezeptoren

Diese Rezeptoren haben unterschiedliche Funktionen und können in verschiedene Gruppen unterteilt werden.

a) Zunächst seien die PRR genannt, die nach der Detektion von PAMPs durch TLRs, RLRs, NLRs oder nach einer zytosolischen DNA-Erkennung Signalkaskaden aktivieren, die zur Produktion von Effektormolekülen (Zytokinen, Chemokine oder Expression von Oberflächenmarkern) führen. Die PRRs stellen somit die Gruppe der Rezeptoren dar, die nach Erkennung von PAMPs die Transkription bestimmter Gene induzieren. Diese Effektormoleküle können antiviral und antibakteriell wirken, andere Zellen durch Interaktionen aktivieren oder Apoptose auslösen.

b) Die Scavenger Rezeptoren und Mannose Rezeptoren sind für die Phagozytose von extrazellulären Stoffen und von Pathogenen verantwortlich. Nach Aufnahme der Fremdstoffen werden diese prozessiert und auf Oberflächenmolekülen – den Haupthistokompatibilitätsmolekülen (major histocompatibility complex; MHC) – den Lymphozyten der adaptiven Immunantwort präsentiert.

c) Chemotaktische Prozesse wie Migrationen entlang oder entgegen eines Konzentrationsgradientens werden durch die Detektion von Chemokinen über chemotaktische Rezeptoren wie z.B. CXCRs oder CCRs (Chemokinrezeptoren) reguliert. Dadurch werden Zellen beispielsweise zu entzündetem Gewebe geleitet, um dort die induzierte Immunantwort zu unterstützen.

Neben den keimbahnkodierten Rezeptoren ist das Komplementsystem ein wesentlicher Teil der angeborenen Immunantwort. Es ist ein System, an dem viele

verschiedene Plasmaproteine beteiligt sind. Komplementproteine sind Proteasen, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Durch das aktivierte System von Plasmaproteinen kommt es zu einer Reaktionskaskade, die auf der Oberfläche der Pathogene abläuft. Das Komplementsystem wird durch Krankheitserreger oder durch die an Krankheitserreger gebundenen Antikörper ausgelöst. Es führt zur besseren Aufnahme der Pathogene durch Phagozyten, wodurch die Krankheitserreger effektiv vernichtet werden. DCs sind darauf spezialisiert, Pathogene aufzunehmen und sie anschließend als Antigene den Lymphozyten, die einen wichtigen Bestandteil der adaptiven Immunantwort darstellen, zu präsentieren. Zusätzlich zu der direkten Zerstörung bestimmter Bakterien durch Komplementproteine wirken Komplementfragmente als Chemoattraktoren, die Phagozyten anlocken und die Phagozytose der Fremdsubstanzen dadurch verstärken.

### **1.2.1 Die Erkennung viraler Nukleinsäuren**

Nach einer viralen Infektion werden antivirale Mechanismen in den infizierten Zellen ausgelöst, die eine Verbreitung der Infektion verhindern. Die antiviralen Prozesse beeinflussen auch die Vitalität der infizierten Zelle und führen häufig zu deren Apoptose. Daher dürfen antivirale Mechanismen ausschließlich in der infizierten Zelle stattfinden, um das Überleben gesunder Zellen zu sichern. Eine spezifische Erkennung von Viren durch Rezeptoren ist dafür ausschlaggebend.

Die Erkennung von viralen Infektionen durch die Zelle geschieht durch die spezifische Detektion viraler Nukleinsäuren über die PRRs. Da Viren keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und während einer Replikation der neue Virus aus „Bestandteilen“ der Wirtszelle aufgebaut wird, bestehen Viren damit ausschließlich aus wirtseigenem Material. Dennoch ist es notwendig, dass Viren schnell und spezifisch vom Immunsystem erkannt werden. Also muss es Merkmale und Eigenschaften viraler Nukleinsäuren geben, die es PRRs ermöglichen, diese selektiv zu erkennen. Ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung von „Selbst“- und viralen Nukleinsäuren ist deren Lokalisation in der Zelle. Zum anderen können über bestimmte Sequenzen und dem Fehlen oder Vorhandensein bestimmter Modifikationen virale Nukleinsäuren spezifisch erkannt werden. Für diese Erkennung und die darauf folgende Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden sind endosomale TLRs sowie zytosolische Nukleinsäurerezeptoren verantwortlich. Ein besseres Verständnis der Erkennungsmuster von Nukleinsäuren, und die Imitation viraler RNA oder DNA durch synthetische Nukleinsäuren könnten einen therapeutischen Einsatz und dadurch die gezielte Modifikation der Immunantwort ermöglichen.

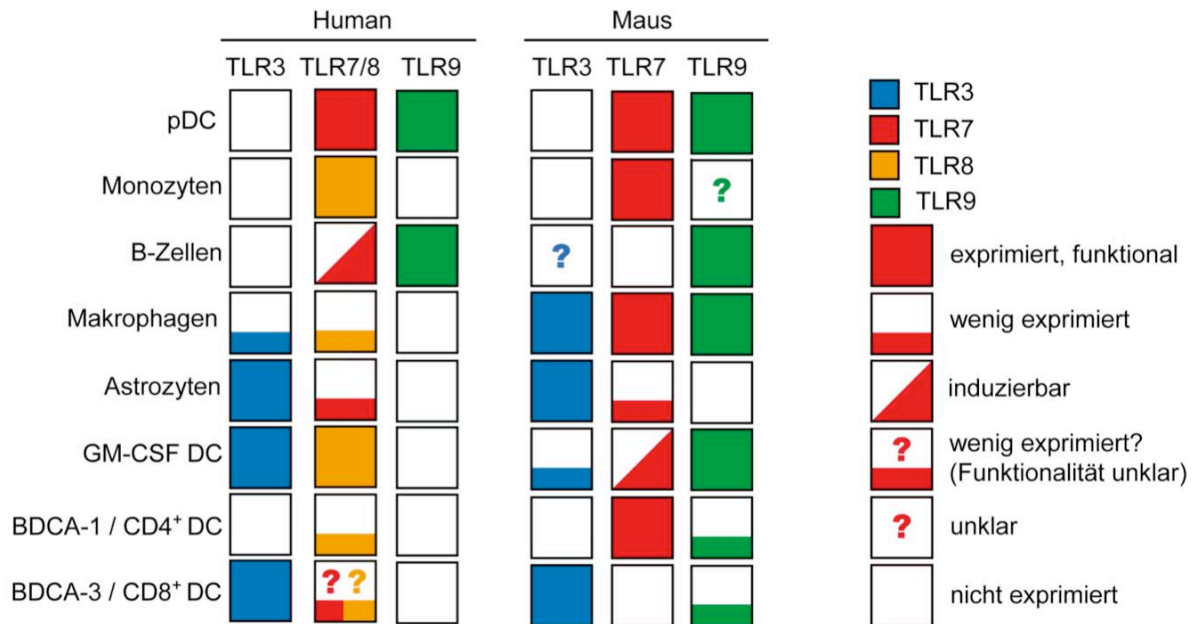
## 1.2.2 Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die TLRs gehören zu der Gruppe von Rezeptoren der angeborenen Immunität, die für die Erkennung von Pathogenen sehr wichtig sind. TLRs sind neben der Erkennung von Bestandteilen, die mit Bakterien, Pilzen oder Parasiten assoziiert sind, darauf spezialisiert, Nukleinsäuren viraler Herkunft zu detektieren und daraufhin antivirale Mechanismen zu aktivieren.

Die erste Beschreibung des Toll-Gens stammt aus der Gruppe um Christiane Nüßlein-Vollhardt. 1985 konnten sie die Rolle des Toll-Gens in der Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* beschreiben [10, 11]. 1996 zeigte sich, dass Toll-defiziente *Drosophila* sehr anfällig für bestimmte Pilzinfektionen waren [12]. In den letzten Jahren wurden mehr als zehn TLRs in Vertebraten identifiziert, die einen wichtigen Teil der angeborenen Immunantwort darstellen. Nach Erkennung bestimmter PAMPs werden TLRs aktiviert und über Signalwege wird die Produktion von Zytokinen induziert. Die transmembranen TLRs, die auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Zellkompartimenten lokalisiert sind [13-15], erkennen Moleküle von Bakterien, Pilzen oder Parasiten als „fremd“ und produzieren daraufhin Zytokine und regulieren bestimmte Oberflächenmarker hoch. Bereits 1998 konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Mutation im TLR4 hatten, resistent gegen das Lipopolysaccharid (LPS) waren [16], und dass TLR4 für die Erkennung von LPS zuständig ist [16-18]. In den folgenden Jahren wurden weitere TLR-defiziente Mäuse generiert, um die Funktion der verschiedenen TLRs genauer zu charakterisieren und deren Liganden zu identifizieren. Inzwischen können die TLRs in mehrere Gruppen unterteilt werden; a) die Gruppe, die Lipidliganden erkennt (TLR1, 2, 4 und 6); b) die Gruppe, die Proteinliganden detektiert (TLR5 und 11) [19, 20] und c) die Gruppe der Nukleinsäure-erkennenden TLRs (TLR3, 7, 8, und 9). Die Nukleinsäure-erkennenden TLRs sind in den Endosomen und Lysosomen von Immunzellen exprimiert. Es wurde gezeigt, dass diese Rezeptoren – TLR3, 7, 8 und 9 – Nukleinsäuren viraler und bakterieller Herkunft detektieren können [21-25].

Nukleinsäure-erkennende TLRs werden nicht ubiquitär exprimiert, sondern kommen überwiegend bei den Immunzellen vor und haben ein zelltypspezifisches Expressionsmuster (Abbildung 1.1). Dieses Expressionsmuster differiert speziesabhängig. TLR7 ist in humanen Zellen hauptsächlich auf PDC und B-Zellen zu finden [26], dagegen ist die Expression von TLR7 in Mausimmunzellen sehr verbreitet (Abbildung 1.1). TLR8 ist nicht funktional im Maussystem [27], scheint aber beim Menschen das Fehlen von TLR7 in Zelltypen wie Monozyten, mDC und Makrophagen zu kompensieren [26, 28, 29]. Die Expression des humanen TLR9 beschränkt sich auf PDC und B-Zellen [26, 28], wohingegen in Mauszellen der TLR9 in einem breiten Spektrum verschiedener Immunzellen exprimiert wird (Abbildung

1.1). Diese speziesabhängigen Unterschiede im Expressionsmuster der Nukleinsäure-detektierenden TLRs erschweren den speziesübergreifenden Vergleich der Funktionalität von Liganden.



**Abbildung 1.1: Expression und Funktionalität von TLR3, 7/8 und 9 im Menschen und in der Maus.**

TLRs, die an der Erkennung von RNA (TLR3, 7/8) und DNA (TLR9) beteiligt sind, werden überwiegend von Immunzellen exprimiert und kommen in diesen zelltypspezifisch vor. In dieser Abbildung werden publizierte Expressionsdaten sowie die Funktionalität (+) der Nukleinsäure-detektierenden TLRs dargestellt. Obwohl das Expressionsmuster in Maus und Mensch ähnlich ist, wird TLR7 und TLR9 in Mauszellen in einem viel breiteren Spektrum von Immunzellen exprimiert. In humanen Immunzellen ist das Fehlen des TLR7 durch den im humanen System funktionalen TLR8 kompensiert.

### 1.2.3 Liganden für die TLRs

TLRs sind spezialisiert jeweils unterschiedliche PAMPs zu detektieren und nach der Erkennung von Pathogenen eine Immunantwort zu induzieren. Sie erkennen konservierte molekulare Strukturen, die mit Bakterien, Pilzen oder Parasiten assoziiert sind. Hier seien als Beispiel die Lipoproteine, Lipopeptide und Peptidoglykane genannt, die in grampositiven Bakterien vorkommen und über TLR2 erkannt werden [30, 31]. Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien dagegen werden über TLR4 erkannt [16-18, 32].

Einige TLRs, wie z.B. die Nukleinsäure-detektierenden TLRs, agieren alleine. Dagegen bildet TLR2 Heterodimere mit TLR1 und TLR6 sowie mit CD36, um verschiedene PAMPs zu unterscheiden. TLR1/2- und TLR2/6-Heterodimere können triacyl- und diacyl-Lipopeptide unterscheiden. Ebenso formt TLR10 mit TLR1 und TLR2 Heterodimere, deren Liganden bisher noch nicht bekannt sind. Bei der Detektion von LPS kooperiert TLR4 mit den extrazellulären Komponenten MD-2 und CD14 (Tabelle 1.1).

Mit der Entdeckung von TLR3 als Sensor für lange dsRNA [21] wurde deutlich, dass TLRs auch Nukleinsäuren erkennen können. Das enzymatisch generierte Polynukleotid pl:C (polyinosinic-polycytidilic acid) aktiviert TLR3 und wird gemeinhin als Surrogat für virale dsRNA verstanden. Neben Viren, deren Genom aus dsRNA besteht, entsteht dsRNA während der Replikation vieler Plus-Strang-ssRNA-Viren [33]. Ebenso treten in der Sekundärstruktur des viralen RNA-Genoms doppelsträngige Bereiche auf, die durch Rezeptoren der angeborenen Immunantwort erkannt werden können. Kürzlich wurde gezeigt, dass zusätzlich zu pl:C doppelsträngige „small interfering“ RNA (siRNA) von TLR3 erkannt werden kann [34]. Diesem TLR wurde zunächst die Schlüsselrolle bei der Detektion viraler Infektionen zugeschrieben, bis sich herausstellte, dass TLR3 nicht universell zur Erkennung viraler Infektionen notwendig ist [35]. Vielmehr wurde deutlich, dass gleichermaßen TLR7 [24] sowie zytosolische RNA-Helikasen für die effiziente Erkennung und die daraus resultierende Induktion antiviraler Zytokine von RNA-Viren notwendig sind [6, 36, 37].

TLR9 erkennt nicht-methylierte CpG-Motive, die häufig in bakterieller und viraler DNA vorkommen [25, 38, 39]. Nach der Erkennung von CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODNs), wird in PDC eine große Menge Typ I IFN induziert. Ebenso werden B-Zellen aktiviert und zur Zellteilung angeregt [40, 41].

TLR	Liganden (PAMPs)	Pathogen	Referenz
TLR1	Heterodimer mit TLR2		
TLR2	Lipoproteine, Lipopeptide, Peptidoglykan	Gram-positive Bakterien	[30, 31]
TLR3	dsRNA	RNA-Viren	[21]
TLR4	Lipopolysaccharide	Gram-negative Bakterien	[16-14, 32]
TLR5	Flagellin	Bakterien	[19]
TLR6	Heterodimer mit TLR2		
TLR7	small molecules, ssRNA	RNA-Viren	[24, 42, 46]
TLR8	small molecules, ssRNA	RNA-Viren	[27,42, 51]
TLR9	CpG-ODN	bakterielle, virale DNA	[25, 38, 39]
TLR10	Heterodimer TLR1 und 2		
TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle	uropathogene Bakterien	[20]

**Tabelle 1.1: Liganden für TLR1-11 und die zugehörigen Pathogene.**

TLR1-11 erkennen konservierte molekulare Muster von Viren, Bakterien oder Parasiten. TLR2 bildet zur Identifizierung der Liganden Heterodimere mit TLR1, 6 und 10. Ebenso bilden TLR1 und TLR10 ein Heterodimer, dessen Ligand noch nicht identifiziert ist.

### 1.2.3.1 Liganden für TLR7 und TLR8

Die ersten definierten Liganden für TLR7 und TLR8 waren synthetische Verbindungen wie Imidazoquinoline und Guanosinderivate, die eine antivirale Immunantwort induzieren können [27, 42-45]. In Experimenten mit murinen Immunzellen wurden Imidazoquinoline zunächst als TLR7-Ligand beschrieben [45]. Spätere Studien zeigten jedoch, dass im humanen System sowohl TLR7 als auch TLR8 durch Imidazoquinoline aktiviert wurden. Der murine TLR8 war jedoch nicht an der Erkennung dieser Moleküle beteiligt [27]. Zusätzlich zu den synthetischen Verbindungen, die im humanen System TLR7 und TLR8 aktivieren, gibt es TLR7-spezifische Moleküle wie Imiquimod R-837, 3M-001 und Loxoribine, die PDC zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimulieren. Als TLR8-spezifischer Stimulus ist 3M-002 bekannt, das nach Erkennung zur Sekretion von Interleukin 12-p70 (IL-12p70) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in Monozyten führt, PDC aber nicht aktivieren kann. Die nach Stimulation von TLR7 oder TLR8 induzierten Zytokinprofile sind entscheidend für einen möglichen therapeutischen Gebrauch dieser Stimuli.



Die Suche nach einem natürlichen Liganden für TLR7 und TLR8 führte zu der Erkenntnis, dass ssRNA aus viraler Herkunft über diese Rezeptoren erkannt wird [24, 46, 47]. Ebenso werden auch synthetische Oligoribonukleotide (ORNs) über TLR7 und TLR8 erkannt [47-49]. Hierbei waren RNA-Sequenzen, die kein Uridin enthielten, inert und Sequenzen mit einem hohen Guanosin-Uridin (GU)-Gehalt zeigten im Gegensatz dazu hohe immunstimulatorische Aktivität [47]. Hornung und Kollegen zeigten 2005, dass die Erkennung von siRNA über TLR7 sequenzabhängig ist, und beschrieben aktive, kurze ssRNA-Sequenzen als immunstimulatorische RNA (isRNA) [48]. Weitere Beobachtungen zeigten, dass Oligoribonukleinsäuren (ORNs), die eine Länge von 21 Nukleotiden (nt) hatten und ausschließlich Uridin in ihrer Sequenz besaßen, ausreichend für eine Stimulation von TLR7 waren [50].

Die große Mehrheit synthetischer isRNAs aktiviert sowohl TLR7 als auch TLR8. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass bestimmte Adenosin-Uridin (AU)-reiche ssRNA-Sequenzen, denen Guanosinukleotide fehlten, spezifisch TLR8 aktivieren. In diesen Studien produzierten Monozyten nach Stimulation von TLR8 mit AU-reicher isRNA TNF- $\alpha$  und IL-12p70, ohne PDC über TLR7 zur Sekretion von IFN- $\alpha$  zu stimulieren [51]. Eine isRNA zur selektiven Stimulation von TLR7 wurde noch nicht identifiziert. Bisher ist noch unklar was die biologische Funktion für die Unterscheidung von TLR7 und TLR8 im humanen System ist. Dennoch würde die Identifizierung eines selektiven TLR7-Ligandens die Möglichkeit eröffnen, einerseits durch Stimulation von TLR7 oder TLR8 unterschiedliche Zelltypen im humanen System zu aktivieren und andererseits spezifische Zytokinmuster durch isRNA in einer Mischpopulation humaner peripherer Blutzellen (PBMC) zu induzieren.

Die Tatsache, dass lange, virale RNA komplexe Sequenz- und Sekundärstrukturen besitzt, lässt vermuten, dass sowohl TLR7 als auch TLR8-Liganden im Genom von RNA-Viren enthalten sind. In physiologischen Konditionen verbleibt ssRNA nicht einzelsträngig, sondern bildet viele Basenpaarungen, um die freie Energie zu minimieren [52]. Die immunstimulatorische Untersuchung von siRNA zeigte, dass auch doppelsträngige siRNA TLR7 stimulieren kann, doch dass die stimulierende Aktivität verglichen mit dem einzelsträngigen, kodierenden Strang der siRNA sehr gering ist [48, 53]. Die Tatsache, dass nicht nur ssRNA immunstimulatorisch ist, sondern auch dsRNA erkannt wird, deutet darauf hin, dass Sekundärstrukturen zur Identifizierung spezifischer Liganden in Betracht gezogen werden müssen.

### 1.2.4 Signalwege der Nukleinsäure-erkennenden TLRs

Nach Erkennung von Viren durch TLRs werden Mechanismen in der infizierten Zelle in Gang gesetzt, um die Virusreplikation einzudämmen und weitere Zellen vor einer Infektion zu schützen.

Die membranständigen TLRs befinden sich in der endosomalen Membran oder in der Zellmembran und besitzen eine zytoplasmatische Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne). Der aktivierende Signalweg, von der Erkennung eines Ligandens durch einen TLR bis hin zur Produktion bestimmter Zytokine und Chemokine, ist abhängig vom Zelltyp und dem aktivierten TLR. Viele Signalkaskaden führen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B). NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle in vielen Prozessen der angeborenen und adaptiven Immunantwort besitzt. Er reguliert die Transkription von Genen, die verantwortlich für die Produktion von Zytokinen oder Chemokinen sind.

Bei der Untersuchung der Signaltransduktion zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nach der Stimulation von TLR4 wurde zunächst die Rekrutierung der Moleküle MyD88 (myeloid differentiation primary response protein) und der Serin-Threonin-Kinase IRAK (interleukin-1 receptor associated kinase) identifiziert [54-56]. MyD88-defiziente Mäuse zeigten, dass das TIR-Domänen-Adaptermolekül MyD88 essentiell für die Erkennung der meisten TLR-Liganden ist [57, 58]. Die Aktivierung von TLR3 und TLR4 war jedoch auch in MyD88-defizienten Mäusen noch möglich. Das TIR-Domänen-Adaptermolekül TRIF (TIR-domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$ ) wurde identifiziert und schien ausschlaggebend für die Erkennung von pl:C durch TLR3 zu sein [59]. Später wurde gezeigt, dass die Stimulation von TLR4 mit LPS sowohl den TRIF-abhängigen als auch den MyD88-abhängigen Signalweg aktivieren kann, und dass Mäuse, die weder MyD88 noch TRIF besitzen, nicht mehr auf LPS reagieren können [60].

#### 1.2.4.1 Der MyD88-abhängige Signalweg

Die Erkennung viraler und bakterieller Nukleinsäuren über TLR7/8 und TLR9 führt über den MyD88-abhängigen Signalweg zur Produktion von Typ I IFN und von proinflammatorischen Zytokinen und ist somit ein wesentlicher Teil der angeborenen Immunität. Die Rekrutierung des Adaptermoleküls MyD88 ist essentiell für die Aktivierung der Signalkaskade nach Erkennung von Liganden durch TLR7/8, TLR9 und durch andere zellmembranständige TLRs. MyD88 ist in eine C-terminale und eine N-terminale „death“-Domänenregion unterteilt. Nach Stimulation eines TLRs assoziiert MyD88 mit dessen TIR-Domäne und rekrutiert durch Interaktionen mit der

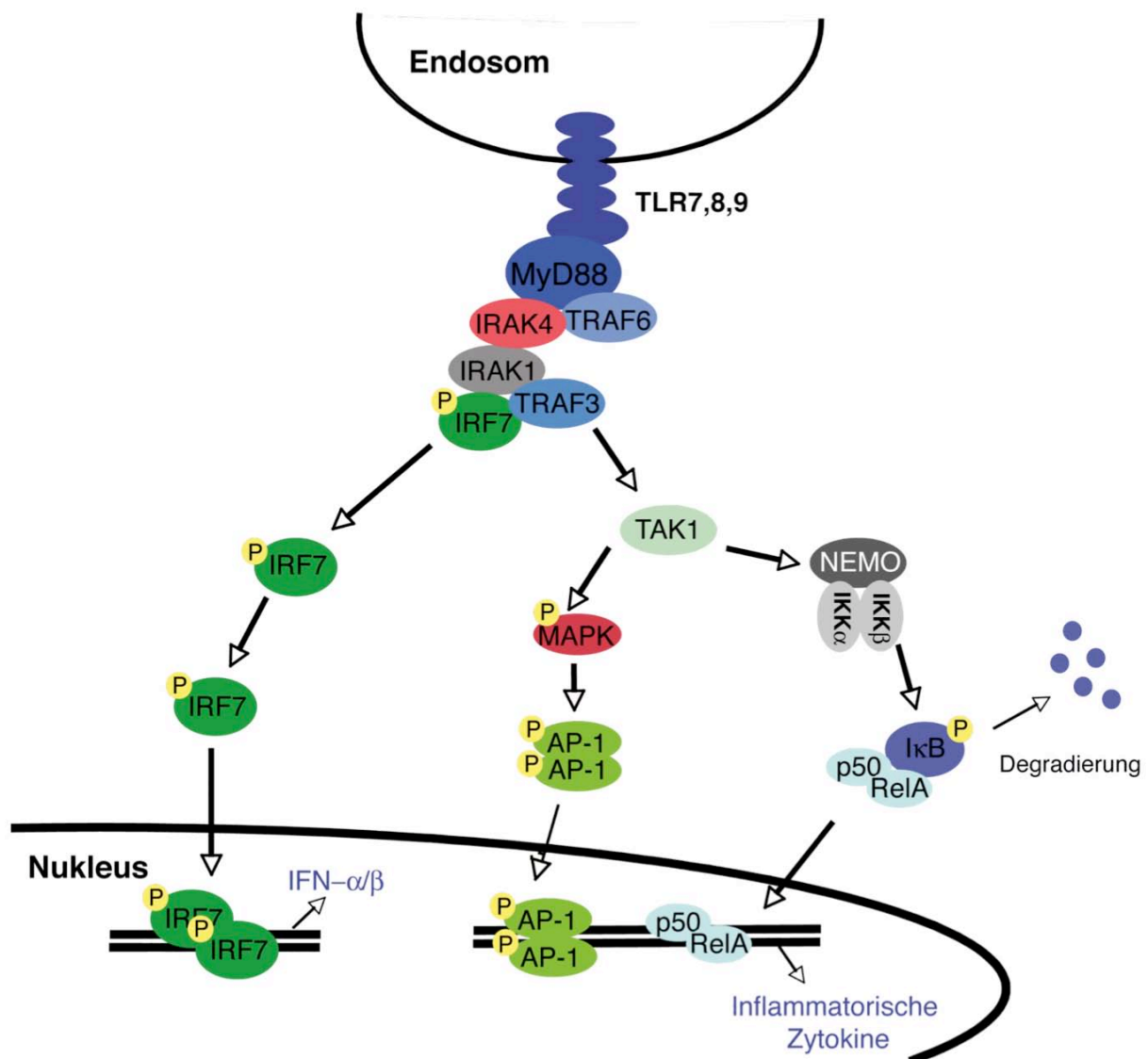
N-terminalen Region von MyD88 IRAK1 und IRAK4 [61, 62]. Dies führt zur Phosphorylierung von IRAK1 und IRAK4. IRAK1 bindet an die TRAF (TNF-receptor-associated-factor)-Domäne, die zu der Familie der TNF (tumor necrosis factor)-Rezeptoren assoziierten Faktoren gehört [63]. Hier unterteilt sich der Signalweg in den IRF (interferon regulatory factor)- oder den NF- $\kappa$ B-aktivierenden Weg.

Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor IRF7 essentiell für die Induktion von Typ I IFN nach Stimulation von TLR7 und TLR9 ist [64]. IRF7 kann sowohl direkt mit IRAK1 interagieren oder wird durch die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von TRAF6 aktiviert. Nach Interaktion wird IRF7 phosphoryliert und in den Zellkern translokalisiert, wo es die Produktion von Typ I IFN induziert.

Für die Induktion proinflammatorischer Zytokine spielt die Aktivierung von I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B) eine wesentliche Rolle. Der IRAK1/TRAF6-Komplex dissoziiert vom Rezeptor und assoziiert mit der TGF- $\beta$  (tumor growth factor  $\beta$ )-aktivierten Kinase 1 (TAK1) und den TAK-Bindungsproteinen TAB1 und TAB2 an der Membran. Während IRAK1 an der Membran verbleibt und degradiert wird, dient TRAF6 als Signalüberträger zur späteren Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinase. Der Komplex aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 gelangt in das Zytoplasma und bindet dort noch weitere Proteine (den dimeren Ubiquitin-konjugierenden Enzymkomplex E2 bestehend aus Ubc13 und Uev1A), die zur Aktivierung von IKK (I $\kappa$ B-Komplex) notwendig sind [65]. IKK besteht aus mehreren Untereinheiten, den katalytischen IKK $\alpha$  und  $\beta$ -Kinasen und dem regulatorischen Protein NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator). Durch die Rekrutierung von TAK1 werden zwei verschiedene Signalwege aktiviert. Einerseits wird IKK aktiviert und anschließend I $\kappa$ B phosphoryliert. Durch Wechselwirkungen mit dem phosphorylierten I $\kappa$ B wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert. Andererseits wird über TAK1 die Signalkaskade der MAP-Kinasen (MAPKs; mitogen-activated protein kinase) ERK (extracellular signal-related kinase), JNK (JUN N-terminal Kinase) und p38 (p38 mitogen-activated protein kinase) angestoßen. Die MAPKs werden phosphoryliert und aktivieren den Transkriptionsfaktors AP-1 (activator protein 1). Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 wird die Produktion inflammatorischer Zytokine reguliert.

Zur Untersuchung der Signalwege sind gendefiziente Mäuse ausschlaggebend, was die Erforschung der möglicherweise leicht verschiedenen Signalwege im humanen System erschwert. Da TLR8 in der Maus nicht auf RNA oder Imidazoquinolinderivate reagiert [27], sind bisher keine Unterschiede in den Signalkaskaden von TLR7 und TLR8 bekannt. Naheliegend ist, dass im humanen System nach TLR7-Aktivierung überwiegend der IFN- $\alpha$  induzierende IRF7-abhängige

Weg eingeschlagen wird, wogegen TLR8-Aktivierung vermutlich ausschließlich den Signalweg zur Induktion inflammatorischer Zytokine aktiviert.



**Abbildung 1.2: Signalweg nach der Erkennung von Nucleinsäuren über TLR7/8 und TLR9.**

Nach Erkennung von ssRNA über TLR7/8 oder CpG-DNA über TLR9 wird der MyD88-abhängige Signalweg aktiviert. Die Signalkaskade führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-7, NF- $\kappa$ B oder AP-1 und anschließend zur Produktion von IFN- $\alpha/\beta$  oder inflammatorischen Zytokinen.

### 1.2.5 Die RNA-Helikasen RIG-I, MDA-5 und LGP2

Neben der Erkennung von Nucleinsäuren durch die endosomalen TLRs (TLR3, TLR7/8 und TLR9) werden Nucleinsäuren viraler Herkunft im Zytosol von Zellen erkannt. Die Expression der zytosolischen Rezeptoren RIG-I (retinoic acid inducible

gene I) und MDA-5 (melanoma differentiation antigen 5) beschränkt sich nicht auf Immunzellen [66], sondern sie werden ubiquitär in Zellen exprimiert. Da über diese Rezeptoren eine Vielzahl von somatischen Zelltypen (einschließlich Tumorzellen) stimuliert werden kann, hat eine gezielte Stimulation ein breites therapeutisches Potential und macht die Identifizierung von Liganden besonders wichtig.

Lange Zeit galt PKR als wichtigster zytosolischer Rezeptor zur Detektion von dsRNA, die während der Replikation von Viren entsteht und für die Produktion von Typ I IFN verantwortlich ist [67]. Inzwischen wurde jedoch entdeckt, dass nach Erkennung viraler RNA über die zytosolischen Helikasen RIG-I [5] und MDA-5 [68, 69] die Produktion von IFN- $\alpha$  induziert wird. Sowohl RIG-I als auch MDA-5 sind ausschlaggebend für die Abwehr viraler Infektionen.

RIG-I wurde 2004 als dsRNA-detektierender Sensor von Yoneyama und Kollegen identifiziert [5]. Die DExD/H-Box-Helikase RIG-I ist definiert durch seine ATPase Aktivität, die dsRNA entwinden kann [5]. Sie besitzt zusätzlich zu der C-terminalen Helikase-Domäne zwei N-terminale CARD (caspase recruitment)-Domänen, die essentiell für die Signalübertragung sind. MDA-5 besitzt wie RIG-I eine ATPase aktive DExD/H-Box-Helikase und zwei CARD-Domänen [68]. Bei der Signalübertragung interagiert die CARD-Domäne des Adaptermoleküls IPS-1 mit den CARD-Domänen von RIG-I bzw. MDA-5. TBK1 (TANK-binding kinase 1) und IKKi sind erforderlich für die IPS-1 (interferon  $\beta$ -promotor stimulator 1)-abhängige Aktivierung von IRF3 und NF- $\kappa$ B und die anschließende Produktion des antiviralen IFNs [5, 8, 70].

Neben den zytosolischen Helikasen RIG-I und MDA-5, die als positiver Regulator bei der Virus induzierten Produktion von Typ I IFN agieren, dient LGP2 der Negativregulation bei der Typ I IFN-Induktion [71, 72]. LGP2 ist ein IFN-induziertes Protein, das mit hoher Affinität dsRNA bindet [71]. Nach Aktivierung von RIG-I und MDA-5 wird Typ I IFN produziert, wodurch die Expression von LGP2 ansteigt. Die negative Rückkopplung durch LGP2 verhindert pathologische Konditionen aufgrund überhöhter Zytokinproduktion als Antwort auf eine Virusinfektion.

### 1.2.6 Liganden für MDA-5

Sowohl MDA-5 [68] als auch RIG-I [5, 73, 74] wurden zunächst als Rezeptoren viraler dsRNA beschrieben, die bei der Replikation einiger Plus-Strang-Viren entsteht [33] oder in dsRNA-Viren vorkommt. Lange Zeit galt pl:C als Analogon langer dsRNA und wurde als Ligand für MDA-5 und RIG-I bezeichnet. Experimente mit MDA-5-defizienten Mäusen zeigten jedoch, dass pl:C zytosolisch selektiv von MDA-5

erkannt wird [6, 7]. Ebenso wurde beschrieben, dass das Encephalomyocarditis Virus (EMCV) – ein Virus der Picornavirusfamilie – von MDA-5 detektiert wird. Influenza Virus und Japanese Encephalitis Virus dagegen aktivieren RIG-I [6, 7]. Als nicht viraler Ligand für RIG-I wurde zunächst *in vitro*-transkribierte RNA beschrieben [7], bis 2006 gezeigt wurde, dass das 5'-Triphosphat von *in vitro*-transkribierter oder viraler RNA verantwortlich für die Erkennung durch RIG-I ist [36, 37].

Weitere Untersuchungen der MDA-5-abhängigen Erkennung von pl:C zeigten, dass diese dsRNA in ihrer langen Form (>1000 bp) als MDA-5-Ligand agiert. Wird pl:C jedoch durch Enzyme in kürzere Fragmente verdaut (etwa 300-1000 bp) nimmt die MDA-5-abhängige Aktivität proportional zur Länge ab, während eine RIG-I-abhängige Erkennung der kürzeren pl:C-Fragmente unabhängig von einem 5'-Triphosphat beschrieben wurde [75]. Andere Studien zeigten, dass in Abhängigkeit von MDA-5 und von RIG-I Produkte der Endoribonuklease RNaseL IFN- $\beta$  induzierten [76]. RNaseL war ebenfalls ausschlaggebend für die durch pl:C-induzierte IFN- $\beta$ -Produktion [76].

Bisher konnte neben den Picornaviren und pl:C noch kein definierter Ligand, der für die Erkennung der Picornaviren durch MDA-5 verantwortlich ist, identifiziert werden. Es ist noch weitgehend unklar, welches die nötigen Merkmale für eine Stimulation von MDA-5 sind.

#### **1.2.6.1 MDA-5 erkennt mit Picornaviren assoziierte Agonisten**

Bisher wurde noch kein definierter Ligand für MDA-5 identifiziert, jedoch wurde gezeigt, dass pl:C ein Agonist für MDA-5 ist. Ebenso wurde deutlich, dass nach einer Infektion durch Picornaviren ein Ligand in der infizierten Zelle entsteht, der über MDA-5 erkannt wird [6, 7]. Daher ist naheliegend, dass strukturelle Merkmale der Picornavirusfamilie eine Hilfestellung zur Identifizierung eines potentiellen Ligandens für MDA-5 darstellen könnten. Da MDA-5 ähnlich wie RIG-I eine RNA-Helikase ist, die dsRNA bindet und den Doppelstrang entwindet [68], handelt es sich vermutlich um eine bestimmte RNA-Struktur, die durch MDA-5 erkannt wird.

Picornaviren sind die Ursache vieler Krankheiten in Vertebraten und stehen somit im Fokus der Forschung. Der Name PicoRNA-Virus kommt daher, dass sie zu den kleinsten RNA-Viren gehören. Picornaviren sind eine Gruppe von unbehüllten Viren mit einem unsegmentierten RNA-Genom positiver Polarität. Das Genom enthält einen einzigen offenen Leserahmen („open reading frame“; ORF), flankiert von einer nicht-translatierten Region (non-translated region; NTR) am 3'- und am 5'-Ende. Das RNA-Genom ist am 5'-Ende kovalent an ein Peptid-Cap (viral protein g; Vpg) [77] gekoppelt, das aus 22 Aminosäuren besteht. Das 3'-Ende des Genoms ist

polyadenyliert. Picornaviren kodieren also eine RNA, die für die Wirtszelle als mRNA dient und ohne vorherige Transkription translatiert werden kann. Die Translation des viralen Genoms beginnt an der internen ribosomalen Eintrittsstelle (internal ribosome entry site; IRES), die in der 5'-NTR lokalisiert ist [78, 79]. Während der Translation wird ein Polypeptid synthetisiert, das durch virale Proteasen co- und post-prozessiert wird.

### **1.2.6.2 Inosin und die dsRNA-spezifische Adenosindesaminase (ADAR)**

In den vergangenen Jahren wurde pl:C häufig als Surrogat von dsRNA eingesetzt und in vielen Studien verwendet. Es wurde als Agonist von TLR3 [21], MDA-5 [6, 7] und lange Zeit auch von RIG-I beschrieben [5]. Da pl:C eine lange dsRNA ist, die aus einer langen Polycytidin-RNA (pC) besteht und an eine lange polyinosin-RNA (pl) hybridisiert ist, kommt die Frage auf, wo in der Natur das Nukleotid Inosin vorkommt. Durch RNA-Editierung kann neben den Basen Guanin, Cytosin, Adenin und Uracil die Purinbasen Hypoxanthin – ein selten auftretender Bestandteil in der RNA – vorkommen. Zusammen mit der Ribose bildet Hypoxanthin das Nukleosid Inosin.

Für die Entstehung verschiedener RNAs aus einem einzelnen Gen sind post-transkriptionale Mechanismen verantwortlich. Neben dem „Splicen“ ist das „RNA-Editing“ (RNA-Editierung) von großer Bedeutung. Bei der RNA-Editierung wird spezifisch durch Modifikation einzelner Basen die Sequenz der RNA verändert. Die Konvertierung von Adenosin zu Inosin durch die Adenosindesaminase ADAR (adenosin deaminase acting on double stranded RNA) in einer dsRNA-Struktur induziert eine lokale Entwindung der dsRNA [80]. Adenosin wird zu Inosin desaminiert, wodurch zunächst eine Inosin:Uridin-Paarung entsteht. Inosin unterscheidet sich nur durch die Präsenz einer exozyklischen Aminogruppe von Guanosin und bildet bevorzugt Basenpaarungen mit Cytidin aus. Cytidin paart mit Guanosin. Somit besitzt ADAR das Potential, die Sequenz in der dsRNA zu modifizieren: aus Adenosin:Uridin-Basenpaaren entstehen während der Transkription – über die Zwischenstufe einer Inosin:Uridin-Basenpaarung – Inosin:Cytidin-Basenpaare. Die Bindungsstärke der Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Inosin und Uridin ist sehr viel schwächer als die entsprechende Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Adenosin und Uridin. Dadurch kann es zusätzlich zu einer Strukturänderung der Sekundärstruktur der modifizierten dsRNA kommen.

Im Menschen gibt es ADAR1-3, deren Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Neben der im Nukleus der Zelle exprimierten Form wird ADAR zusätzlich zytosolisch exprimiert; diese zytosolische Form ist IFN-induzierbar [81].

Da dsRNA im Zytosol in Zusammenhang mit viralen Infektionen gebracht wird, ist eine potentielle Rolle von ADAR in der Virusabwehr möglich. Bei der dsRNA-vermittelten antiviralen Aktivität durch die Phosphorylierung von PKR und der 2'-5'-Oligoadenylat-induzierten RNA-Degradierung, könnte ADAR zusätzlich eine zentrale Rolle bei der Modifikation viraler dsRNA spielen.

### 1.2.7 Immunerkennung von DNA im Zytosol

Neben viraler RNA wird auch virale DNA im Zytosol detektiert und induziert die Aktivierung von Signalkaskaden. Schon lange Zeit wurde beobachtet, dass doppelsträngige DNA (dsDNA), die in das Zytosol von Zellen gelangt, die Expression von MHC-Molekülen hoch reguliert und NF- $\kappa$ B aktiviert [82, 83]. Da diese DNA-Erkennung unabhängig von dem DNA-detektierenden TLR9 ist, wurde vermutet, dass es einen weiteren DNA-erkennenden Rezeptor gibt [84, 85]. Plasmid-DNA [85] wie auch virale DNA vom Herpes Simplex Virus [86] induzierte die Aktivierung von IRF7 oder Typ I IFN in anderen Zellen als PDC. 2006 wurde gezeigt, dass durch Stimulation von Zellen mit dsDNA der B-Form (B-DNA) Typ I IFN produziert wird, jedoch dsDNA der Z-Form (Z-DNA) nicht erkannt wird [8]. B-DNA aktivierte IRF3 sowie den IFN- $\beta$ -Promotor abhängig von TBK1 und IKK; die NF- $\kappa$ B Aktivierung schien jedoch unabhängig von TBK1 und IKK zu sein. Beide Signalwege waren abhängig von dem RIG-I-Adaptermolekül IPS-1 [8].

2007 wurde DLM-1 (auch ZBP1 genannt; Z-DNA binding protein), dessen Funktion bisher noch unbekannt war, als Kandidat für einen zytosolischen DNA-Rezeptor vorgeschlagen [87]. Für diesen, nun identifizierten DNA-Rezeptor, wurde der Name DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor) verwendet [87]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass DAI dsDNA bindet und die Expression von DAI in Maus-Fibroblasten die DNA-abhängige Induktion von Typ I IFN erheblich steigerte [87], wurde schon ein Jahr später durch die Generierung von ZBP1-defizienten Mäusen widerlegt, dass DAI (ZBP1) der einzige DNA-detektierende Rezeptor im Zytosol von Zellen ist [88]. In diesen Studien wurde TBK1 eine Schlüsselrolle für den Signalweg des zytosolischen DNA-Rezeptors zugeschrieben [88].

Die Identifizierung eines Rezeptors, der zytosolische DNA detektieren kann, ist bis heute noch sehr umstritten. Auch konnte noch kein eindeutiges DNA-Erkennungsmuster für eine zytosolische DNA-Erkennung identifiziert werden. Da dieser Rezeptor dsDNA verschiedenen Ursprungs erkennen kann [85-87], könnte auch ein Zusammenspiel verschiedener Rezeptoren für die Erkennung von zytosolischer dsDNA zuständig sein.



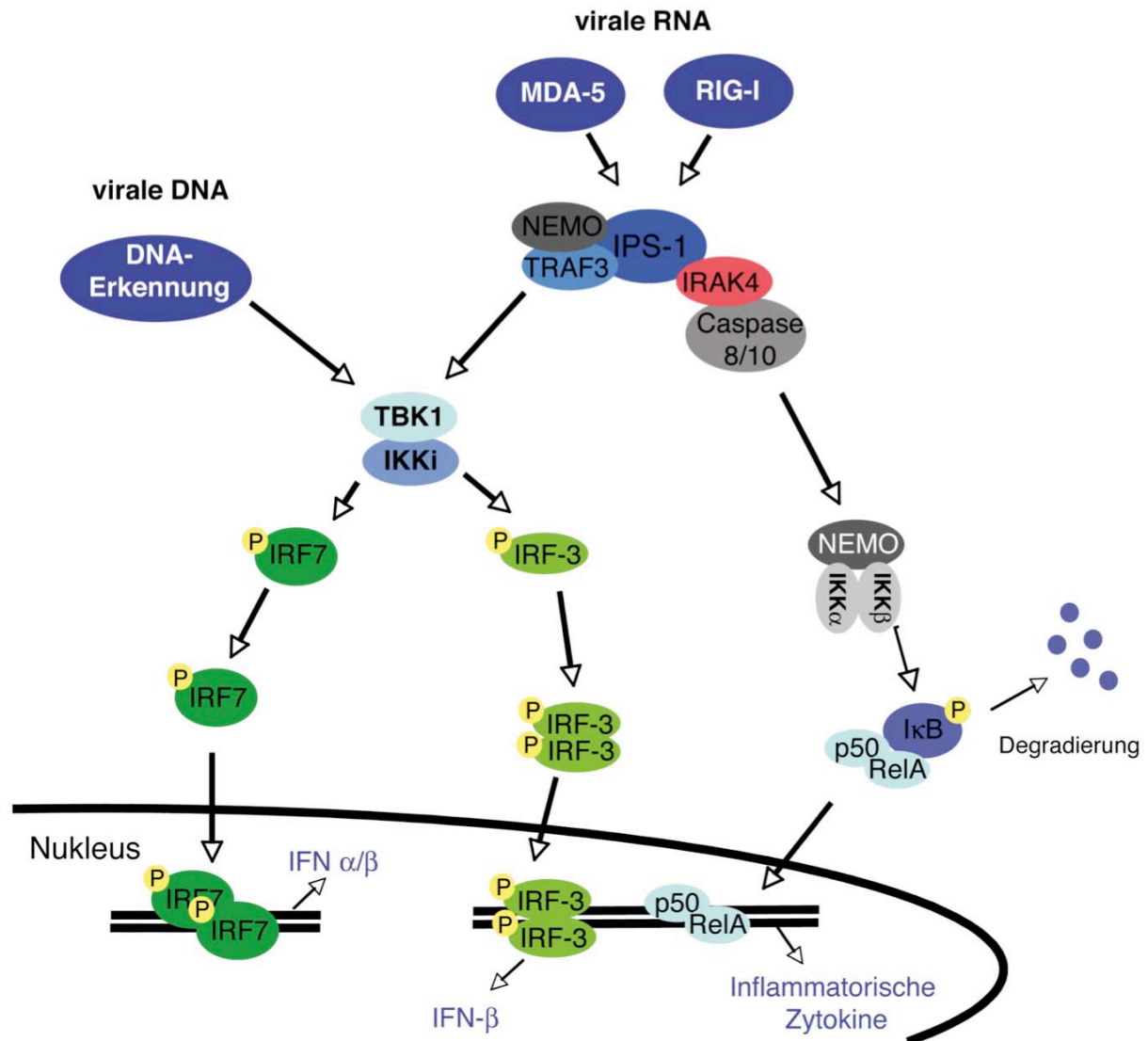
### 1.2.8 Signalwege nach Erkennung zytosolischer Nukleinsäuren

Nach Erkennung viraler Nukleinsäuren im Zytosol von Zellen wird die Produktion von Typ I IFN und anderen Zytokinen induziert, die essentiell für die Virusabwehr sind. Zur Aktivierung der Transkription zytokinkodierender Gene werden Signalwege aktiviert, die letztendlich die Translokation der Transkriptionsfaktoren IRF und NF- $\kappa$ B in den Nukleus und die Produktion der Zytokine zur Folge haben.

Die RNA-Helikasen RIG-I und MDA-5 besitzen jeweils zwei CARD-Domänen, die erforderlich für die Rekrutierung des CARD-Domäne-besitzenden Adaptermoleküls IPS-1 (auch bekannt als MAVS, Cardif oder VISA) sind. IPS-1 ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und ist essentiell für die RIG-I- und MDA-5-abhängige Signaltransduktion [89-92]. Zur Induktion von Typ I IFN interagiert IPS-1 mit TRAF3 [93]. Anschließend wird durch TRAF3 TBK1 und IKKi aktiviert, wodurch es zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 kommt [94]. Nach der Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 translokalisieren diese Transkriptionsfaktoren in den Nukleus und aktivieren die Transkription der Typ I IFN-kodierenden Gene.

Ein paralleler Signalweg trägt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B bei. Dabei aktiviert IPS-1 FADD (Fas-associated death domain) und Caspase 8 und 10 [95]. Anschließend wird der IKK-Komplex, bestehend aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und einer regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$  (auch NEMO genannt), aktiviert. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B. I $\kappa$ B wird polyubiquinyliert und degradiert, wodurch NF- $\kappa$ B eine Translokation in den Zellkern ermöglicht wird. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert die Transkription der Gene, die proinflammatorische Zytokine kodieren.

Die zytosolische DNA-Erkennung interagiert direkt mit TBK1 und IKKi. Diese Signalkaskade ist unabhängig vom Adaptermolekül IPS-1 und aktiviert die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 [8, 70, 96].



**Abbildung 1.3: Signalweg nach Erkennung viraler RNA und viraler DNA im Zytosol.**

Die Erkennung von RNA viraler Herkunft im Zytosol durch die Rezeptoren MDA-5 und RIG-I führt zur Aktivierung der Signalkaskade über IPS-1 bis hin zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren. Der Signalweg nach Erkennung von zytosolischer DNA ist unabhängig von IPS-1, aber abhängig von TBK1. Die Erkennung der viralen Nucleinsäuren führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und zur Produktion verschiedener Zytokine in der Zelle.

### 1.2.9 Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“ – Lokalisation und Modifikationen

Um nach einer Infektion eine Immunantwort zu induzieren, ist es notwendig, für die infizierte Zelle Nucleinsäuren von Viren und anderen Pathogenen als „fremd“ zu identifizieren. Die Erkennung von Pathogen assoziierten Molekülen basiert auf der

Strategie, nur die Muster zu erkennen, die einzigartig in Pathogenen vorkommen. Die Erkennung von bakteriellen und viralen Nukleinsäuren als Gefahrensignal wirft dementsprechend folgende Fragen auf: a) was sind die Strukturen oder Sequenzen der DNA oder RNA, die mit Pathogenen assoziiert werden und eine Immunantwort induzieren, b) wie können Viren erkannt werden, die aus Material der Wirtszelle bestehen und keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und c) wie kann eine Aktivierung von PRR durch endogene RNA verhindert werden?

Nukleinsäure-detektierende TLRs sind intrazellulär in endosomalen Kompartimenten lokalisiert [13-15]. Die gemeinsame Lokalisation dieser TLRs lässt vermuten, dass sie erforderlich für die spezifische Detektion entsprechender Liganden sind. Bakterien und Viren gelangen bei der Aufnahme in das Lysosom/Endosom und ihre Nukleinsäuren können von TLRs detektiert werden. Eine Ansäuerung der Endosomen ist notwendig für eine TLR-Aktivierung. Nicht zuletzt könnte dies die Erkennung viraler und bakterieller Nukleinsäuren durch TLRs unterstützen, da durch die Ansäuerung virale Partikel und die bakteriellen Zellwände zersetzt werden können und Nukleinsäuren der Pathogene für die TLRs zugänglich werden.

Unter normalen Konditionen ist „Selbst“-RNA nur im Zytoplasma und im Kern der Zelle zu finden. Eine Erkennung und Aktivierung der TLRs durch „Selbst“-Nukleinsäuren in den Endosomen findet daher im gesunden Zustand der Zelle nicht statt. Erst in pathologischen Situationen kann „Selbst“-DNA über TLR9 [97] oder „Selbst“-RNA über TLR7/8 [98] erkannt werden und zu Autoimmunreaktionen führen. Neben der Lokalisation spielen Modifikationen der Nukleinsäuren eine ausschlaggebende Rolle bei der Erkennung durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Es wurde berichtet, dass bakterielle DNA im Vergleich zu Vertebraten-DNA mehr nicht-methylierte CpG-Dinukleotide enthält, die als TLR9-Liganden dienen [99].

Schon 1999 waren mehr als 95 posttranskriptionale Modifikationen in verschiedenen RNAs (tRNA, rRNA, mRNA, small nuclear RNA und anderen RNAs) bekannt [100-103], die die Erkennung durch das angeborene Immunsystem beeinflussen und verhindern könnten. So besitzt z.B. mRNA, die im Nukleus eukaryotischer Zellen transkribiert wurde, zunächst ein 5'-Triphosphat. Bevor sie den Zellkern verlässt, wird das 5'-Ende der mRNA mit einem 7-methyl-Guanosin Cap versehen [104]. Hornung und Kollegen zeigten, dass diese Modifizierung die Aktivierung von RIG-I durch das 5'-Triphosphat verhindert [36]. Ebenfalls wurde die Erkennung von 5'-Triphosphat-RNA durch interne Modifikationen wie Pseudouridin, 2-thio-Uridin und 2'-O-methyl-Uridin verhindert [36].

Die Tatsache, dass siRNA Zellen über TLR7 [48] und TLR3 stimulieren kann, führte zu der Suche nach RNA-Modifikationen, die eine Immunstimulation unterdrücken,

während der siRNA-Effekt bestehen bleibt. Es zeigte sich, dass Thymidin anstelle von Uridin die Immunstimulation verhindert, das „silencing“ durch die siRNA jedoch nicht beeinflusst [53]. Dagegen reduzierte 2'-O-methyl-Uridin und 2'-desoxy-Uridin sowohl die Stimulation als auch den siRNA-Effekt [53]. Eine Auswahl an Modifikationen, die eine Erkennung der Nukleinsäuren durch das Immunsystem verhindern, sind in Tabelle 1.2 dargestellt.

Folgende Modifikationen von Nukleinsäuren Verhinderung die Erkennung durch das Immunsystem

Rezeptor	Natürlich vorkommende Modifikationen	Synthetische Modifikationen	Referenzen
TLR3	m6A*, s2U*		[101]
TLR7/8	ψ, s2U, 2'-O-mU, 2'-O-mA, 2'-O-mG, 2'-dU, dT, m5C*, m6A*, m5U*, s2U*	PS-2'Deoxyribose, 3'-LNA	[48, 53, 101-103, 179]
TLR9	CpG Methylierung	PS-2'Deoxyribose	[25]
RIG-I	m7G, ψ, s2U, 2'-O-mU		[36]
MDA-5	nicht untersucht		
DNA-R	nicht identifiziert	brom	[8]

\* evaluiert in HEK293 Zellen die TLR3, 7 oder 8 überexprimieren

Pseudouridin ( ψ )	2'-O-methyl-Uridin (2'-O-mU)
2-thio-Uridin (s2U)	2'-O-methyl-Adenosin (2'-O-mA)
2' Deoxyuridin (2'-dU)	2'-O-methyl-Guanosin (2'-O-mG)
Thymidin (dT)	7-methyl-Guanosin cap (m7G)
Phosphothioat 2' desoxyribose (PS-2'-deoxyribose)	5-methyl-Cytidin (m5C)
Bromierung (brom)	6-methyl-Adenosin (m6A)
3' locked nucleic acid (3'-LNA )	5-methyl-Uridin (m5U)

**Tabelle 1.2: Modifikationen von Nukleinsäuren können die Erkennung durch das Immunsystem verhindern.**

Bevor die RNA in Säugerzellen den Zellkern verlässt, wird sie prozessiert und modifiziert. Dadurch wird eine Unterscheidung von „Selbst“- und „Fremd“-RNA durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ermöglicht.

**1.3 Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort**

Bei einer viralen Infektion haben Immunzellen die Aufgabe, die Ausbreitung des Virus zu unterbinden. Insbesondere myeloide Zellen (Monozyten, Makrophagen und DCs) haben eine begrenzte Lebensdauer. Daher müssen die Zellen kontinuierlich erneuert werden, damit die Zellzahl konstant bleibt und ein funktionelles Zellsystem vorhanden

ist. Dies geschieht durch die Hämatopoese, bei der hämatopoetische Stammzellen zu verschiedenen Blutzellen differenzieren. Folgende Mechanismen regulieren die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts (Homeostase) im Blut:

- Kontrolle der lokalen Konzentration und Art von Zytokinen, die von Knochenmark-Stromazellen produziert werden
- Produktion von Zytokinen durch andere Zelltypen wie z.B. aktivierte T-Zellen und Makrophagen
- Regulation der Expression von Rezeptoren auf der Oberfläche von Stammzellen und Vorläuferzellen
- Entfernen von einigen Zellen durch die Induktion von Apoptose

Die zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der hämatopoetischen Stammzelle. Während der frühen Hämatopoese differenzieren die pluripotenten Stammzellen im Knochenmark zu lymphatischen und myeloiden Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren haben. Durch weitere Differenzierungsschritte werden im Knochenmark aus den myeloiden Vorläuferzellen Granulozyten, Monozyten, Megakaryozyten, Makrophagen, Erythroblasten, Erythrozyten und Blutplättchen gebildet. Die lymphoiden Vorläuferzellen dagegen differenzieren im lymphatischen Gewebe zu B- und T-Zellen, NK-Zellen und DCs. Die B-Zellen differenzieren nach Kontakt mit einem Antigen zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen (humorale Immunantwort); T-Zellen entwickeln sich nach der Aktivierung durch ein Antigen zu T-Effektorzellen (zelluläre Immunantwort).

### **1.3.1 Die dendritischen Zellen (DCs)**

DCs sind eine heterogene Gruppe antigenpräsentierender Zellen, die in verschiedenen Geweben vorkommen. Bei einer viralen Infektion haben sie die Aufgabe, die viralen Nukleinsäuren über Nukleinsäure-erkennende Rezeptoren der angeborenen Immunantwort zu detektieren und virusspezifische Antigene über MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Zusätzlich haben immature DCs die Eigenschaft, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen, diese zu prozessieren und als Peptide auf MHC-Molekülen zu präsentieren. Nach Aufnahme von Antigenen durch DCs maturieren diese und regulieren die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle hoch. In diesem Zustand wandern sie in die sekundären

lymphoiden Organe, insbesondere in die drainierenden Lymphknoten, wo sie mit T-Zellen in den T-Zellzonen interagieren und diese aktivieren.

Zur Aktivierung von T-Zellen und zur Induktion einer effektiven T-Zellantwort sind zwei Signale nötig: 1) die Präsentation des entsprechenden Antigens im MHC-Kontext und 2) die kostimulatorischen Signale. Das Fehlen kostimulatorischer Signale führt zur Anergie der T-Zelle gegenüber dem präsentierten Antigen.

Es konnte gezeigt werden, dass neben den von Pathogenen stammenden Antigenen apoptotisches Material von DCs phagozytiert und in die T-Zellzonen der Lymphknoten transportiert wird [105]. Die Aufnahme von apoptotischem Material führt nicht zur Maturation der DC, wodurch eine Kostimulation der T-Zellen ausbleibt und periphere Selbsttoleranz induziert wird [106]. Die Interaktion von DCs und T-Zellen führt somit abhängig vom Aktivierungszustand der DC entweder zu Toleranz oder zur Aktivierung von T-Zellen.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, durch welche Mechanismen Toleranz und Aktivierung der T-Zellen durch die DCs induziert werden. Schon lange wurde vermutet, dass die Erkennung von PAMPs über PRRs die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf APCs regulieren kann [107]. Die verschiedenen Subklassen der DCs exprimieren ein breites Muster an TLRs [108, 109], was eine wichtige Rolle dieser Rezeptoren für die Antigenpräsentation und die Aktivierung der Lymphozyten vermuten lässt.

Es gibt verschiedene Subtypen der DCs. Hauptsächlich wird zwischen den myeloiden DCs (mDCs) und den plasmazytoiden DCs (PDC) unterschieden. Während die PDC eine Zelle ist, die auf Produktion von Typ I IFN spezialisiert ist, sind die mDCs als professionelle antigenpräsentierende Zellen bekannt. Die mDCs entwickeln sich durch Ausdifferenzierung der Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und IL-4 zu immaturren mDCs [110], die nach Stimulation mit CD40-Ligand oder Endotoxin maturieren [111]. Durch die Identifizierung der Oberflächenantigene BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 wurden spezifische Marker zur Charakterisierung der verschiedenen Subtypen der DCs und deren Maturationsstatus gefunden [112, 113]. Während BDCA-2 und BDCA-4 auf PDC exprimiert werden, tragen  $CD11c^+CD123^-$  DCs den Oberflächenmarker BDCA-3. Eine zusätzliche Subpopulation der DCs ( $CD1^+CD11c^{bright}CD123^{dim}$ ) exprimiert keinen dieser drei Oberflächenmarker [112].

### 1.3.2 Die plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)

Lange Zeit wurde vermutet, dass es einen bestimmten Zelltyp geben müsste, der für die Typ I IFN-Produktion nach einer viralen Infektion verantwortlich sei [114-117].

1993 wurde ein Zelltyp identifiziert, der große Mengen Typ I IFN produzierte. Dieser Zelltyp kommt sehr selten im Blut vor und wurde als IFN-produzierende Zelle (IPC) bezeichnet [114].

Andere Untersuchungen zeigten, dass ein aus Tonsillen isolierter Zelltyp (plasmazytoide T-Zelle) [118], später bezeichnet als PDC [119], identisch mit der IPC war [120, 121]. Somit wurde nach langen, kontroversen Untersuchungen die PDC identifiziert, die verantwortlich für die Produktion von Typ I IFN nach einer viralen Infektion zu sein schien. Die Charakterisierung der humanen PDC fiel lange Zeit schwer, bis 2000 der PDC-spezifische Oberflächenmarker BDCA (blood dendritic cell antigen)-2 identifiziert wurde [112, 113]. Zusätzlich wurde der Oberflächenmarker BDCA-4 identifiziert, der sowohl auf humanen PDC als auch auf DCs exprimiert wird, die aus Monozyten oder CD34<sup>+</sup>-Stammzellen generiert wurden. Neben den humanen PDC wurden in späteren Studien auch in der Maus PDC identifiziert, die große Mengen Typ I IFN nach Viruserkennung produzierten [122, 123].

Ausschlaggebend für die Generierung von PDC aus Vorläuferzellen ist das Zytokin Flt3-Ligand (Flt3-L) [124-127]. Frühe CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>-Vorläuferzellen können in Anwesenheit von Flt3-L in Typ I IFN-produzierende PDC differenzieren [124]. Dagegen differenzieren CD14<sup>+</sup>-Monozyten und CD34<sup>+</sup>-Stammzellen in Anwesenheit von GM-CSF zu myeloiden DCs (mDCs) [127].

In den vergangenen Jahren wurden zwei wichtige Charakteristika für PDC beschrieben: 1) PDC sind professionelle Typ I IFN-produzierende Zellen und 2) sie können weiter in typische antigenpräsentierende DCs differenzieren und naive T-Zellen stimulieren [119, 128, 129]. Obwohl sie sich in diesem Stadium weiterhin von DCs unterscheiden, besitzen sie nach der Differenzierung wichtige Eigenschaften der DCs. Sie nehmen die dendritische Morphologie an, exprimieren MHC II Moleküle auf ihrer Oberfläche und können T-Zellen stimulieren. Während der Maturation, wird der PDC-spezifische Oberflächenmarker BDCA-2 herunter reguliert [112]. Ausschlaggebend für die Differenzierung sind IL-3 [118] und TLR7/9-Stimulation [26, 130]. Nach der Erkennung fremder Nukleinsäuren produzieren PDC große Mengen Typ I IFN. Verantwortlich für die Erkennung der Nukleinsäuren sind TLR7 [46, 47] und TLR9 [22, 23].

Bisher ist die PDC die einzige bekannte Zelle, die die Fähigkeit hat, als professionelle, Typ I IFN-produzierende Zelle in einen Phänotyp einer professionellen antigenpräsentierenden PDC zu differenzieren. Es wurde gezeigt, dass humane PDC durch eine Influenza Virusinfektion maturieren und effizient antigenspezifisch CD8- und CD4-T-Zellen expandieren können [131]. Mit den Eigenschaften der Typ I IFN-

Produktion und der effektiven Antigenpräsentation dient die PDC als Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort.

### 1.3.3 Die humanen Monozyten

Obwohl die PDC als IFN-produzierende Zelle (IPC) beschrieben wurde, gibt es viele andere Zelltypen, die nach Erkennung viraler Nukleinsäuren Typ I IFN produzieren. Diese Erkennung findet unabhängig von TLR7 und TLR9 über weitere Rezeptoren der angeborenen Immunantwort im Zytosol der Zelle statt. Humane Monozyten sowie murine DCs sind gut untersuchte Zelltypen, die nach zytosolischer Erkennung von viraler RNA über MDA-5 [6, 7] oder RIG-I [5] bzw. nach zytosolischer Erkennung von DNA [8, 87] Typ I IFN produzieren. Obwohl die produzierte Menge Typ I IFN pro Zelle bei Monozyten sehr viel geringer ist als die von PDC, tragen sie aufgrund ihres hohen Anteils im humanen Blut effektiv zur antiviralen Immunantwort bei. Zusätzlich zu den zytosolischen Rezeptoren der angeborenen Immunität exprimieren humane Monozyten den TLR8 [26, 28]. Monozyten repräsentieren eine wichtige Zellgruppe zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort beeinflussen. Ein wichtiges Zytokin, das insbesondere nach der Erkennung viraler ssRNA über TLR8-Stimulation von Monozyten produziert wird, ist IL-12 [132].

Monozyten sind eine Population aus mononukleären Leukozyten, die sich im Knochenmark aus Monoblasten entwickeln und dort rasch expandieren. Sie gelangen vom Knochenmark in das Blut [133], wo sie als nicht-teilende Progenitorzellen der myeloiden Linie verweilen. Von dort wandern sie zufällig in das Gewebe ein und maturieren zu Makrophagen. Eine Inflammation hat ein vermehrtes Eindringen der Monozyten in das entzündete Gewebe und die Differenzierung zu Makrophagen zur Folge [133]. *In vitro* wurde gezeigt, dass Monozyten abhängig von den Kulturbedingungen zu Makrophagen oder antigenpräsentierenden DCs ausdifferenzieren können. In Anwesenheit von M-CSF (Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor) oder GM-CSF differenzierten die Monozyten zu Makrophagen, eine Kombination aus IL-4 und GM-CSF dagegen induzierte die Differenzierung zu DCs [134, 135]. Monozyten sind morphologisch und phänotypisch heterogen. Sie bestehen aus zwei Gruppen, den CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>-Monozyten und den CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozyten [136].



## 1.4 Zytokine

### 1.4.1 Typ I Interferon (IFN)

Interferone (IFN) spielen eine wesentliche Rolle bei der Virusabwehr in Vertebraten. Zunächst wurde IFN als mit der Proliferation von Viren „interferierendes“ Protein in kultivierten Zellen beschrieben [137, 138]. Seitdem gehört das IFN einem großen und für die Virusabwehr essentiellen Forschungsgebiet an.

In den vergangenen Jahren zeigte sich, dass es mehrere Subgruppen des IFNs gibt. Heute wird IFN in die Klassen von Typ I und Typ II IFN unterteilt. Während die Klasse des Typ I IFNs aus mehreren Untergruppen besteht, gehört zu Typ II IFN ausschließlich IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  wird von T-Zellen und NK-Zellen produziert, die durch Zytokine oder Antigene stimuliert und aktiviert wurden. Eine virale Infektion induziert nicht direkt die Produktion von IFN- $\gamma$  [139], jedoch spielt es eine entscheidende Rolle bei der adaptiven Immunantwort.

Die Produktion von Typ I IFN wird nach spezifischer Erkennung von Nukleinsäureliganden viraler Herkunft durch die PRRs induziert. Zu dem Typ I IFN gehören verschiedene, jedoch recht homologe Untergruppen. Die Hauptformen des Typ I IFNs sind IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ . Während IFN- $\alpha$  aus mindestens 13 verschiedenen Isoformen besteht, beschränkt sich das humane IFN- $\beta$  auf eine Isoform [140]. Schon 1985 wurden neun humane chromosomale IFN- $\alpha$ -kodierende Gene identifiziert [141], die alle auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind (human: Chromosom 9, murin: Chromosom 4) [142]. Die Gene haben ähnliche Strukturen und besitzen keine Introns. Sie kodieren verschiedene Polypeptidketten mit einer Länge von 165-166 Aminosäuren.

Die biologische Aktivität des Typ I IFNs wird durch Binden an den gemeinsamen transmembranen Typ I IFN-Rezeptor (IFNAR) und den dadurch aktivierten JAK (Janus Kinase) - STAT (signal transducer and activator of transcription) - Signalweg vermittelt. Der IFNAR besteht aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, die mit den Kinasen JAK1 (Janus Kinase 1) und TYK2 (Tyrosin Kinase 2) verbunden sind. Nachdem Typ I IFN an den Rezeptor gebunden hat, werden die Kinasen aktiviert [143, 144]. STAT1 und STAT2 werden rekrutiert und bilden Heterodimere zusammen mit dem DNA-bindenden p48, einem Mitglied der IRF-Familie. Dieser Komplex bindet und aktiviert ISRE (IFN-stimulated response element) [145]. ISRE ist in der Promotorregion IFN-induzierbarer Gene lokalisiert, und nach der Aktivierung wird die Transkription dieser Gene initiiert. Die Produkte der IFN-regulierten Zielgene sind verantwortlich für die Typ I IFN-vermittelten Effekte auf die Zellen.

### 1.4.2 IFN-vermittelte antivirale Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort

Typ I IFN wird schnell als Antwort auf mikrobielle Stimuli und virale Infektionen sezerniert. Es kann direkte antivirale Effekte ausüben, die die Replikation der Viren verhindern [137]. Als Beispiel zu antiviralen Mechanismen seien genannt die Typ I IFN-induzierten Mx-Proteine, die einen antiviralen Zustand in der Zelle auslösen [146]. Auch die Proteinkinase PKR gehört zu den IFN-induzierten Proteinen. Die durch dsRNA aktivierte PKR katalysiert die Phosphorylierung von eIF2 (eukaryotic initiation factor 2), wodurch effektiv die Proteinsynthese in der Zelle inhibiert und dadurch die Replikation des Virus verhindert wird [147]. Zusätzlich spielt das IFN-induzierte 2'-5'-Oligoadenylatsynthetasesystem eine wichtige Rolle in der Virusabwehr. Es trägt zum Abbau viraler RNA bei, wodurch die Replikation der Viren verhindert wird. Die Oligoadenylatsynthetase synthetisiert 5'-triphosphoryliertes, 2'-5'-Phosphodiester-verbundenes Oligoadenylat (2'-5'-A) aus Adenosintriphosphat (ATP). Bindet das nun entstandene 2'-5'-A an die RNaseL, wird diese aktiviert und degradiert daraufhin RNA [148]. Eine zusätzliche Rolle für das Oligoadenylatsynthetasesystem wurde 2007 beschrieben: Abbauprodukte, die durch RNaseL entstehen, können die Produktion von Typ I IFN in Abhängigkeit von MDA-5-, RIG-I- und IPS-1-induzieren [76].

Neben den Mechanismen, die zur angeborenen Immunität gehören, kann Typ I IFN die adaptive Immunantwort auf indirekte Weise modulieren. Somit ist Typ I IFN ein wichtiger Vermittler von angeborener und adaptiver Immunität. Zusammen mit GM-CSF differenziert Typ I IFN humane Monozyten in antigenpräsentierende DCs [149]. Weitere Studien bestätigten diese Befunde und beobachteten, dass humane Typ I IFN/GM-CSF-generierte DCs IL-15 produzieren und eine Th1-polarisierte T-Zellantwort induzieren [150]. Zusätzlich fördert IFN-induziertes IL-15 *in vivo* die Proliferation von CD8-Gedächtnis-T-Zellen [151]. Typ I IFN verbessert in Makrophagen die durch M-CSF und IL-4 induzierte Phagozytoseaktivität [152], verstärkt die Zytotoxizität von NK-Zellen [153], induziert die Antikörperproduktion von B-Zellen [154] und begünstigt das Überleben von aktivierten T-Zellen [155].

Zusätzlich ist IFN- $\alpha$  an der positiven und negativen Regulation vieler Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF) und Zytokinrezeptoren (u. a. IL-1-Rezeptor, TNF-Rezeptor) beteiligt [156]. Auch ist die autokrine Wirkung von Typ I IFN ein wichtiger Faktor zur Regulation der Immunantwort. Durch virale Infektionen wird abhängig von Typ I IFN die Expression verschiedener TLRs [157] sowie zytosolischer Nukleinsäurerezeptoren verstärkt [66]. Das wiederum führt zu einer verstärkten

Zytokinproduktion nach der Erkennung von PAMPs, wodurch erneut die adaptive Immunantwort beeinträchtigt wird.

### **1.4.3 Proinflammatorische Zytokine als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort**

Neben dem Typ I IFN wird die Produktion vieler anderer Zytokine durch Erkennung viraler Nukleinsäuren induziert. Für die Erkennung von viraler ssRNA gibt es im humanen System zwei TLRs (TLR7 und TLR8) [47], die nach Erkennung die Produktion von Zytokinen induzieren. Während die Erkennung von ssRNA in PDC, die den TLR7 exprimieren [26, 28], zur Produktion von großen Mengen Typ I IFN führt [47, 48], werden nach Erkennung von ssRNA über TLR8 in Monozyten Zytokine wie IL-12p70 und TNF- $\alpha$  induziert [51, 132]. Diese Zytokine beeinflussen und aktivieren die adaptive Immunität und tragen somit zur effektiven Immunantwort bei. Ebenfalls spielt IL-10 als immunregulierendes Zytokin eine Rolle bei einer viralen Infektion.

#### **Interleukin 12**

IL-12 wird hauptsächlich von Zellen der myeloiden Linie produziert, insbesondere von Monozyten und Makrophagen [132]. Es reguliert die adaptive Immunantwort durch die Beeinflussung von T- und B-Zellantworten. Monozyten sezernieren IL-12 nach Stimulation mit TLR8-Liganden [132]. Zusätzlich produzieren B-Zellen und PDC IL-12, doch ist dazu eine T-Zellhilfe notwendig. Interaktion von CD40 mit CD40-L und Kostimulation mit IFN- $\gamma$  oder CpG-ODN aktiviert humane B-Zellen zur Sekretion von IL-12 [158]; PDC produzieren ausschließlich nach Kostimulation mit CD40-L und CpG-ODN IL-12 [26]. IL-12 unterstützt die Entwicklung einer Th1-Antwort und induziert die Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Zellen und NK-Zellen [159, 160], während die Produktion von IL-4 inhibiert wird [160]. B-Zellen werden durch Kostimulation von IL-12 und IL-2 zur Proliferation und Differenzierung aktiviert [161]. Das aktive IL-12p70 ist eine Heterodimer, das aus zwei kovalent gebundenen Untereinheiten besteht: p40 und p35. Die Expression beider Untereinheiten wird unterschiedlich reguliert, wobei p35 die limitierende Untereinheit für die Produktion des bioaktiven IL-12p70 zu sein scheint [162].

#### **Tumornekrosefaktor $\alpha$**

TNF- $\alpha$  gehört zu den Zytokinen der TNF-Familie und wird überwiegend von Th1-Zellen und im geringeren Maße von Th2- und zytotoxischen T-Zellen synthetisiert. Ebenso produzieren humane Monozyten nach Erkennung von ssRNA über TLR8

TNF- $\alpha$  [51]. Auch aktivierte Makrophagen sezernieren TNF- $\alpha$  und induzieren lokale Inflammationen und Fieber. TNF- $\alpha$  favorisiert die Entwicklung der CD4-T-Zellen in Richtung einer Th1-Antwort und lenkt somit die adaptive Immunantwort. Neutrophile Granulozyten werden in Anwesenheit von TNF- $\alpha$  zur Produktion von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid aktiviert und schütten ihre lysosomalen Inhalte aus. Sie dienen somit der Wirtsabwehr und zusätzlich der Induktion lokaler Inflammationen. TNF- $\alpha$  aktiviert Endothelzellen und induziert die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, wodurch die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen während der Entzündungsreaktion kontrolliert wird. Die Interaktion von TNF- $\alpha$  geschieht über die TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2.

### **Interleukin 10**

IL-10 ist als antiinflammatorisches und regulatorisches Zytokin bekannt. Es wird von einer Vielzahl von Immunzellen produziert und inhibiert die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen [163], NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen [164-166]. IL-10-assoziierte immunregulatorische Prozesse wirken entweder direkt auf die Zielzelle oder werden indirekt übermittelt. Als Beispiel sei genannt: die IL-10-vermittelte Inhibition von DCs und somit deren Fähigkeit effektive T-Zellantworten zu induzieren und indirekt deren Proliferation und Polarisierung zu beeinflussen [167]. Durch die IL-10-Produktion bzw. die lokale IL-10-Konzentration wird ein Gleichgewicht zwischen Pathogenbeseitigung und Gewebeschädigung durch Inhibition aktiver Immunzellen eingestellt.

## **1.5 Nukleinsäuren für einen therapeutischen Einsatz**

Durch Stimulation von Zellen mit Nukleinsäureliganden, ohne eine Infektion hervorzurufen, eröffnen sich neue Möglichkeiten, Zellen zur Produktion von Zytokinen zu stimulieren und dadurch die Immunantwort zu modellieren. CpG-ODNs sind synthetische Nukleinsäureliganden, die von B-Zellen und PDC über TLR9 erkannt werden [168]. Sie gehören zu der Gruppe der immunstimulierenden Nukleinsäureliganden, die bisher am besten untersucht und charakterisiert wurden. Schon heute wird das therapeutische Potential von CpG-ODNs in mehreren klinischen Studien evaluiert.

TLR7 und TLR8 sind bekannt als Rezeptoren, die ssRNA erkennen [47]. Das unterschiedliche Expressionsprofil von TLR7 und TLR8 in humanen Immunzellen [26, 28] ermöglicht eine selektive Stimulation verschiedener Zelltypen und die Induktion spezifischer Zytokinmuster. Bisher wurde ein therapeutischer Einsatz von ORNs zur

Stimulation von TLR7 oder TLR8 noch nicht etabliert, doch wird schon heute der synthetische TLR7-Ligand Imiquimod [45, 130] in Form einer Creme zur Behandlung des Basalzellkarzinoms eingesetzt [29]. Das therapeutische Potential von TLR-Liganden könnte durch die Identifikation gut definierter, auf RNA-basierenden Liganden zur selektiven Stimulation von TLR7 und TLR8 deutlich vergrößert werden. Zytosolische Nukleinsäurerezeptoren sind in einem wesentlich breiteren Spektrum von Zellen exprimiert als die TLRs. Neben den Immunzellen exprimieren auch somatische Zellen und Krebszellen diese Rezeptoren. Die Stimulation von somatischen Zellen wie auch von Krebszellen über zytosolische Nukleinsäurerezeptoren führt häufig zu deren Apoptose. Eine Etablierung therapeutisch nutzbarer Liganden zur zytosolischen Erkennung von Nukleinsäuren würde die Möglichkeit, neben den Immunzellen andere Zelltypen zu stimulieren, deutlich vergrößern. Die Zytokinproduktion einerseits und die Induktion von Apoptose in Krebszellen andererseits ist ein vielversprechender Ansatz zur Immuntherapie bei Krebserkrankungen. Bisher werden bekannte Liganden (pI:C, pdAdT, 5'-Triphosphat-RNA) zur Stimulation von zytosolischen Rezeptoren enzymatisch hergestellt. Um das Erkennungsmuster der zytosolischen Rezeptoren eindeutig zu identifizieren und einen zukünftigen therapeutischen Einsatz zu ermöglichen, müssen synthetisch hergestellte, gut definierte Oligonukleotide identifiziert und entwickelt werden, die eine spezifische Stimulation ermöglichen.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die Erkennung von viralen Nukleinsäuren über Rezeptoren der angeborenen Immunität und die dadurch induzierte Produktion von Zytokinen, insbesondere von Typ I IFN, ist für eine effektive Virusabwehr essentiell. Um die Mechanismen der Virusabwehr zu nutzen und mögliche neue therapeutische Ansätze zu erschließen, sollten spezifische Liganden zur Stimulation bestimmter „pattern recognition receptors“ (PRR) identifiziert und der „Transfer“ von schon bekannten immunstimulatorischen RNAs in die Zelle etabliert werden. Synthetische, gut definierte Liganden könnten eine optimale Immunstimulation gewährleisten ohne dabei eine Infektion auszulösen.

- 1) Da immunstimulatorische RNA (isRNA) ohne Komplexierung mit Transfektionsreagenzien TLR7 und TLR8 nicht erreichen kann, sollte für eine mögliche therapeutische Applikation ein geeignetes Präparat zur Formulierung der isRNA ausgewählt werden. Das Medikament Protamin ist ein kationisches Peptid, das aufgrund seiner Ladung anionische Nukleinsäuren komplexieren kann. Da es bereits für die therapeutische Verwendung zugelassen ist, sollte die Formulierung von isRNA mit Protamin zur Stimulation von TLR7 und TLR8 etabliert und charakterisiert werden.
- 2) Die endosomalen Rezeptoren TLR7 und TLR8 erkennen einzelsträngige RNA (ssRNA) viralen Ursprungs. Lange ssRNA liegt jedoch selten vollkommen einzelsträngig vor, sondern bildet Sekundärstrukturen zur Minimierung der freien Energie. Daher sollte untersucht werden, ob doppelsträngige Bereiche in RNA eine endosomale Erkennung zulassen und über welchen Mechanismus diese Strukturen erkannt werden.
- 3) Neben der Erkennung viraler Nukleinsäuren über die endosomalen Rezeptoren werden diese auch im Zytosol von Zellen erkannt. MDA-5 (melanoma differentiation antigen 5) gilt als Sensor von doppelsträngiger RNA (dsRNA). Charakteristika, die eine zytosolische Erkennung von dsRNA über MDA-5 ausmachen, sollten identifiziert werden.
- 4) Während zytosolische Helikasen für die Erkennung viraler RNA im Zytosol zuständig sind, gibt es ebenso eine Erkennung von zytosolischer DNA. Obwohl bisher noch kein zuständiger Rezeptor für die Detektion von DNA im Zytosol identifiziert wurde, sollten synthetische DNA-Agonisten identifiziert werden, die unabhängig von dem endosomalen TLR9 Zellen aktivieren können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Analysewaagen U4100-OD2.2, MC BA 100	Sartorius (Göttingen)
Apotome	Carl-Zeiss (Göttingen)
Autoklav	Belimed (Köln)
Begasungsbrutschrank Heracell 240	Heraeus Instruments (Hanau)
Bioruptor	Diagenode (Lüttich, Belgien)
Eismaschine Icematic	Scotsman (Pogliano, Italien)
ELISA-Reader Apollo LB912	Berthold (Bergisch Gladbach)
Elektronenmikroskop CM10	Philips (Eindhoven, Niederlande)
Fluoreszenzmikroskop IX71	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop Observer D1	Carl-Zeiss (Göttingen)
Gefrierschrank (-80 °C)	Hettich (Tuttligen)
Gefrierschrank (-20 °C)	AEG-Electrolux (Nürnberg)
Gewindeflaschen 250 ml, 500 ml, 1 l	Schott (Mainz)
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Kolbenhubpipetten Research (0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Kühlschrank	AEG-Electrolux (Nürnberg)
Küvette, Quarzglas Suprasil®	Hellma (Müllheim)
LSR II	BD Biosciences (Heidelberg)
MACS Multistand	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Mikroskop	Hund (Wetzlar)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Quadro MACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Reagenzglas-Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Reinstwasseranlage NANOpure Diamond	Barnstead (Leverkusen)
Schüttler KS 260 basic	IKA (Staufen)
Spektralphotometer Nanodrop	Peqlab (Nussbaum)
Sterilbank Clean AirThermo	Fisher Scientific (Schwerte)
Stickstofftank	Taylor Wharton (Mildstedt)
Thermostatschrank AQUALytic	Liebherr (Biberach)
Wasserbad Isotemp	Fischer Scientific (Schwerte)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)

### 2.1.2 Mikroskopie-Zubehör

Kupfernetzchen	Plano (Wetzlar)
Deckgläschen	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Objektgläschen	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Fluorescent Mounting Medium	Dako (Capintertia, USA)
Neubauer-Kammer	Brand (Wertheim)

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Applichem (Darmstadt)
Ammonium Persulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Aqua deltaSelect Spüllösung (H <sub>2</sub> O)	DeltaSelect (Pfullingen)
Biocoll	Biochrom AG (Berlin)
Borsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
BSA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
DEPC-H <sub>2</sub> O	Invitrogen (Karlsruhe)
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories (Pasching)
EDTA-Lösung 0,5 M	PAA Laboratories (Pasching)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Formamid	Carl Roth (Karlsruhe)
GDP, UDP, IDP, ADP, CDP	Sigma-Aldrich (Steinheim)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methylenblau	Carl Roth (Karlsruhe)
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (Steinheim)
NaCl 10%	Braun (Melsungen)
NaCl-Lösung 0,9%	Braun (Melsungen)
Orange G	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenol	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
TAE (50x)	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl pH 7,5 1 M	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypanblau	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween	Carl Roth (Karlsruhe)
Uranylacetat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Urea	Carl Roth (Karlsruhe)



### 2.1.4 Transfektionsreagenzien

Dotap	Carl Roth (Karlsruhe)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Poly-L-Arginin P4663	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Protamin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TransIT LT-I	Mirus (Madison, USA)
Protamin Valeant	Valeant (Berlin)

### 2.1.5 Kit

Ampliscribe T7-Flash Transkription Kit	Epicentre (Madison, USA)
--	--------------------------

### 2.1.6 PCR-Zubehör und Größenstandards

5xTaq-Puffer	Promega (Madison, USA)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq-Polymerase	Promega (Madison, USA)

#### Primer:

#### TLR7-Genotypisierung

Oligo 6044 TLR7wtforwSSM1: TCTCAGCAGCTGCTCCAGTGTCATG

Oligo 6045 TLR7wtrevSSM1: ACAGCACCTCCGTCCCTGTGACTG

Oligo 6043 neo1500: ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG

#### MDA-5-Genotypisierung

Hec16112r: CTTCTGTTCTTCCTGGGAGACC

Hexon15859f: GGGACTATTGACAGTCGAAGAC

HEC14305: CTTGGCTTCCTCCTAAACTCAG

### 2.1.7 Größenstandards

Größenstandards DNA 100 bp	New England Biolabs (Ipswich, England)
Größenstandards ssRNA low range	New England Biolabs (Ipswich, England)

### 2.1.8 Enzyme

Polynukleotidphosphorylase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
----------------------------	---------------------------

### 2.1.9 ELISA

Human ELISA Set (IL-12p70, IL-10, TNF- $\alpha$ )	BD Biosciences (San Diego, USA)
Human IFN-alpha Module Set	Bender MedSystems (Wien, Österreich)
Mouse IFN-alpha ELISA Kit	PBL Biomedical Laboratories (New Jersey, USA)
Costar ELISA-Platte	Biomedical Diagnostic (Marnes Valeé, France)

### 2.1.10 MACS

MACS B220-MicroBeads (mouse)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
MACS CD304 (BDCA-4/Neutropilin)-1 MicroBead Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
MACS-Separationssäule (MS, LS, LD)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi (Bergisch Gladbach)

### 2.1.11 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

APC anti-human CD14	BD Pharmingen (Heidelberg)
PerCP-Cy5.5 labeled anti-human HLA-DR	BD Pharmingen (Heidelberg)
BDCA-2 FITC	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Anti-BDCA-2-PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Anti-HLA-DR PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen (Heidelberg)
Alexa-Fluor 488 Goat anti-mouse IgG	Invitrogen (Karlsruhe)
Hoechst 33342	Hoechst (Frankfurt)

### 2.1.12 Materialien für die Zellkultur

FCS	Gibco (Karlsruhe)
L-Glutamin 100x	Cambrex BioWhittaker (New Jersey, USA)
MEM non-essentiell Amino Acids	Gibco (Karlsruhe)
MEM Sodium Pyruvat 100x	Gibco (Karlsruhe)
Microtainer	BD Pharmingen (Heidelberg)
OPTI-MEM	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin 100x	Cambrex BioWhittaker (New Jersey, USA)
RPMI 1640	Gibco (Karlsruhe)
Humanes AB-Serum	BioWhittaker (Wakersville MD, USA)

Plastikwaren für die Zellkultur wurden von Nunc (Langenselbold), Greiner Bio-One (Solingen), Corning Costar (Bodenheim), Eppendorf (Hamburg) oder Falcon (Heidelberg) bezogen.

### **2.1.13 Medien und Pufferlösungen**

#### **RPMI-Medium (human)**

2 % humanes AB-Serum  
2 mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin/Streptomycin

#### **RPMI-Medium (murin)**

10 % FCS  
2 mM L-Glutamin  
0,1 mM MEM non-essential amino acids  
1 mM MEM Sodium Pyruvat  
100 U/ml Penicillin/Streptomycin

#### **MACS-Puffer**

1x PBS  
2 % FCS  
2mM EDTA  
pH 7,2-7,4

#### **ELISA-Waschpuffer**

1x PBS  
0,05 % Tween 20

#### **Assay-Puffer IFN- $\alpha$ (human):**

1x PBS  
0,5 % FCS  
0,05 % Tween

#### **Assay-Puffer BD-ELISA:**

1x PBS  
10 % FCS

#### **Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer**

40 mM Tris  
20 mM Essigsäure  
1 mM EDTA

#### **Tris-EDTA (TE)-Puffer**

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA pH 8,0

#### **Tail-Puffer**

50 mM Tris-HCl, pH8  
100 mM EDTA  
100 mM NaCl  
1% SDS

### 2.1.14 Zellen

Humane Primärzellen	Buffy Coats von gesunden Spendern, Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (Bonn)
Maus-Primärzellen	isoliert aus Wildtyp-Mäusen, aus TLR7-defizienten Mäusen oder aus MDA-5-defizienten Mäusen
A549-Zellen	Lungenkarzinom-Zelllinie (human)

### 2.1.15 Nukleinsäuren

HPLC-gereinigte ORNs wurden von Biomers (Ulm), Eurogentec (Köln) oder Dharmacon (Chicago, USA) bezogen. ODN-Synthesen wurden von Metabion (Planegg-Martinsried) durchgeführt und Nukleinsäuren nach der Synthese entsalzt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in DEPC-H<sub>2</sub>O, in RNase und DNase-freien Reaktionsgefäßen (Eppendorf) gelöst (1 µg/µl) und bei -80 °C oder bei -20 °C gelagert.

Die RNA-Analoga pG (polyguanylic acid potassium salt), pU (polyuridylic acid potassium salt), pI (polyinosinic acid potassium salt), pA (polyadenylic acid potassium salt) und pC (polycytidylic acid potassium salt) wurden enzymatisch von Sigma-Aldrich (München) hergestellt und in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst (1 µg/µl).

pI:C (polyinosinic-polycytidilic acid) wurde von Invitrogen (Karlsruhe) und pdAdT (polydeoxyadenylic-polydeoxycytidylic acid sodium salt) von Sigma-Aldrich (München) bezogen, in DEPC-H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst und bei -20 °C gelagert. pdAdT von Sigma-Aldrich (München) wurden ebenfalls in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst (1 µg/µl) und in RNase und DNase-freien Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. CpG-ODNs wurden von Metabion synthetisiert und in 0,9 % NaCl gelöst und bei -20° C gelagert. Alle Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden unter RNase und DNase-freien Konditionen durchgeführt.

## 2.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte an Zellkultursterilbanken mit Einmalhandschuhen. Um Kontaminationen und Verunreinigungen mit Endotoxinen vorzubeugen, wurden ausschließlich sterile, Endotoxin-freie Verbrauchsmaterialien verwendet.

### 2.2.1 Kultivierung von Zellen

Primäre Zellen und Zelllinien wurden in CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschränken (5 % CO<sub>2</sub> v/v) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Vitalität der Zellen wurde mit der Trypanblau-Färbung und die Zelldichte mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt. Das Trypanblau färbte die toten Zellen, weil es deren Zellmembran durchdringen kann. Dies ermöglichte die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen und somit die Bestimmung der Vitalität der Zellen.

50 µl der Zellsuspension und 50 µl 0,04 % Trypanblau (1:10 Verdünnung der 0,4 % Stocklösung in PBS) wurden gemischt und ein Aliquot davon in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Bei zu hoher Zelldichte wurde die Zellsuspension stärker mit Trypanblau verdünnt (1:2, 1:5 oder 1:10). Die Zellen zweier Großquadrate wurden in der Zählkammer unter dem Mikroskop bei einer 10-fachen Vergrößerung gezählt.

Der Mittelwert der Zellen in zwei Großquadraten wurde gebildet und in folgende Formel eingesetzt:

$$Z = N * f * 10^4 \text{ [Zellen/ml]}, \text{ mit :}$$

$Z$  = Zellzahl  
 $N$  = vitale Zellen in einem Großquadrat  
 $f$  = Verdünnungsfaktor

### 2.2.3 Isolation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Blut isoliert. Aufgrund der Dichteunterschiede der zellulären Bestandteile des Blutes sammeln sich während des Zentrifugierens über einen Dichtegradienten die verschiedenen Zellen in unterschiedlichen Phasen.

Während die Thrombozyten in der oberen Plasmaphase verbleiben, reichern sich PBMC in der Interphase an. Granulozyten sammeln sich in der unteren Schicht des Lymphozytenseparationsmediums. Die Erythrozyten zusammen mit toten Zellen, bilden während des Zentrifugierens ein Pellet und sammeln sich unten im Zentrifugenröhrchen. Durch Entnehmen der Interphase können die PBMC von den anderen Zellen getrennt werden.

Dazu wurden Blutproben aus Buffy Coats im Verhältnis 1:2 in Zentrifugenröhrchen mit NaCl verdünnt. 13 ml Lymphozytenseparationsmedium wurden in 50 ml

Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 25 ml verdünntem Blut langsam überschichtet. Es wurde 20 min bei 800 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert, wodurch sich das Blut in dem Lymphozytenseparationsgradienten in die verschiedenen Phasen auftrennte. Die zu isolierenden PBMC befanden sich nun in der Interphase, die mit einer Pipette gesammelt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit 0,9 % NaCl bis auf 50 ml aufgefüllt und erneut bei 450 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 5 ml Erylyse aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Erythrozyten, die möglicherweise die PBMC verunreinigten, zu lysieren. Es wurde mit 30 ml 0,9 % NaCl gewaschen und die humanen PBMC in 50 ml 0,9 % NaCl aufgenommen und gezählt. Für Stimulationsversuche wurde die Zellzahl auf  $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und jeweils 100  $\mu$ l pro Vertiefung in eine 96-Lochplatte gegeben.

#### **2.2.4 Isolation von plasmazytoiden dendritischen Zellen**

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) sind zu einem Anteil von etwa 0,5 % in humanen PBMC enthalten. Mittels magnetischer Zellauftrennung (MACS = magnetic cell sorting) wurden die PDC mit dem CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit human aus den zuvor aufgereinigten PBMC isoliert. BDCA-4 (blood dendritic cell antigen 4) ist spezifisch auf humanen PDC exprimiert und eignet sich daher zur Aufreinigung dieser Zellen aus PBMC.

Humane PBMC wurden in einem kleinen Volumen MACS-Puffer aufgenommen und entsprechend dem Protokoll des Herstellers 15 min mit FcR-Blockingreagenz und den CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBeads bei 4 °C inkubiert. Das FcR-Blockingreagenz dient dazu, die unspezifischen Bindungen des CD304-Antikörpers an die FC-Rezeptoren zu verhindern. Danach wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen über einen 40  $\mu$ m Nylonfilter auf eine LS-Säule gegeben, die in einen Magneten eingespannt war. Alle Zellen, an die CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBeads gebunden hatten, wurden nun im Magnetfeld zurückgehalten. Die ungebundenen Zellen passierten die Säule und durch mehrmaliges Waschen wurden alle CD304-negativen Zellen aus der Säule herausgespült. Die Selektionssäule wurde aus dem Magneten herausgenommen und die positiv selektionierten PDC wurden mit MACS-Puffer aus der Säule herausgedrückt. Die Zellen wurden nun einmal gewaschen und in Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Viabilität wurde mit der Trypanblau-Färbung festgestellt. Die Reinheit der Zellen betrug in der Regel etwa 95 %.

### 2.2.5 Isolation von Monozyten

Monozyten wurden mit einem indirekten magnetischen Markierungssystem (Monocyte Isolation Kit II) aus humanen PBMC aufgereinigt. Bei diesem Verfahren werden bis auf Monozyten alle anderen Zelltypen der humanen PBMC, also T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, DCs und basophile Granulozyten mit Biotin-konjugierten Antikörpern (AK) (Monoklonale AK gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glykophorin A) markiert. Anti-Biotin MicroBeads binden an die Antikörper, sodass alle markierten Zellen in einer Säule zurückgehalten werden, die in einem Magneten eingespannt ist. Die Monozyten dagegen passierten die Säule und wurden in einem Zentrifugationsröhrchen aufgefangen.

Humane PBMC wurden in einem kleinen Volumen MACS-Puffer aufgenommen und Monozyten-Biotin-AK-Cocktail wurde zugegeben. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurden die Zellen 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden Anti-Biotin MikroBeads zugegeben und es wurde erneut 15 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift und danach wurden die Zellen in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen und über einen 40 µm Nylonfilter auf eine LD-Säule gegeben. Diese war in einen Magneten eingespannt, sodass die markierten Zellen zurückgehalten wurden. Nach dreimaligem Waschen der LD-Säule mit MACS-Puffer wurde der Durchfluss mit den darin enthaltenen Monozyten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,9 % NaCl gewaschen und gezählt.

### 2.2.6 Isolation von Knochenmarkszellen aus Mäusen – Differenzierung zu PDC oder mDC

Aus den Hinterlaufknochen von Mäusen wurden die Knochenmarkszellen isoliert, um diese anschließend zu dendritischen Zellen (DC) oder plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) zu differenzieren.

Die Gelenke der Knochen wurden überdehnt, auseinander gebrochen und am oberen und unteren Ende jeweils ein kleines Stück entfernt, so dass der Knochenmarkskanal frei lag. Mit einer Medium-gefüllten Spritze wurden die Knochenmarkszellen aus dem Knochen herausgespült und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml Erylysepuffer aufgenommen und 5 min inkubiert. Der Erylysepuffer lysiert die Erythrozyten aufgrund der Konzentration, beschädigt Zellen aber nicht. Es wurde einmal mit 30 ml 0,9 % NaCl gewaschen und die Zellen gezählt.

Für die Differenzierung zu PDC wurden jeweils Knochenmarkszellen einer Maus in vier Vertiefungen einer 6-Lochplatte ausgesät und in 3 ml Vollmedium mit 2 %

FLT3-L sieben Tage kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gesammelt und durch eine MACS-Separation die B220<sup>+</sup>-Zellen, in diesem Fall PDC, isoliert. Zur Transfektion wurden  $4 \times 10^4$  PDC pro Vertiefung in eine 96-Lochplatte gegeben.

Im Falle einer Differenzierung der Knochenmarkszellen zu DC, wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in eine 6-Lochplatte gegeben und in 3 ml Vollmedium mit 2 % GMCSF kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen gezählt und für die Transfektion  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in einer 96-Lochplatte ausgesät.

### **2.2.7 Genotypisierung von Mäusen**

Die Genotypisierung von Mäusen kann durch den Nachweis spezifischer Gene in der chromosomalen DNA durchgeführt werden. Genomische DNA wurde dazu aus den Schwanzbiopsien der Mäuse isoliert. Dazu wurden die Schwanzspitzen entnommen und in 73  $\mu$ l Tail-Puffer und 20  $\mu$ l Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C inkubiert. Das Gewebe löste sich über Nacht auf, anschließend wurde die Suspension 5 min geschüttelt und der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden 300  $\mu$ l NaCl (3 M) zugegeben und erneut 5 min geschüttelt. Durch Zentrifugieren bei 13000 U/min und 10 °C wurde ein Pellet gesammelt, die genomische DNA war nun im Überstand enthalten. Der Überstand (750  $\mu$ l) wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zum Ausfällen der DNA 500  $\mu$ l Isopropanol zugegeben. Durch Zentrifugieren (10 min, 13000 U/min bei 4 °C) sammelte sich die DNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Vorsichtig wurde der Überstand entnommen und zweimal mit 500  $\mu$ l 80 % Ethanol gewaschen. Die isolierte DNA wurde 2 h lang bei 37 °C zum Trocknen inkubiert und anschließend in 400  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen. Um die gesamte DNA zu lösen, wurde der Ansatz 2-3 h bei 37 °C und anschließend 1 h lang bei 55 °C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurde eine qualitative PCR (polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion) durchgeführt.

### **2.2.8 Qualitative PCR (Polymerasekettenreaktion)**

Bei der Polymerasekettenreaktion handelt es sich um ein Verfahren, bei dem spezifisch lineare DNA (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) amplifiziert werden kann. Komplementär zu Teilbereichen der DNA-Matrize, auch Templat genannt, werden zwei synthetische ODNs (Primer; komplementär zum Startpunkt) hergestellt, die den Startpunkt für die Synthese der DNA durch die DNA-Polymerase darstellen. In Anwesenheit von Templat, den Primern, der hitzestabilen DNA-Polymerase, den



ODNs und dem entsprechenden Puffer wird die zwischen den Primern liegende Sequenz des Templates in der PCR vervielfältigt. Die PCR läuft in drei Stufen ab:

1. Denaturierung: durch Erhitzen des Reaktionsansatzes schmilzt das doppelsträngige Templat zu Einzelsträngen auf
2. Annealing: spezifisches Hybridisieren der Primer an das Templat und
3. Elongation: die von den Primern ausgehende Strangsynthese beginnt.

Dieser Zyklus wird mehrmals wiederholt und das synthetisierte DNA-Fragment dient für die folgenden Amplifikationen als Matrize. Die Amplifikation der zwischen den beiden Primern liegenden Sequenzen erfolgt daher exponentiell. Der Reaktionsansatz aus Templat, Primern, Polymerase, Nukleotiden und Puffer wurde auf Eis zusammen gegeben und im PCR-Block mit folgendem Programm gestartet:

#### Programm:

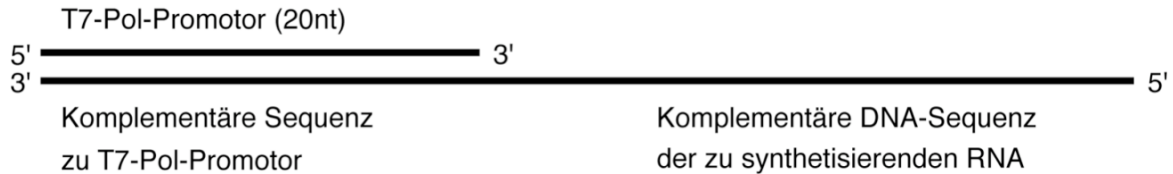
94°C	4 min	
94°C	30 s	} Zyklus 30x
60°C	60 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	
4°C		

## 2.3 Nukleinsäuren

### 2.3.1 *In vitro*-Transkription

Bei der *in vitro*-Transkription wird mit der T7-RNA-Polymerase RNA mit einem 5'-Triphosphat (3-P-RNA) hergestellt. Die T7-Polymerase synthetisiert die RNA beginnend vom 5'-Ende in 3'-Richtung. Dazu benötigt sie ein DNA-Templat, das die komplementäre Sequenz der zu synthetisierenden RNA und einen doppelsträngigen T7-Polymerase-Promotor besitzt (Abbildung 2.1).

Daher wurde zunächst ein Templat aus zwei ODNs hergestellt. Das initiale Nukleotid der RNA sollte ein Guanosin sein, weil dadurch die Ausbeute erhöht wird.



**Abbildung 2.1: Templat für die T7-Polymerase Reaktion zur Herstellung von 3-P-RNA.**

Durch Hybridisieren zweier ODNs wird das DNA-Templat hergestellt. Ein ODN besitzt die Sequenz des T7-Pol-Promotors (T7-Polymerasepromotor), das andere ODN hat am 3'-Ende die zum T7-Promotor komplementäre Sequenz und am 5'-Ende die komplementäre Sequenz der zu synthetisierenden RNA.

Jeweils 2  $\mu\text{l}$  der 100  $\mu\text{M}$  DNA-Primer-Lösung wurden mit 6  $\mu\text{l}$  DNA-Hybridisierungspuffer zusammengegeben, auf 72 °C erhitzt und 10 min inkubiert. Während der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur langsam abkühlte hybridisierte die DNA zu einem Doppelstrang.

Die RNA-Synthese wurde mit dem Epicentre AmpliScribe T7 Transcription Kit entsprechend dem dazugehörigen Protokoll angesetzt. Dazu wurden Templat, Nukleotide, T7-Polymerase, Puffer und DTT (Dithiothreitol) zusammengegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit, in der die RNA synthetisiert wurde, wurde 1  $\mu\text{l}$  RNase-freie DNase zugegeben, um das enthaltene DNA-Templat zu verdauen.

Zur Entfernung von Verunreinigungen wie z.B. Salzen oder Nukleotiden wurde die RNA über eine Mini Quick Spin Column gegeben. Zunächst wurde die Säule 2 min bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert, um die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Der Durchfluss wurde verworfen und die RNA in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  auf die Säule pipettiert. Es wurde erneut bei 1000 g und 4 °C 4 min lang zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugierschritt blieben kleine Moleküle wie Salze und Nukleotide in der Säule und nur die reine RNA war im Durchfluss enthalten. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden im Photometer bestimmt.

### 2.3.2 Herstellung von langer RNA mit Polynukleotidphosphorylase

Durch eine Polynukleotidphosphorylase-Reaktion kann aus Ribonukleotid-Diphosphaten unter Abspaltung von Phosphat lange ssRNA synthetisiert werden. Dazu wurde zunächst eine Stock-Lösung (187,5  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ , 312,5  $\mu\text{l}$  Tris-HCL, 500  $\mu\text{l}$  125 mM Ribonukleotid-Diphosphate, 312,5  $\mu\text{l}$  62,5 mM  $\text{MgCl}_2$  und EDTA) hergestellt. Um unterschiedliche RNA-Sequenzen in der generierten langen RNA zu

erhalten variierte das Verhältnis der Ribonukleotid-Diphosphate (GDP, IDP, ADP, CTP, UDP), so dass eine Zufallssequenz der RNA entsprechend zu den in der Reaktion enthaltenen Nukleotid-Verhältnissen entstand. 250  $\mu\text{l}$  der Stock-Lösung wurden zu 100  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O und 50  $\mu\text{l}$  0,2 % BSA gegeben. Für die Reaktion wurden 20  $\mu\text{l}$  Enzym-Lösung zu 80  $\mu\text{l}$  der zuvor verdünnten Stock-Lösung gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die nun synthetisierte RNA wurde über die Mini Quick Spin Column aufgereinigt (siehe *in vitro*-Transkription). Anschließend wurde die Länge der RNA auf einem Gel analysiert.

### **2.3.3 Doppelsträngige Oligoribonukleotide (ORNs)**

Doppelsträngige ORNs wurden durch Zusammengabe der einzelsträngigen ORNs generiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die ORNs in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in gleichen Mengen (w/w) zusammengegeben und entweder gleich für die Stimulation der Zellen verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### **2.3.4 Konkatemisierung bipalindromischer Oligodesoxynukleotide (bpcODNs)**

ODNs wurden in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in DEPC-H<sub>2</sub>O auf 50 °C erhitzt, durchmischt und kurz zentrifugiert, damit kein Material verloren ging. Unmittelbar vor der Transfektion wurden ODNs in 1x PBS in einer Endkonzentration von 8  $\text{ng}/\mu\text{l}$  aufgenommen und kurzzeitig auf 95 °C erhitzt. Durch das Erhitzen und das darauf folgenden langsame Abkühlen sollte eine optimale Zusammenlagerung der ODNs gewährleistet sein und die ODNs aufgrund ihrer Sequenz hybridisieren. Sofort im Anschluss wurden die ODNs für die Transfektion eingesetzt.

### **2.3.5 Produktion von EMCV (Encephalomyocarditis Virus)**

EMCV ist ein Plusstrang-Virus und gehört zu der Familie der Picornaviren. Es sollten murine EMCV-Virusüberstände für anschließende Experimente produziert werden. Für die Replikation der Viren wurde die Zelllinie A549 verwendet.

In T-125-Flaschen wurden A549-Zellen ausgesät und kultiviert, bis sie zu etwa 80 % konfluent waren. Das Vollmedium (RPMI mit 10 % FCS, Glutamin und Pennicilin/Streptomycin) wurde kurz vor der Infektion durch 20 ml RPMI-Medium mit 2 % FCS ersetzt und die A549-Zellen mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,01 infiziert. Nach einer Inkubationszeit von etwa 48 h hatten sich alle Zellen von der Zellkulturflasche gelöst. Die Überstände wurden aus den Zellkulturflaschen

entnommen, in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2000 U/min wähen 7 min zentrifugiert. So setzten sich die Zellfragmente als Pellet ab und die Viren waren im Überstand enthalten. Die Überstände konnten nun bei -80 °C gelagert werden.

### **2.3.6 Isolation viraler RNA**

Aus Viren sollte die RNA aufgereinigt werden. Zum Ausfällen der sich im Überstand befindlichen Viren wurde 0,04 % CaCl<sub>2</sub> und 33 % Methanol zu 20 ml Virusüberstand gegeben und 10 min bei 4°C inkubiert.

Um die Viruspartikel zu sammeln, wurde bei 3000 U/min und 4 °C 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet, in dem die ausgefällten Viren nun enthalten waren, wurde in 1 ml Trizol Reagent aufgenommen und durch Pipettieren gelöst und bei -80 °C eingefroren.

Um die RNA zu isolieren, wurde das Trizol mit den enthaltenen Viren aufgetaut und 200 µl Chloroform zugegeben. Die Suspension wurde 15 s lang geschüttelt und für 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das folgende Zentrifugieren bei 12000 g und 4 °C während 15 min bildeten sich zwei Phasen. In der wässrigen oberen Phase war die RNA enthalten und wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das 500 µl Isopropanol enthielt. Es wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei 12000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 1,4 ml 75 % Ethanol gewaschen und bei 7500 g und 4 °C während 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration der enthaltenen RNA bestimmt.

### **2.3.7 Sonifizieren von RNA im Ultraschallbad**

Um lange dsRNA (pl:C) mechanisch in kürzere Fragmente zu zerteilen, wurde die dsRNA in einem Endvolumen von 100 µl und einer Konzentration von 0,2 µg/ml in DEPC-H<sub>2</sub>O in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß sonifiziert. Dazu wurde die dsRNA unterschiedlich lang in einem Ultraschallbad bei 200 W (Intervall 30 s) inkubiert. Anschließend wurde die behandelte dsRNA auf einem Gel aufgetrennt, um die Länge der Fragmente zu analysieren.

### **2.3.8 Chloroform-Phenol-Fällung**

RNA wurde mit Hilfe einer Chloroform-Phenol-Fällung aufgereinigt. Dabei wurden die Proteinverunreinigungen und überschüssigen Salze aus der RNA entfernt.

Die in Puffer gelöste und mit Enzymen verunreinigte RNA wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (v/v, 1:1) zusammengegeben und durch Schwenken gemischt. Die Lösung wurde 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min bei 12000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch trennte sich die Phenol/Chloroform-haltige Phase von der wässrigen Phase. In der Interphase reicherten sich die Proteine an. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Erneut wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes durch Schwenken vermischt und nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Die Phasen trennten sich wieder und die wässrige Phase wurde entnommen und mit dem doppelten Volumen 98 % Ethanol versetzt.

Zum Ausfällen der RNA wurde die Lösung mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Die ausgefällte RNA sammelte sich auf dem Boden des Reaktionsgefäßes, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Das RNA-Pellet wurde in dem gewünschten Volumen DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

### **2.3.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der Ausbeute und der Reinheit der synthetisierten RNA wurde 1 µl der gewonnenen DNA mit 99 µl DEPC H<sub>2</sub>O verdünnt. Eine photometrische Absorptionsmessung gegen 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei einer Wellenlänge von 260 nm gab eine Aussage über die Konzentration der RNA, da Nukleinsäuren die Eigenschaft haben, Licht der Wellenlänge 260 nm zu absorbieren. Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Um eine Verunreinigung der DNA durch Proteine auszuschließen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  gab die Reinheit der Nukleinsäuren an. Bei einer hohen Reinheit war ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 zu erwarten. Ein geringeres Verhältnis ist auf einen zu hohen Proteingehalt zurückzuführen.

Die Konzentration der RNA berechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = A_{260} \frac{f}{d * \epsilon} \quad [\mu\text{g} / \mu\text{l}], \text{ mit :}$$

c = Konzentration der RNA-Lösung

$A_{260}$  = Absorption bei 260nm

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient von RNA

(0,02 ml/ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}$ )

d = Schichtdicke (1 cm)

f = Verdünnungsfaktor (20)

$$\text{Reinheit} = \frac{\text{Absorption (260 nm)}}{\text{Absorption (280 nm)}}$$

### 2.3.10 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren analysiert und deren Länge identifiziert. Es wurden entweder Agarosegele mit anschließender Ethidiumbromidfärbung durchgeführt oder Polyacrylamidgele mit anschließender Methyleneblau-Färbung.

#### 2.3.10.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Längenbestimmung von ORNs und ODNs wurden Nukleinsäuren über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Soweit nicht anders angegeben, wurden denaturierende 5 % Polyacrylamidgele hergestellt.

Dazu wurde 2,5 ml Rotiphorese zusammen mit 7,2 g Urea und 1,5 ml 10-fach TBE-Puffer auf 37 °C erhitzt, bis das Gemisch homogen war. Anschließend wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O bis 15 ml aufgefüllt. Kurz bevor die Polyacrylamidlösung in die Gelkammer gegeben wurde, wurde zum Start der Polymerisation 75  $\mu\text{l}$  Ammonium Persulfat und 7,5  $\mu\text{l}$  TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) zugegeben. In der Gelkammer polymerisierte das Polyacrylamid aus. Anschließend wurde pro Tasche 1  $\mu\text{g}$  Nukleinsäure in Ladepuffer aufgetragen. Zur Auftrennung der Nukleinsäuren wurde das Gel 50 min unter eine Spannung von 200 V gesetzt. Durch eine Methyleneblau-Färbung wurde die aufgetrennte Nukleinsäure sichtbar gemacht.

#### 2.3.10.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analysierung der PCR-Produkte wurden diese auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde ein 1,5 % Agarosegele in einfache TAE-Puffer hergestellt. Um anschließend die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde

Ethidiumbromid zugegeben. Die PCR-Produkte und zusätzlich ein Längenmarker wurden in TAE-Ladepuffer auf das Gel aufgetragen und zur Auftrennung der DNA wurde das Gel etwa 45 min lang unter eine Spannung von 100 V gesetzt.

## **2.4 Stimulation von Zellen mit Nukleinsäuren**

### **2.4.1 Stimulation mit Nukleinsäuren komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin**

Wird RNA mit dem polykationischen Polypeptid Poly-l-Arginin komplexiert, bilden sich Komplexe, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. So gelangt die RNA in das Endosom der Zellen und kann dort über verschiedene TLRs erkannt werden.

Für die Stimulation wurde 15  $\mu\text{l}$  PBS in einer 96-Loch-Platte vorgelegt und 0,18  $\mu\text{l}$  einer 2 mg/ml Poly-l-Arginin Lösung in PBS zugegeben. 200 ng RNA wurden hinzugegeben, wodurch sich kleine Komplexe aus dem kationischen Peptid und RNA bildeten. Diese wurden entweder sofort oder nach 20 min auf die Zellen gegeben, die in 185  $\mu\text{l}$  Medium pro Vertiefung in einer weiteren 96-Lochplatte in Vollmedium vorgelegt worden waren. So ergab sich für die stimulierten Zellen und deren Kultivierung ein Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung. Die Zellen wurden 18 bis 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die 96-Lochplatte bei 1200 U/min 5 min zentrifugiert und 170  $\mu\text{l}$  der Überstände zur weiteren Analyse abgenommen.

### **2.4.2 Transfektion von Oligonukleotiden mit Dotap**

Eine weitere Methode zum Transfer von Oligonukleotiden in das Endosom der Zelle, ist die Transfektion mit Hilfe von Dotap. Dotap ist ein Reagenz zur Liposomenvermittelten Transfektion eukaryotischer Zellen. Es eignet sich dazu, negativ geladene Moleküle sowie DNA und RNA in Zellen zu transferieren. Negativ geladene Moleküle bilden zusammen mit dem kationischen, liposomalen Transfektionsreagenz Dotap spontan stabile Komplexe, die von den Zellen aufgenommen werden und vorwiegend in das Endosom gelangen.

3  $\mu\text{l}$  Dotap wurden in 40  $\mu\text{l}$  PBS gegeben und etwa 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde in eine 96-Lochplatte 600 ng RNA in 20  $\mu\text{l}$  PBS vorgelegt und anschließend 40  $\mu\text{l}$  des zuvor verdünnten Dotaps zugegeben. Der Stimulationsansatz wurde 20 min inkubiert und es bildeten sich aus dem kationischen Dotap und den anionischen Oligonukleotiden Komplexe aus. 40  $\mu\text{l}$  der RNA-Dotap-

Suspension wurden auf die Zellen gegeben, die in einer 96-Lochplatte in 160  $\mu\text{l}$  Medium aufgenommen waren. Nach 18 bis 24 h Inkubation der stimulierten Zellen im Brutschrank wurden die Überstände entnommen und weiter analysiert.

### **2.4.3 Transfektion von Oligonukleotiden mit TransIT-LT1 Transfektion Reagent**

Das Transfektionsreagenz TransIT-LT1 von Mirus eignet sich dazu, Oligonukleotide verschiedener Länge in das Zytoplasma von Zellen zu transfizieren.

Zu 100  $\mu\text{l}$  Optimem-Medium wurden 2  $\mu\text{l}$  Mirus gegeben und etwa 3 min inkubiert. In 50  $\mu\text{l}$  Optimem-Medium wurden 600 ng des zu transfizierenden Oligonukleotids pipettiert und 100  $\mu\text{l}$  des in Optimem-Medium verdünnten Transfektionsreagenzes auf die vorgelegte Oligonukleotid-Lösung gegeben. Der Transfektionsansatz wurde 20 min inkubiert und anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes auf 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension überführt. Die Zellen wurden anschließend 18 bis 24 h im Brutschrank inkubiert und die Überstände zu weiteren Analyseschritten entnommen.

## **2.5 Zytokinmessung**

### **2.5.1 ELISA zur Bestimmung humaner Zytokine**

Mit dem Enzym-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) werden die freigesetzten Zytokine im Zellkulturüberstand unter Verwendung von Antikörpern, die diese Zytokine spezifisch binden, gemessen. Bei diesem Verfahren wird folgendes Prinzip zugrunde gelegt: Über Erstantikörper, mit denen die 96-Loch-ELISA-Platte beschichtet ist, werden bestimmte Zytokine gebunden. Ein Zweitantikörper, an dessen Fc-Teil ein Farbstoffsubstrat umsetzendes Enzym (Peroxidase) gekoppelt ist, bindet an ein zweites Epitop des an den Erstantikörper gebundenen Zytokins. Nach Zugabe eines Substrats, das von diesem Enzym umgesetzt wird, schlägt die zuvor farblose Lösung in eine blaue Lösung um. Diese Farbreaktion kann mit 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgebrochen werden, wodurch die Farbe des Substrats von blau nach gelb umschlägt. Die Farbintensität kann im ELISA-Reader gemessen werden und erlaubt einen Rückschluss auf die Konzentration des im Zellkulturüberstand enthaltenen Zytokins.

Zur Messung der Zytokine IL-12p70, TNF- $\alpha$  oder IL-10, wurde die ELISA-Platte mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  Erstantikörper-Lösung pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Antikörperlösung wurde durch Ausklopfen von der Platte entfernt



und anschließend einmal mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween 20) pro Vertiefung gewaschen. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurde pro Vertiefung 50  $\mu$ l Assay-Puffer (10 % FCS in PBS) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die Proben wurden in der gewünschten Verdünnung in die beschichteten Vertiefungen der 96-Lochplatte gegeben. Eine Verdünnungsreihe eines Standard-Zytokins wurde angefertigt und ebenfalls auf die Platte aufgetragen, um anschließend die Menge der im Überstand enthaltenen Zytokine zu berechnen. Die Proben sowie das Standardzytokin wurden mit Assay-Puffer verdünnt. Nach 2 h Inkubation wurden die Überstände aus der ELISA-Platte entfernt und zum Entfernen zurückgebliebener Verunreinigungen fünfmal gewaschen. Anschließend wurde eine Zweitantikörper/HRP-Konjugatlösung (horse radish peroxidase) zugegeben. Der Zweitantikörper band an das zuvor gebundene Zytokin und das HRP-Konjugat an den Zweitantikörper. Es wurde eine Stunde im Dunkeln inkubiert, die Flüssigkeit aus der Platte entfernt und siebenmal gewaschen. Anschließend konnte der ELISA entwickelt werden. Dafür wurden 50  $\mu$ l Substratlösung zugegeben und die ELISA-Platte im Dunkeln und bei Raumtemperatur etwa 15 min inkubiert. Das Substrat wurde durch das HRP-Konjugat umgesetzt und es entstand eine Blaufärbung. Als eine ausreichende Blaufärbung erreicht worden war, wurde die Farbreaktion mit 2 N  $H_2SO_4$  abgebrochen.

Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei 450 und 570 nm gemessen. Die gemessene Absorption diente der Berechnung der Zytokinkonzentrationen in den analysierten Zellkulturüberständen.

Zur Bestimmung von IFN- $\alpha$  wurde ein ELISA verwendet, dessen Protokolle zur Durchführung, etwas abweichend von dem vorher beschriebenen Protokoll war. Nachdem die Platte wie zuvor über Nacht mit dem Erstantikörper beschichtet worden war, wurde zusammen mit den Proben und der Standardreihe die HRP-Konjugatlösung (in 25  $\mu$ l) auf die ELISA-Platte gegeben und 2 h inkubiert. Anschließend wurde wie zuvor gewaschen, das Substrat zugegeben und mit 2 N  $H_2SO_4$  die Farbreaktion abgebrochen, um die Farbintensität zu bestimmen.

### **2.5.2 ELISA zur Bestimmung von murinem IFN- $\alpha$**

IFN- $\alpha$  wurde in den Zellkulturüberständen der stimulierten Maus-PDC und -DC mit einem Mouse IFN- $\alpha$  ELISA Kit bestimmt. Es wurden vorbeschichtete ELISA-Platten verwendet und entsprechend dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

100  $\mu\text{l}$  des Zellkulturüberstands und des IFN- $\alpha$ -Standards wurden in der gewünschten Verdünnung mit Assay-Puffer in die Vertiefungen der ELISA-Platte gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überstände wurden aus der Platte entfernt und die Vertiefungen einmal mit Waschpuffer gewaschen. 100  $\mu\text{l}$  der Zweitantikörperlösung wurde zugegeben und während 24 h Inkubation band der Zweitantikörper an das zuvor gebundene IFN- $\alpha$ . Nachdem der Zweitantikörper aus der Platte entfernt war, wurde dreimal gewaschen. HRP-Konjugatlösung wurde zugegeben und erneut für 1 h inkubiert. Es wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen und pro Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  Substratlösung zugegeben. Nach etwa 10 min wurde die Reaktion mit der Stopplösung unterbrochen und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand der Konzentrationen des Standards konnte die IFN- $\alpha$ -Konzentration in den Zellkulturüberständen berechnet werden.

## **2.6 FACS-Analyse (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)**

Zur eindeutigen Identifikation verschiedener Zellen wurde die Expression von Oberflächenmoleküle (CD; Cluster of Differentiation) durchflusszytometrisch bestimmt. Die FACS-Analyse ermöglicht die Erkennung verschiedener Zellen aufgrund ihrer Größe, ihrer Oberflächenrauhigkeit oder verschiedener extrazellulärer oder intrazellulärer Proteine. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der gleichzeitigen Messung verschiedener physikalischer Eigenschaften von einzelnen Zellen (oder Partikeln) aus einer Gesamtpopulation. Zellen in Suspension werden durch eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 bis 100  $\mu\text{m}$  gepresst. Das dort entstehende laminare Strömungsprofil hat zu Folge, dass sich die Zellen vereinzeln und nacheinander die Kapillare passieren. Der in der Mitte der Kapillare fokussierte Laser trifft auf die Zellen, wodurch der Lichtstrahl abgelenkt wird. Aufgrund des Zellvolumens wird der Lichtstrahl kleinwinklig abgelenkt (FSC; Forward Scatter oder FALS Forward Angle Light Scatter). Die Oberflächenrauhigkeit führt zu einer großwinkligen Ablenkung des Lichtstrahls (SSC; Sideward Scatter oder WALS Wide Angle Light Scatter). Anhand von SSC und FSC lassen sich Zellpopulationen von Zelltrümmern etc. abgrenzen. Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregung) ist bei gewissen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit größeren Wellenlängen zu beobachten. Dieses Verhalten (Absorption von langwelligem Licht, Emission von kurzwelligem Licht) wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Zelle fluoresziert nach Bindung eines Fluorochrom (z.B. FITC, PE, APC, PerCp) -konjugierten Antikörpers an Oberflächenantigene oder durch Einbringen eines Gens in die Zelle, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert. Das

durch die Lichtanregung des Partikels entstehende analoge Signal wird detektiert und durch einen nachgeschalteten Analog-Digitalwandler für die Analyse mit dem Computer und eine geeigneten Software aufbereitet. Verwendet wurden das Durchflusszytometer LSR II (BD Biosciences) mit der Software FACS Diva. Die Auswertung wurde mit der Software Flowjo durchgeführt.

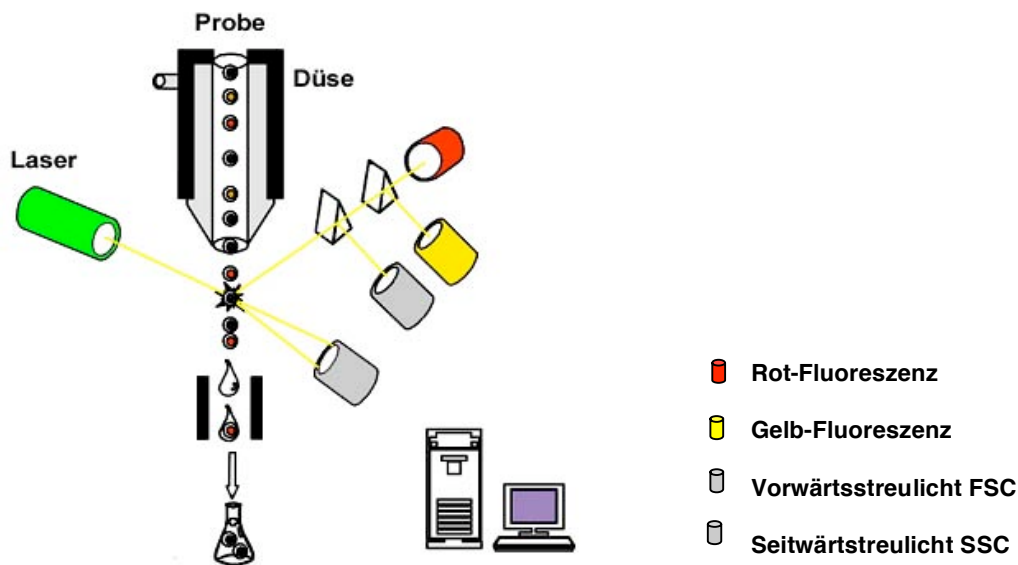


Abbildung 2.2: Prinzip des Durchflusszytometers (Modifizierte Abb. aus Janssen, 2004).

### 2.6.1 Direkte FACS-Färbung

Für die Messung mit dem Durchflusszytometer wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in eine 96-Lochplatte (FACS-Array) gegeben, bei 1500 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit der benötigten Menge des Antikörpers gefärbt. Dieser wurde in etwa  $20 \mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen und auf die Probe gegeben. Während 20 min Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  band der Antikörper an die entsprechenden Oberflächenmoleküle. Um den nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde  $200 \mu\text{l}$  FACS-Puffer zugegeben, anschließend zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die folgende FACS-Analyse wurden die Proben in  $50 \mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen.

## 2.7 Mikroskopie

### 2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Analysen wurde die Aufnahme Fluoreszenzmarkierter Nukleinsäuren von Immunzellen nachgewiesen. Zellen wurden isoliert und anschließend mit Nukleinsäuren, die am 3'-Ende Cy5-markiert waren, stimuliert. 2,5 h nach der Inkubation im Brutschrank wurden Zellen in einer 96-Lochplatte überführt. Adhärierende Zellen wurden mit 2 mM EDTA in PBS von den Oberflächen der Zellkulturschalen gelöst und mit FACS-Puffer gewaschen. Dazu wurde bei 1500 U/min 5 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit entsprechenden Oberflächenantikörpern markiert. Monozyten wurden mit dem Anti-CD14-Antikörper (1:100) und PDC mit dem Anti-CD303-Antikörper (1:50) in 30  $\mu$ l FACS-Puffer 20 min bei 4°C gefärbt. Um den überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden 150  $\mu$ l FACS-Puffer zugegeben, bei 1500 U/ml 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Oberflächen der Monozyten und PDC für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, musste eine für die Fluoreszenzmikroskopie geeignete Fluoreszenzmarkierung, z.B. Alexa488, gewählt werden. Nach Zugabe des Alexa488-markierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (1:300 in FACS-Puffer) band dieser an den Fc-Teil des Maus-Anti-CD14- bzw. Maus-Anti-CD303-Antikörpers. Es wurde 20 min bei 4 °C inkubiert, erneut FACS-Puffer zugegeben (150  $\mu$ l) und zentrifugiert (1500 U/min, 5 min). Der Überstand wurde verworfen. Nun wurden die Zellen mit 2 % PFA in PBS 20 min bei 4 °C fixiert. Um den Zellkern für die spätere mikroskopische Analyse sichtbar zu machen, wurde nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer 50  $\mu$ l Hoechst 33342 in PBS (1:5000) zugegeben und 5 min bei 4 °C inkubiert. Um das überschüssige Hoechst-Reagenz zu entfernen, wurden 150  $\mu$ l PBS zugegeben, bei 1500 U/min zentrifugiert und die Überstände vollständig entfernt. Die Zellen wurden in 6  $\mu$ l Mounting-Medium aufgenommen und auf einen Objektträger gegeben. Mit einem Deckgläschen wurden die Zellen abgedeckt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Anschließend wurden sie mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 63-fachen Vergrößerung analysiert.

### 2.7.2 Elektronenmikroskopie

Die Partikelgröße von Poly-l-Arginin oder Protamin komplexierter RNA wurde mit dem Elektronenmikroskop analysiert. Dazu wurde die Partikelsuspension auf einen Parafilm gegeben und das Carbon-befilmte Kupfernetzchen mit der Oberfläche nach

unten 2 min auf die Partikelsuspension gelegt. Die Partikel adsorbierten an dem beschichteten Kupfernetzchen. Das Kupfernetzchen wurde vorsichtig mit einer Pinzette von der Suspension entfernt und die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier seitlich abgesaugt. Zur Fixierung der Partikel wurde das Kupfernetzchen 2 min auf das Negativkontrastierungsmittel Uranylacetat gelegt. Anschließend wurde das Kupfernetzchen mit der Pinzette abgehoben und das überschüssige Uranylacetat seitlich mit einem Filterpapier abgesaugt. Die beschichteten Kupfernetzchen wurden nun bei Raumtemperatur getrocknet und mit dem Elektronenmikroskop und der digitalen Bilderfassung analySIS analysiert.

## **2.8 Maus *in vivo* Versuche**

RNA wurden mit Dotap komplexiert und jeweils 25  $\mu\text{g}$  RNA einer Maus i.v. injiziert. Nach 3, 5 oder 8 h wurde der Maus Blut entnommen. Zur weiteren Analyse das Serum mit Microtainer-Röhrchen aus dem Blut gewonnen.

## **2.9 Validierung der Experimente**

Die Ergebnisse der hier gezeigten Stimulationsversuche wurden jeweils in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt. Wurden Experimente nur zweimal durchgeführt, ist dies in der zugehörigen Bildunterschrift erwähnt. Stimulationen und Zytokinbestimmungen wurden mit Ausnahme muriner IFN- $\alpha$ -Messungen in Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel mit SEM (standard error of mean; Standardabweichung des Mittelwerts) angegeben.

### 3 Ergebnisse

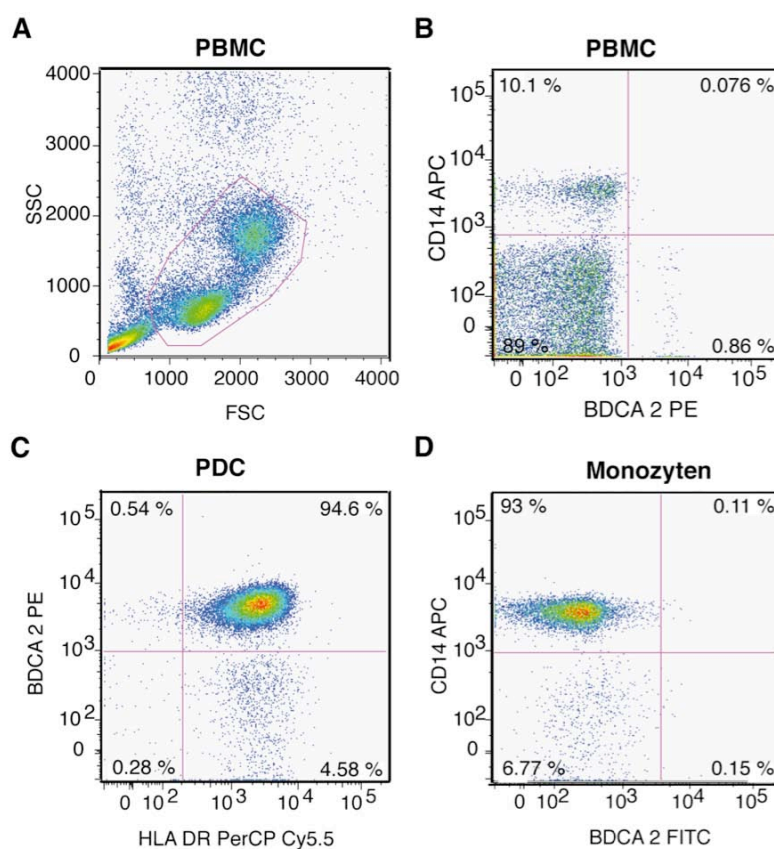
#### 3.1.1 Isolation von PBMC, Monozyten und PDC aus humanem Blut

Humane primäre Immunzellen aus frischem Blut oder Buffy-Coats sollten zur Stimulation und zur Suche neuer Liganden verwendet werden. Dazu wurden zunächst PBMC durch eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und im FACS analysiert (Abbildung 3.1 A). PBMC setzen sich zusammen aus verschiedenen Zelltypen wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, DCs, Monozyten und PDC. Da für folgende Experimente PBMC, Monozyten oder PDC verwendet werden sollten, wurde der Anteil der Monozyten und der PDC bestimmt. Dazu wurden PBMC mit dem Monozyten- und Makrophagen-spezifischen Antikörper Anti-CD14 und dem PDC-spezifischen Antikörper Anti-BDCA-2 gefärbt. Der Anteil der Monozyten in den gesamten PBMC war 10,1 %; der Anteil der PDC betrug 0,86 % (Abbildung 3.1 B).

Da das Expressionsmuster von Rezeptoren, insbesondere von den TLRs, zelltypspezifisch variiert [26, 28], sollten für die Stimulationen jeweils geeignete Zelltypen ausgewählt werden. Durch Auswahl eines geeigneten Zelltyps kann über eine Messung ausgewählter Zytokine auf eine Stimulation eines bestimmten Rezeptors zurückgeschlossen werden. Obwohl zytosolische Rezeptoren sehr breit exprimiert werden, variiert die Menge und die Art der von den Zellen produzierten Zytokine.

Monozyten produzieren nach Stimulation von TLR8 mit ssRNA Zytokine wie IL-12 und TNF- $\alpha$ , nicht aber Typ I IFN [51]. Eine Stimulation von TLR7 in Monozyten kann vollkommen ausgeschlossen werden, da Monozyten diesen TLR nicht exprimieren [26, 28]. Ebenso fehlt ihnen TLR3 und TLR9. Die Produktion von Typ I IFN in Monozyten lässt somit direkt auf die Erkennung von Nukleinsäuren über einen zytosolischen Rezeptor schließen. Daher wurden Monozyten als ein geeigneter humaner Zelltyp zur Suche nach zytosolischen Stimuli ausgewählt. PDC dagegen exprimieren TLR7 und TLR9 [26] und produzieren IFN- $\alpha$  nach deren Stimulation [28]. Der einzige RNA-detektierende TLR, der in PDC exprimiert wird, ist TLR7. PDC wurden daher ausgewählt um TLR7-Liganden zu identifizieren und deren Aktivität zu testen. Die Isolation der Monozyten und PDC wurde aus aufgereinigten humanen PBMC durchgeführt. Zunächst wurden PDC über eine Positivselektion angereichert. Dazu wurden sie über eine Anti-CD303-spezifische MACS-Separation aus der Mischpopulation der PBMC isoliert. Zur Steigerung der Reinheit wurden die angereicherten PDC über eine zweite magnetische Säule gegeben. Zur anschließenden Bestimmung der Reinheit wurden PDC mit dem Anti-BDCA-2-spezifischen und dem HLA-DR-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Reinheit der

isolierten PDC betrug etwa 95 % (Abbildung 3.1 C). Um Monozyten zu gewinnen wurden die PDC-depletierten PBMC verwendet, wodurch eine Kontamination mit PDC ausgeschlossen werden konnte. Die Monozyten wurden mit einer Negativselektion über MACS-Separation isoliert und für eine Reinheitsbestimmung über FACS analysiert. Dazu wurden sie mit dem Anti-CD14-Antikörper gefärbt. Um eine mögliche Verunreinigung durch PDC zu kontrollieren, wurden die Monozyten zusätzlich mit dem PDC-spezifischen Anti-BDCA-2-Antikörper gefärbt. Die FACS-Analyse zeigte, dass die Monozyten nach der MACS-Separation eine Reinheit von 93 % hatten (Abbildung 3.1 D).



**Abbildung 3.1: Bestimmung der Reinheit humaner Monozyten und humaner PDC nach der MACS-Separation.**

Humane PBMC wurden aus frischen Buffy-Coats über einen Biocoll-Gradienten aufgereinigt. PDC wurden mit Anti-CD303-beads markiert und über MACS-Separation isoliert. Monozyten wurden aus den PDC-depletierten PBMC mit dem Monozyten-Isolations Kit II (negativ Selektion) aufgereinigt. (A) PBMC wurden im FACS analysiert und mit dem SSC und FSC aufgenommen. (B) Über den Monozyten- und Makrophagen-spezifischen Anti-CD14 Antikörper (APC) wurde der Anteil der Monozyten und Makrophagen und über den PDC-spezifischen Anti-BDCA-2-Antikörper der Anteil der PDC in den gesamten PBMC bestimmt. (C) zeigt die Reinheit der BDCA-2, HLA-DR-positiven PDC nach MACS-Separation; diese beträgt 94,6 %. (D) Die Reinheit der CD14-positiven Monozyten beträgt 93 %.

### 3.1.2 Stimulation von PBMC, Monozyten und PDC mit Nukleinsäureliganden

Um die Funktionalität und die spezifische Erkennung bekannter Nukleinsäureliganden zu kontrollieren, wurden PBMC, Monozyten und PDC isoliert und anschließend stimuliert. Zur Stimulation der Nukleinsäure-detektierenden TLRs wurden entsprechende Liganden mit Poly-l-Arginin komplexiert; die Stimulation zytosolischer Nukleinsäure-detektierender Rezeptoren wurde durch Transfektion mit kationischen Lipiden durchgeführt. Poly-l-Arginin ist ein kationisches Peptid, das aufgrund seiner kationischen Ladung Komplexe mit der anionischen Nukleinsäure bildet. Diese Komplexe können durch Phagozytose in die Endosomen aufgenommen werden. Die Transfektion mit kationischen Lipiden eignet sich zum Transfer der Liganden in das Zytosol der Zelle, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass Liganden das Endosom der transfizierten Zellen passieren.

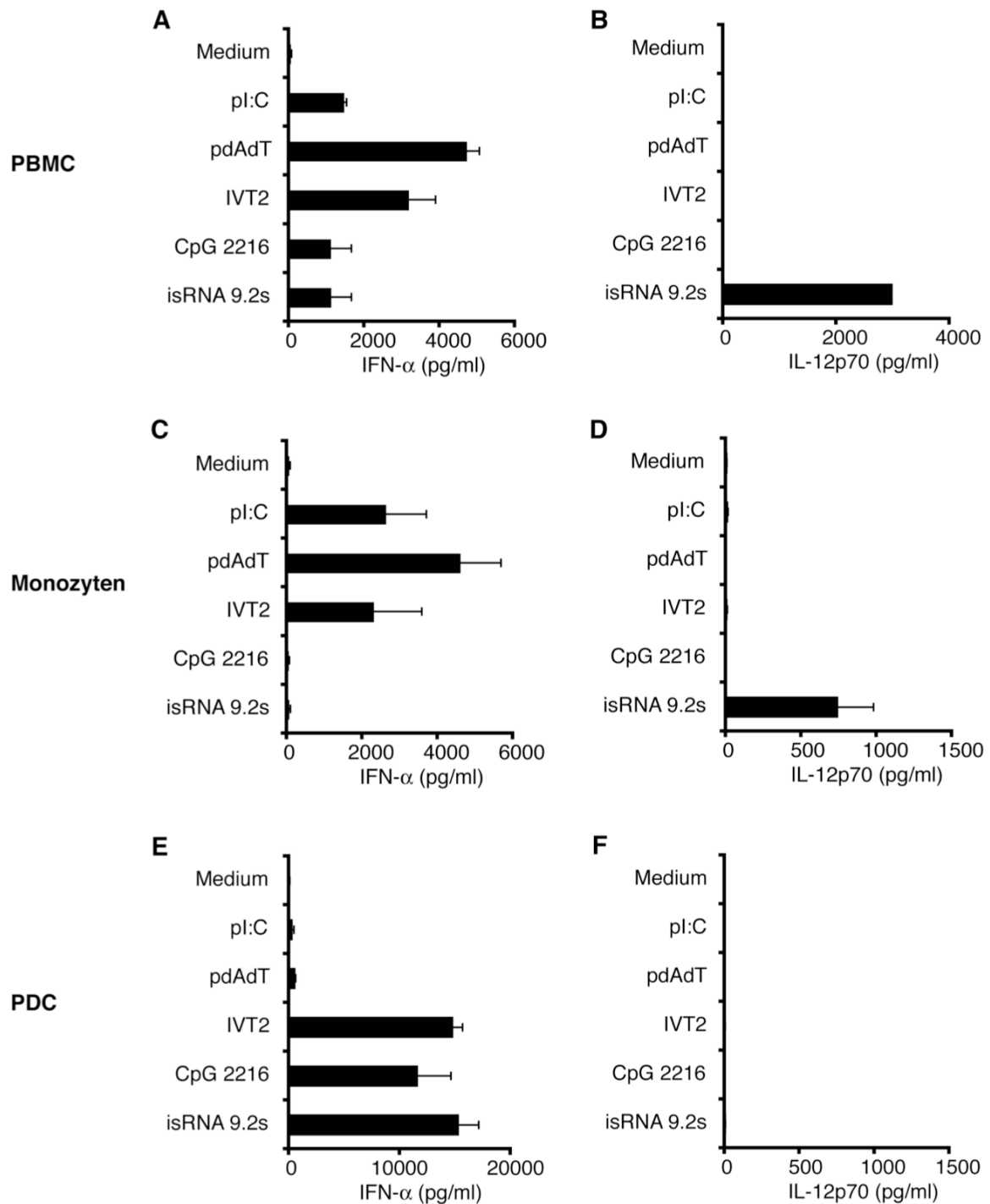
Zur Stimulation von TLR7/8 wurde die isRNA 9.2s ausgewählt [48]; die Stimulation von TLR9 erfolgte mit CpG 2216 (CpG-A), das die Produktion großer Mengen IFN- $\alpha$  in PDC induziert (Krug, Rothenfusser, 2001). Zusätzlich wurden die Zellen mit pl:C transfiziert, das über MDA-5 erkannt wird [6, 7] und mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT2) die RIG-I stimuliert [36, 37]. Zur Aktivierung des noch unbekanntenen Rezeptors zur Erkennung zytosolischer DNA wurde pdAdT in die Zellen transfiziert.

PBMC, Monozyten oder PDC wurden mit den oben beschriebenen Liganden stimuliert und nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  und IL-12p70 in den Überständen gemessen (Abbildung 3.2). Wie erwartet produzierten PBMC nach der Erkennung von pl:C, pdAdT und IVT2 IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.2 A). Vorherige Studien hatten gezeigt, dass sowohl durch die Erkennung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT2) über RIG-I, von pl:C über MDA-5 als auch von pdAdT durch eine zytosolische DNA-Erkennung IFN- $\alpha$  induziert wird [6, 8, 36]. Da CpG 2216 PDC über TLR9 zur Sekretion von IFN- $\alpha$  stimuliert [169] und isRNA über TLR7 in PDC ebenfalls die Produktion von IFN- $\alpha$  induziert [48] wurde in den Überständen der Mischpopulation der PBMC nach Stimulation mit CpG-DNA und isRNA IFN- $\alpha$  nachgewiesen (Abbildung 3.2 A).

Lediglich nach der Stimulation mit isRNA 9.2s wurde in den humanen PBMC zusätzlich zu IFN- $\alpha$  IL-12p70 sezerniert. Dies war vermutlich auf die Erkennung der isRNA über TLR8 zurückzuführen (Abbildung 3.2 B). Da für die Sekretion von IFN- $\alpha$  nach TLR7 oder TLR9 Stimulation die PDC verantwortlich sind, konnten in isolierten Monozyten nur die zytosolischen Stimuli IFN- $\alpha$  induzieren (Abbildung 3.2 C). Erneut wurde beobachtet, dass nur isRNA 9.2s als TLR8 Ligand IL-12p70 induziert (Abbildung 3.2 D). Dagegen wurde in isolierten PDC nach Stimulation mit isRNA 9.2s kein IL-12p70 nachgewiesen (Abbildung 3.2 F), da PDC keinen TLR8 exprimieren [26, 28]. PDC produzierten nach Stimulation mit pl:C und pdAdT kein IFN- $\alpha$ , wohl



aber nach Stimulation mit IVT2 (Abbildung 3.2 E). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PDC nach zytosolischer Stimulation mit Nukleinsäuren kein IFN- $\alpha$  produzieren. Die IFN- $\alpha$ -Produktion in PDC nach Stimulation mit IVT2 ist vermutlich auf eine Stimulation von TLR7 zurückzuführen. Die Sequenz der 5'-Triphosphat-RNA sollte kein Uridin enthalten und daher nicht über TLR7 erkannt werden. Da IVT2 aber durch *in vitro*-Transkription synthetisiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Uridin-Nukleotide eingebaut wurden oder dass partielle Doppelstränge gebildet wurden, die Uridin enthalten. Das könnte eine TLR7-Stimulation und eine dadurch induzierte IFN- $\alpha$ -Sekretion begründen. Nach Erkennung von CpG 2216 über TLR9 und isRNA 9.2s über TLR7 sezernierten PDC, wie erwartet, große Mengen IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.2 E).



**Abbildung 3.2: Induktion von IFN- $\alpha$  und IL-12p70 in humanen PBMC, Monozyten und PDC durch Stimulation endosomaler TLRs oder zytosolischer Rezeptoren.**

PBMC (A, B), Monozyten (C, D) oder PDC (E, F) wurden aus frischen Buffy-Coats aufgereinigt. Liganden für eine zytosolische DNA-Erkennung (pdAdT) oder die Stimulation der zytosolischen Rezeptoren MDA-5 (pl:C,) und RIG-I (IVT2) wurden in die Zellen transfiziert (1  $\mu$ g/ml). Mit Poly-l-Arginin komplexierte Liganden wurden für die Stimulation der endosomalen Rezeptoren TLR9 (CpG 2216) und TLR7/8 (isRNA 9.2s) auf die Zellen gegeben (1  $\mu$ g/ml). Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  (A, C, E) oder IL-12p70 (B, D, F) im Überstand bestimmt.

## **3.2 Immunstimulierende Aktivität von mit kationischen Peptiden komplexierter isRNA**

2005 wurde von Hornung und Kollegen gezeigt, dass isRNA sequenzabhängig über TLR7 erkannt wird [48]. Andere Studien zeigten, dass Guanosin-Uridin (GU)-reiche ssRNA sowohl TLR7 als auch TLR8 stimulieren kann [47]. In weiteren Untersuchungen wurden Sequenzmuster von isRNA identifiziert, die in einer Mischpopulation aus humanen PBMC vermehrt TLR7 stimulieren und dadurch IFN- $\alpha$  in PDC induzieren oder besser über TLR8 erkannt werden und IL-12p70 in Monozyten induzieren (Hornung et al. unpublizierte Daten).

isRNA gelangt nicht ohne kationisches Peptid oder Transfektionsreagenzien in die Zellen, um diese zu stimulieren [47], da RNA sehr schnell degradiert wird und nicht effektiv von Zellen aufgenommen wird. Da TLR7 und TLR8 im Endosom der Zelle lokalisiert sind, spielt die Verwendung geeigneter „Träger“ für die isRNA eine essentielle Rolle. Zum „Transfer“ von isRNA in die Endosomen der Zelle wurde bisher das kationische Peptid Poly-l-Arginin oder Transfektionsreagenzien wie Dotap oder Lipofectamine verwendet [47, 48].

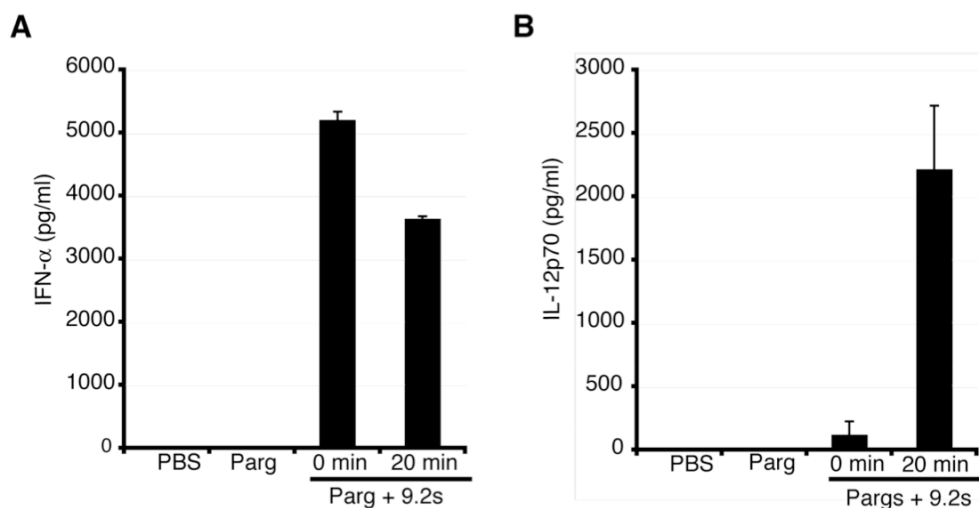
CpG-ODNs [170] und mRNA [171] können, komplexiert mit Protamin, Zellen stimulieren. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch isRNA komplexiert mit Protamin TLR7 und TLR8-abhängige Zytokine in PBMC induzieren kann und wie sich die Sequenz der isRNA und die Partikeleigenschaften auf die Stimulation auswirken.

### **3.2.1 Die Inkubationszeit von isRNA 9.2s mit Poly-l-Arginin beeinflusst die Zytokinproduktion der stimulierten humanen PBMC**

Bisher wurde gezeigt, dass isRNA, komplexiert mit Poly-l-Arginin, Zellen stimulieren und die Produktion von Zytokinen induzieren kann [48].

Um eine geeignete Inkubationszeit für die isRNA mit dem kationischen Peptid Poly-l-Arginin zu ermitteln, wurden humane PBMC stimuliert. Nach Zugabe der isRNA 9.2s mit Poly-l-Arginin in 1xPBS wurden die Stimuli entweder sofort oder nach einer Inkubationszeit von 20 min auf die PBMC gegeben. Nach Stimulation des humanen TLR7 in PBMC wird überwiegend IFN induziert, die Stimulation von TLR8 dagegen führt vermehrt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12p70 und TNF- $\alpha$  [42, 51]. Um zwischen TLR7 und TLR8-Stimulation zu unterscheiden, wurde nach 20 h IFN- $\alpha$  und IL-12p70 im Überstand bestimmt. Es wurde beobachtet, dass die Menge der produzierten Zytokine abhängig von der Inkubationszeit des Stimulationsansatzes (isRNA 9.2s mit Poly-l-Arginin) war. Wurde die isRNA 9.2s

sofort nach Zusammengabe mit Poly-l-Arginin auf die Zellen gegeben, so produzierten die humanen PBMC etwa 5000 pg/ml IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.2 A), aber nur wenig IL-12p70 (Abbildung 3.3 B). Dagegen führte eine 20-minütige Inkubationszeit von isRNA und Poly-l-Arginin zu großen Mengen IL-12p70 (etwa 2000 pg/ml), die Menge des produzierten IFN- $\alpha$  war etwas geringer als zuvor (Abbildung 3.3). Es wurde vermutet, dass eine sehr kurze Inkubationszeit besser geeignet zur Stimulation von TLR7 in humanen PDC war, denn diese produzieren nach Erkennung von ssRNA über TLR7 IFN- $\alpha$ . Die TLR8-abhängige Produktion von IL-12p70 nach 20 min Inkubationszeit deutete daraufhin, dass Zellen die TLR8 exprimieren und nach Stimulation IL-12p70 produzieren, bevorzugt Komplexe, die längere Zeit (20 min) inkubiert wurden, aufnehmen.



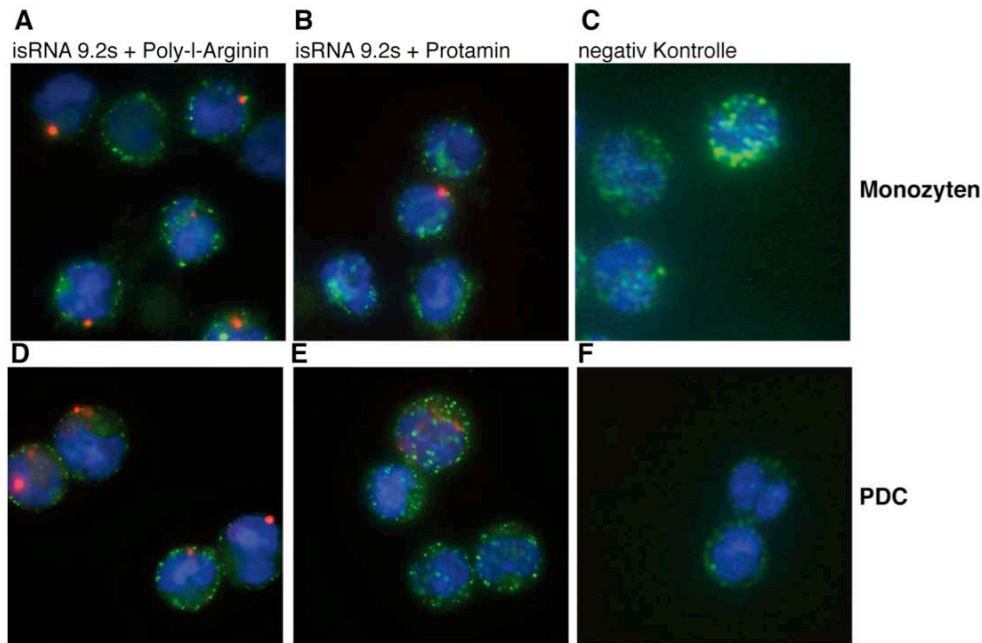
**Abbildung 3.3: In Abhängigkeit der Inkubationszeit induziert mit Poly-l-Arginin komplexierte isRNA 9.2s verstärkt IFN- $\alpha$  oder IL-12p70.**

Humane PBMC wurden aufgereinigt und isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin (Parg), auf die Zellen gegeben. Die komplexierte isRNA wurde entweder sofort auf die Zellen gegeben (0 min) oder nach einer 20-minütigen Inkubationszeit (20 min) des Stimulationsansatzes. Nach 20 h wurde (A) IFN- $\alpha$  und (B) IL-12p70 im Überstand bestimmt.

### 3.2.2 Aufnahme von isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin, durch Monozyten und PDC

Protamin ist wie Poly-l-Arginin ein kationisches Arginin-reiches Polypeptid. Es sollte untersucht werden, ob isRNA auch mit Protamin komplexiert werden kann, um Zellen zu stimulieren.

Dazu sollte zunächst die Aufnahme der mit Protamin komplexierten isRNA 9.2s nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Aufnahme wurde fluoreszenzmarkierte isRNA 9.2s (isRNA 9.2s-Cy3; rot) entweder mit Poly-l-Arginin oder Protamin komplexiert. Um zu untersuchen, ob Stimuli sowohl von TLR7-exprimierenden PDC oder von TLR8-exprimierenden Monozyten [26, 28] aufgenommen werden, wurden aus humanen PBMC PDC und Monozyten isoliert. Diese wurden mit der komplexierten isRNA 9.2s stimuliert und 2,5 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen der Monozyten mit einem Anti-CD14-Antikörper und die PDC mit einem Anti-BDCA-2-Antikörper markiert und über einen Alexa488-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht (grün). Die Aufnahme der isRNA wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Wie erwartet wurde die isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin, sowohl von Monozyten als auch von PDC aufgenommen (Abbildung 3.4 A, D). isRNA 9.2s, die mit Protamin komplexiert war, konnte ebenfalls im Zellinneren der Monozyten und PDC nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 B, E). Tendenziell erscheint die Aufnahme der mit Protamin komplexierten isRNA verglichen mit der Aufnahme der isRNA 9.2s zusammen mit Poly-l-Arginin durch beide Zelltypen geringer. Insbesondere die PDC, die mit Protamin komplexierter isRNA 9.2s stimuliert wurden, zeigten eine etwas geringere Aufnahme der Cy3-markierten isRNA (Abbildung 3.4 E).



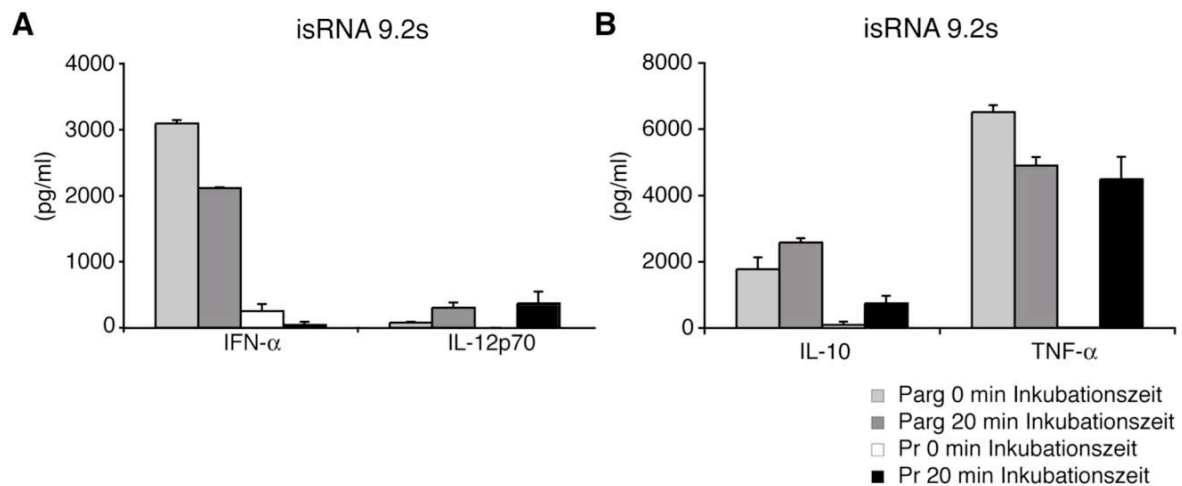
**Abbildung 3.4: IsRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin, wird von Monozyten und PDC aufgenommen.**

Monozyten (A-C) oder PDC (D-E) aus frischem Blut gesunder Spender wurden aufgereinigt und mit Poly-l-Arginin (A, D) oder Protamin (B, E) komplexierter isRNA 9.2s-Cy3 (rot) stimuliert (Inkubationszeit des Stimulationsansatzes: 20 min). Nach 2 h wurden die Monozyten zunächst mit einem Anti-CD14 Antikörper (A-C) und die PDC mit einem Anti-BDCA-2 Antikörper und anschließend mit einem Alexa488-markierten Sekundärantikörper (grün) gefärbt. Nuklei wurden mit Hoechst 33342 (blau) sichtbar gemacht. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.2.3 Zytokinprofil humaner PBMC nach Stimulation mit isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin

Es wurde gezeigt, dass isRNA komplexiert mit Protamin oder Poly-l-Arginin, durch die primären humanen Blutzellen aufgenommen wurde (Abbildung 3.4). Anhand der Bestimmung verschiedener Zytokine, sollte die Funktionalität der Protamin komplexierten isRNA 9.2s, zur Stimulation von TLR7 und TLR8 nachgewiesen werden. Dazu wurden humane PBMC aus humanem Blut isoliert und mit isRNA 9.2s stimuliert. isRNA 9.2s wurde entweder mit Poly-l-Arginin oder mit Protamin zusammengegeben und direkt oder nach einer 20-minütigen Inkubationszeit auf die Zellen gegeben. Nach 20 h Inkubation der stimulierten PBMC wurde IFN- $\alpha$ , IL-12p70, IL-10 und TNF- $\alpha$  im Überstand nachgewiesen (Abbildung 3.5). Während isRNA 9.2s große Mengen IFN- $\alpha$  sowohl bei sofortiger Stimulation nach Zusammengabe von isRNA und Poly-l-Arginin als auch bei einer vorherigen Inkubationszeit von 20 min induzierte, war die IFN- $\alpha$  Induktion nach Stimulation mit Protamin komplexierter

isRNA sehr gering. Da IFN- $\alpha$  nach TLR7-Stimulation in PDC, nicht aber nach TLR8-Stimulation in Monozyten, induziert wird, deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass mit Protamin komplexierte isRNA in der Mischpopulation der humanen PBMC nicht geeignet zur Stimulation von TLR7 ist. Die Menge IL-12p70 im Überstand betrug etwa 300-400 pg/ml, wenn isRNA mit den kationischen Peptiden (Poly-l-Arginin oder Protamin) 20 min vor der Stimulation inkubiert wurde. Dagegen konnte ohne Inkubationszeit des Stimulationsansatzes weder zusammen mit Poly-l-Arginin noch mit Protamin IL-12p70 induziert werden (Abbildung 3.5 A). Es wurde vermutet, dass myeloide TLR8-exprimierende Zellen isRNA erst aufnehmen, wenn sie zuvor längere Zeit mit dem kationischen Peptid inkubiert wurde. Um die TLR8-abhängige Induktion proinflammatorischer Zytokine breitflächiger zu untersuchen, wurde zusätzlich TNF- $\alpha$  gemessen, das auch selektiv nach TLR8-Stimulation jedoch nicht nach TLR7-Stimulation in myeloiden Zellen induziert wird [42, 51]. Es wurde beobachtet, dass TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit Poly-l-Arginin komplexierter isRNA 9.2s unabhängig von der Inkubationszeit produziert wird. isRNA 9.2s, komplexiert mit Protamin, dagegen induzierte TNF- $\alpha$  nur nach einer Inkubationszeit des Stimulationsansatzes von 20 min. Zusätzlich wurde IL-10 als immunregulierendes Zytokin bestimmt, das zum Großteil von Monozyten und Th2-Zellen produziert wird. IL-10 wurde durch mit Poly-l-Arginin komplexierter isRNA unabhängig von der Inkubationszeit induziert, dagegen konnte die mit Protamin komplexierte isRNA 9.2s nur nach einer Inkubation von 20 min vor der Stimulation IL-10 in den humanen PBMC induzieren. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zytokinproduktion der TLR7- oder TLR8-spezifischen Zytokine abhängig von dem verwendeten kationischen Peptid und der Inkubationszeit ist. isRNA 9.2s und Protamin induzierten IL-12p70, TNF- $\alpha$  und IL-10 in Abhängigkeit der Inkubationszeit des Stimulationsansatzes. Eine IFN- $\alpha$ -induzierende TLR7-Stimulation in Zusammenhang mit Protamin war nicht zu beobachten.



**Abbildung 3.5: Mit Protamin komplexierte isRNA 9.2s induziert in PBMC die Produktion TLR8-spezifischer Zytokine.**

Humane PBMC wurden aufgereinigt und mit isRNA 9.2s stimuliert. RNA und Poly-L-Arginin (Parg) oder Protamin (Pr) wurden in 1x PBS zusammengegeben und entweder sofort (0 min) oder nach einer Inkubationszeit von 20 min auf die PBMC gegeben. Nach 20 h Inkubation wurde (A) IFN- $\alpha$  und IL-12p70 oder (B) IL-10 und TNF- $\alpha$  im Überstand bestimmt.

### 3.2.4 Bestimmung der Partikelgröße der komplexierten isRNA

Wie in Abbildung 3.5 gezeigt wurde, variierte das Zytokinmuster der stimulierten humanen PBMC in Abhängigkeit des zur Komplexierung verwendeten kationischen Peptids und der Inkubationszeit von Peptid und isRNA. Es wurde angenommen, dass das durch die komplexierte isRNA induzierte Zytokinmuster von der Beschaffenheit der zur Stimulation verwendeten Komplexe abhängt. Sowohl das kationische Peptid als auch die Inkubationszeit könnten die Größe und somit eine zelltypspezifische Stimulation beeinflussen. Daher sollte die Partikelgröße in Abhängigkeit der Inkubationszeit und in Abhängigkeit des verwendeten kationischen Peptids mit dem Elektronenmikroskop untersucht werden.

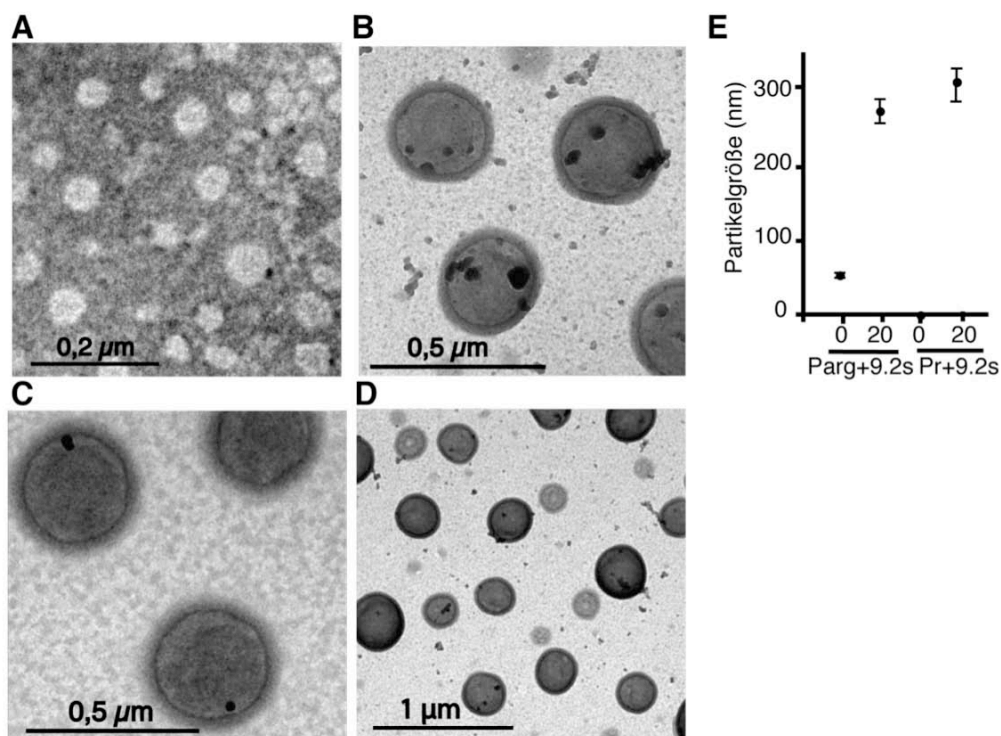
isRNA 9.2s wurde mit Poly-L-Arginin oder Protamin zusammengegeben und sofort bzw. nach 20 min Inkubationszeit mit Uranylacetat auf einem Kupfernetzchen fixiert. Anschließend wurden die fixierten Partikel mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Bei isRNA und Poly-L-Arginin, die nach Zusammengabe sofort fixiert wurden, konnten kleine Formationen oder Komplexe unter dem Elektronenmikroskop beobachtet werden (Abbildung 3.6 A). Die mittlere Größe dieser kleinen, nicht gleichförmigen Partikel betrug  $54 \pm 3$  nm ( $n=5$ ). Entsprechende Formationen konnten bei der Zusammengabe von isRNA mit Protamin und sofortiger Fixierung nicht identifiziert



werden. isRNA und Protamin schienen zu diesem Zeitpunkt noch keine im Elektronenmikroskop sichtbaren Formationen gebildet zu haben.

Eine Inkubationszeit von 20 min von isRNA und Poly-l-Arginin (Abbildung 3.6 B, E) bzw. isRNA und Protamin (Abbildung 3.6 C-E) führte zur Bildung größerer, runder Partikel. Die durchschnittliche Partikelgröße, die mit isRNA 9.2s und Poly-l-Arginin während 20 min Inkubationszeit gebildet wurde, betrug  $266 \pm 16$  nm ( $n=5$ ), die entsprechenden Partikel aus isRNA 9.2s und Protamin waren etwas größer ( $308 \pm 17$  nm;  $n=5$ ) (Abbildung 3.6 E).

Die Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop zeigte, dass abhängig von dem kationischen Peptid und der Inkubationszeit zusammen mit der isRNA verschiedene Partikelgrößen gebildet werden. Insbesondere das Fehlen der Formationen bei der Zusammengabe von isRNA und Protamin deutet auf eine unterschiedliche Entstehung oder Bildungsgeschwindigkeit der Komplexe hin. Über Oberflächenstrukturen oder sonstige Beschaffenheiten der Partikel kann aufgrund dieser elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Aussage gemacht werden.



**Abbildung 3.6: Bestimmung der Partikelgröße von isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin.**

isRNA 9.2s wurde mit Poly-l-Arginin (A-B) oder Protamin (C-D) zusammengegeben und entweder gleich fixiert (A) oder 20 min inkubiert (B-D) und anschließend fixiert. Partikel wurden mit Uranylacetat sichtbar gemacht und unter dem Elektronenmikroskop mit einer Vergrößerung von 64.000x (A), 46.000x (B, C) oder 13.000x (D) analysiert. (E) zeigt die Partikelgröße in Abhängigkeit der Inkubationszeit von der isRNA mit den kationischen Peptiden Poly-l-Arginin (Parg) oder Protamin (Pr).

### 3.2.5 Sequenzmotive der isRNA beeinflussen das nach Stimulation produzierte Zytokinmuster

Bei ssRNA, die in bisherigen Untersuchungen zur Stimulation von TLR7 und TLR8 verwendet wurde, handelt es sich meistens um recht komplexe RNA-Sequenzen [42, 48]. Hornung und Kollegen analysierten die Induktion von TLR7- und TLR8-spezifischen Zytokinen in humanen PBMC, die durch isRNA mit 4 nt langen Sequenzmotiven in einer Umgebung von einer nicht stimulatorisch aktiven Adenosinsequenz induziert wurden (Hornung et al. unpublizierte Daten). Es zeigte sich, dass es Sequenzen gibt, die vermehrt TLR7-spezifische oder TLR8-spezifische Zytokine in humanen PBMC induzieren. Aufgrund der Beobachtung, dass isRNA 9.2s, die eine komplexe Sequenz besitzt, abhängig vom kationischen Peptid und der Inkubationszeit des Stimulationsansatzes verschiedene Zytokinmuster induziert (Abbildung 3.5), sollte zusätzlich die stimulatorische Aktivität ausgewählter Sequenzmotive in Kombination mit Poly-l-Arginin oder Protamin untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden 19 nt lange isRNA-Sequenzen nach folgenden Kriterien ausgewählt: zwei ORNs mit jeweils einem Motiv zur Stimulation von TLR7, zwei ORNs mit jeweils einem Motiv zur Stimulation von TLR8 oder ein ORN mit zwei Motiven, davon eines zur Stimulation von TLR7 und eines zur Stimulation von TLR8 (Tabelle 3.1). Die Bezeichnung der isRNA erfolgte nach dem „Schulnotenprinzip“. Die erste Zahl (7) und die dritte Zahl (8) stehen dabei für den jeweiligen TLR (TLR7 oder TLR8), die folgende Zahl beschreibt jeweils die von Hornung und Kollegen beobachtete stimulatorische Aktivität, wobei 1 „sehr gut“ und 6 „schlecht“ bedeutet. isRNA 7989.1 – eine polyadenosin RNA (pA) – besitzt kein stimulatorisches Motiv und sollte als Negativkontrolle dienen.

Zur Untersuchung der selektiven Stimulation von TLR7 wurden die isRNAs 7186.1 und 7186.2 ausgewählt, die als sehr gute TLR7-Stimuli aber als schlechte TLR8-Stimuli beschrieben wurden (Hornung et al., unpublizierte Daten). Zur TLR8-selektiven Stimulation wurden isRNA 7681.1 und 7682.1 ausgewählt. Eine weitere isRNA (7181.1) sollte sowohl von TLR7 als auch von TLR8 erkannt werden, sie enthielt daher ein TLR7-aktivierendes und ein TLR8-aktivierendes Sequenzmotiv.

ORN	RNA-Sequenz	TLR
isRNA 9.2s	AGCUUAACCUGUCCUUCAA	7/8
7181.1	AAGUUCAAAAAAAAAUCGUA	7/8
7186.1	AAAAAAAGUUCAAAAAAAA	7
7186.2	AAAAAAAGUCAAAAAAAA	7
7681.1	AAAAAAUCGUAAAAAAAA	8
7682.1	AAAAAAAGUUGAAAAAAAA	8
7989.1	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	-

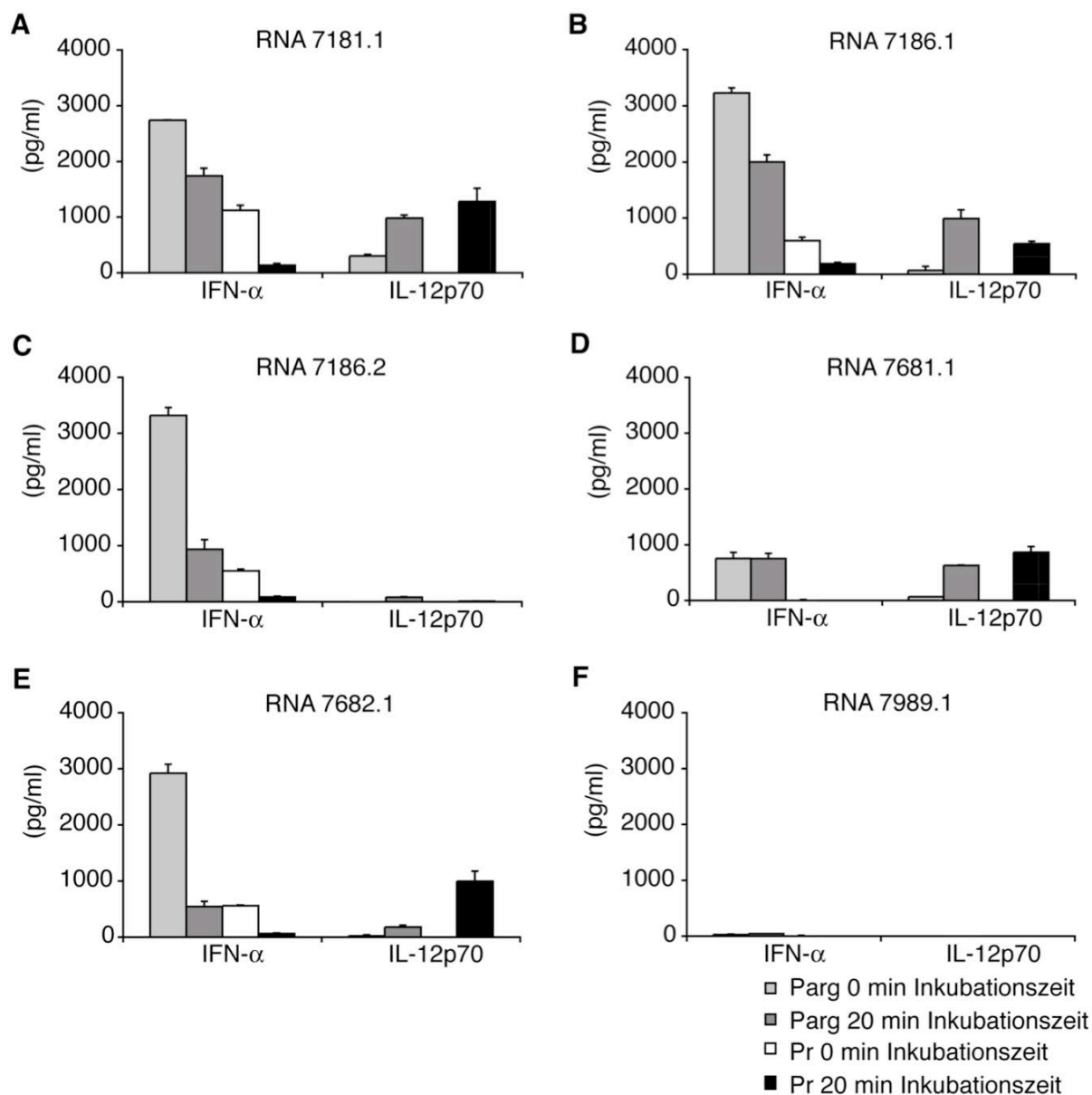
**Tabelle 3.1: isRNA-Sequenzen zur Stimulation von TLR7 und TLR8.**

Die Sequenzen der verwendeten isRNAs (19 nt) sind entweder komplexe Sequenzen (isRNA 9.2s) oder enthalten 4 nt Sequenzmotive umgeben von Adenosinnukleotiden. isRNA 7181.1 enthält jeweils ein stimulierendes Sequenzmotiv für TLR7 und TLR8. isRNA 7186.1 und 7186.2 enthalten Sequenzmotive, die bevorzugt TLR7-abhängige Zytokine in humanen PBMC induzieren; 7681.1 und 7682.1 haben Motive zur bevorzugten Stimulation von TLR8 (Sequenzen adaptiert von Hornung et al. unpublizierte Daten).

Humane PBMC wurden aus frischen Buffy Coats isoliert und anschließend mit den isRNAs, die TLR7- oder TLR8-stimulierende Motive enthielten (Tabelle 3.2), stimuliert. Dazu wurden die isRNAs mit Poly-l-Arginin oder Protamin komplexiert. Stimulationsansätze wurden sofort (0 min) nach Zusammengabe der isRNA mit dem kationischen Peptid auf die Zellen gegeben oder nach einer Inkubationszeit des Stimulationsansatzes von 20 min. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  und IL-12p70 im Überstand bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass nicht nur die Sequenz ausschlaggebend für die Stimulation von TLR7 und TLR8 und die resultierende Produktion der verschiedenen Zytokine war, sondern dass, wie schon bei der Stimulation mit isRNA 9.2s beobachtet (Abbildung 3.5), auch das kationische Peptid und die Inkubationszeit die Zytokinproduktion beeinflussten. Während alle isRNA-Sequenzen, die mit Poly-l-Arginin komplexiert wurden, IFN- $\alpha$  induzierten, produzierten die Zellen nach Stimulation mit Protamin komplexierter isRNA wenig oder gar kein IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.7). Die als TLR7-aktivierend beschriebenen isRNAs 7181.1, 7186.1 und 7186.2 induzierten, komplexiert mit Poly-l-Arginin, in Relation zu isRNA 7681.1 viel IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.7 A-C). Die Menge IFN- $\alpha$  war deutlich höher (etwa 3000 pg/ml) wenn Stimuli ohne vorherige Inkubation auf die Zellen gegeben wurden. Die Menge IFN- $\alpha$  im Überstand nach der Stimulation war etwas geringer (etwa 1000-2000 pg/ml) wenn die Partikel vor der Stimulation 20 min inkubiert wurden. Obwohl isRNA 7681.1 und 7682.1 als nicht TLR7-stimulierende Sequenzen beschrieben worden waren

(Hornung et al. unpublizierte Daten), produzierte insbesondere isRNA 7682.1 nach Komplexierung mit Poly-l-Arginin und sofortiger Stimulation IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.7 D, E). Die Menge IFN- $\alpha$ , die unter diesen Bedingungen von isRNA 7681.1 induziert wurde, war recht gering (1000 pg/ml). IL-12p70 wurde hauptsächlich durch Stimulation mit Partikeln induziert, die zuvor 20 min inkubiert worden waren. Die Produktion von IL-12p70 nach 20 min Inkubationszeit des Stimulationsansatzes schien unabhängig von dem verwendeten kationischen Peptid zu sein. isRNA 7682.1 war die einzige isRNA, die komplexiert mit Protamin und 20 min Inkubationszeit, deutlich mehr IL-12p70 induzierte, als wenn sie mit Poly-l-Arginin komplexiert wurde (Abbildung 3.7 E). Während von der als selektiv TLR7-stimulierend beschriebenen isRNA 7186.1 IL-12p70 induziert wurde (20 min Inkubation, Abbildung 3.7 B), induzierte die auch als TLR7-spezifisch beschriebene isRNA 7186.2, komplexiert mit Poly-l-Arginin oder Protamin, kein IL-12p70 (Abbildung 3.7 C). isRNA 7681.1 und 7682.1, komplexiert mit Protamin, induzierten selektiv IL-12p70, wenn sie vor der Stimulation 20 min mit Protamin inkubiert worden waren, ohne die Produktion von IFN- $\alpha$  zu stimulieren (Abbildung 3.7 D, E). Diese Ergebnisse zeigten, dass die sequenzabhängige Stimulation von TLR7 und TLR8 durch Stimulation mit isRNA nicht eindeutig selektiv ist. Nur unter Berücksichtigung des für die Komplexierung verwendeten kationischen Peptids und der Inkubationszeit des Stimulationsansatzes zusätzlich zu der isRNA-Sequenz kann eine Induktion von TLR7- oder TLR8-abhängigen Zytokinen in der Mischpopulation von humanen PBMC beeinflusst werden. Die Kombination aus Poly-l-Arginin mit der isRNA 7186.2 (ohne Inkubation des Stimulationsansatzes) verspricht eine selektive Induktion von IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.7 C). Die isRNAs 7681.1 und 7682.1, komplexiert mit Protamin und eine 20-minütige Inkubation des Stimulationsansatzes, ermöglichten die selektive Induktion von IL-12p70 (Abbildung 3.7 D, E). Die isRNA 7989.1, die kein stimulatorisches Motiv besaß, induzierte weder IFN- $\alpha$  noch IL-12p70 (Abbildung 3.7 F).



**Abbildung 3.7: Die isRNA-Sequenz und die Inkubationszeit von isRNA und dem kationischen Peptid beeinflussen die TLR7- und TLR8-Stimulation.**

Zur Stimulation humaner PBMC wurde isRNA (siehe Tabelle 3) mit Poly-L-Arginin (hellgrauer und dunkelgrauer Balken) oder Protamin (weißer oder schwarzer Balken) komplexiert. Entweder sofort nach Zusammengabe der isRNAs mit dem entsprechenden kationischen Peptid (hellgrau, weiß) oder nach einer Inkubationszeit von 20 min (dunkelgrau, schwarz) wurden die PBMC mit der kondensierten isRNA stimuliert. Nach 20 h wurden IFN- $\alpha$  und IL-12p70 im Überstand gemessen.

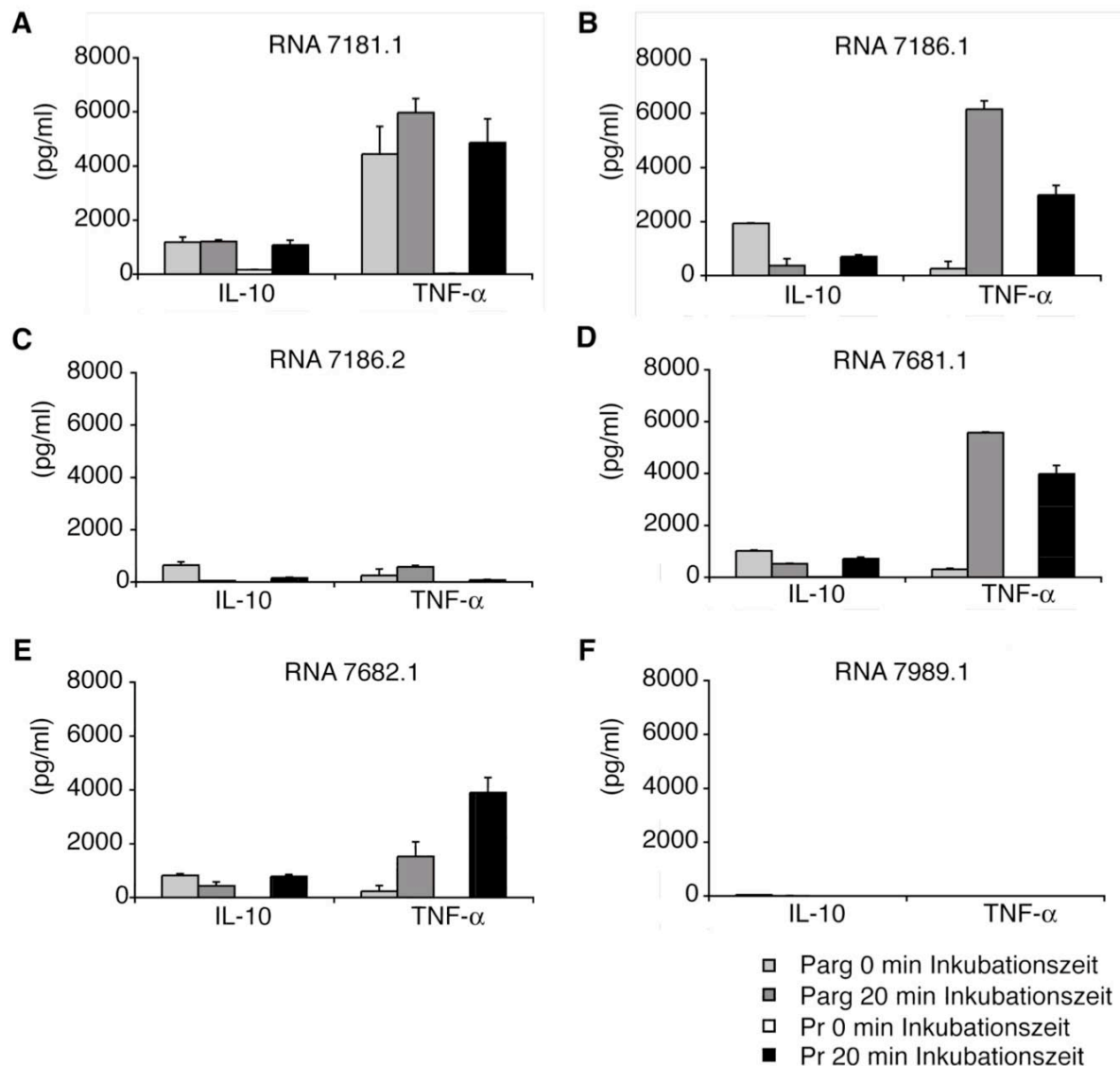
### 3.2.6 Die Produktion von IL-10 und TNF- $\alpha$ nach Stimulation mit isRNA

Es wurde gezeigt, dass mit Protamin komplexierte isRNA sequenzabhängig zur selektiven Induktion von IL-12p70 nach TLR8-Stimulation geeignet war (Abbildung

3.7). Darüber hinaus sollten zusätzlich die proinflammatorischen Zytokine IL-10 und TNF- $\alpha$  untersucht werden. Humane PBMC wurde mit isRNA stimuliert, die zuvor mit Poly-l-Arginin oder Protamin versetzt wurde. Die Stimulationsansätze wurden erneut entweder sofort (0 min) oder nach einer Inkubationszeit von 20 min auf die Zellen gegeben. Die Bestimmung von TNF- $\alpha$  in den Zellkulturüberständen 20 h nach der Stimulation zeigte, dass das TLR8-spezifische Zytokin TNF- $\alpha$  [42] durch Protamin komplexierte isRNA nur nach 20-minütiger Inkubation des Stimulationsansatzes induziert wurde. Alle Sequenzen, die zuvor IL-12p70 induziert hatten (7181.8, 7186.1, 7681.1 und 7682.1), stimulierten die Zellen ebenfalls zur Sekretion von TNF- $\alpha$  (Abbildung 3.8). Wurden diese isRNAs mit dem Protamin sofort nach Zusammengabe auf die humanen PBMC gegeben, so induzierte keine der getesteten isRNA die Produktion von TNF- $\alpha$ . Ähnliche Ergebnisse wurden für diese isRNAs (7181.8, 7186.1, 7681.1 und 7682.1) beobachtet, die mit Poly-l-Arginin komplexiert wurden. Die einzige isRNA, die auch durch Stimulation von isRNA und Poly-l-Arginin nach sofortiger Zugabe zu den Zellen TNF- $\alpha$  induzieren konnte, war die wesentlich komplexere isRNA 7181.1 (Abbildung 3.8 A). Diese isRNA enthielt als einzige zwei stimulatorische Motive – eins zur Stimulation von TLR7 und eins zur Stimulation von TLR8.

Die isRNA 7186.2 schien – unabhängig vom kationischen Peptid – kein guter Stimulus zur Induktion von TNF- $\alpha$  zu sein (Abbildung 3.8 C). Dies bestätigte die Beobachtung in Abbildung 3.7 C, dass 7186.2, komplexiert mit Poly-l-Arginin, selektiv nur TLR7 zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimulierte, während unabhängig von dem verwendeten kationischen Peptid und der Inkubationszeit des Stimulationsansatzes kein IL12-p70 produziert wurde. Ebenso induzierte diese isRNA kaum IL-10 (Abbildung 3.8 C). isRNA 7181.1, 7186.1, 7681.1 und 7682.1 induzierten zwischen 2000 und 4000 pg/ml IL-10, wenn sie mit Protamin komplexiert und 20 min vor der Stimulation zusammen inkubiert wurden (Abbildung 3.8 A, B, D, E). Wurden die isRNAs sofort nach Zusammengabe mit Protamin auf die Zellen gegeben, wurde hingegen kein IL-10 induziert. Auch die mit Poly-l-Arginin komplexierten isRNAs induzierten mehr IL-10, wenn sie mit dem kationischen Peptid 20 min vor der Stimulation inkubiert worden waren (Abbildung 3.8 A, B, D, E). Wie schon für die Produktion von TNF- $\alpha$  beobachtet wurde, schien die isRNA 7181.1, die zwei stimulatorische Motive enthielt, auch IL-10 zu produzieren, wenn sie sofort nach Zusammengabe mit Poly-l-Arginin zur Stimulation eingesetzt wurde (Abbildung 3.8 A). isRNA 7989.1 induzierte erneut keine Zytokine und wurde als vollständig inert befunden (Abbildung 3.8 F).

Da isRNA 7186.2 selektiv IFN- $\alpha$ , jedoch keine TLR8-abhängigen Zytokine induzierte, wurde diese RNA zur spezifischen Stimulation von TLR7 als geeignet befunden. Die Kombination von isRNA 7681.1 sowie 7682.1 mit Protamin und 20 min Inkubation des Stimulationsansatzes wurde als geeignet zur selektiven Stimulation von TLR8 identifiziert.



**Abbildung 3.8: Sequenzabhängige Induktion von IL-10 und TNF- $\alpha$  durch isRNA komplexiert mit Poly-I-Arginin oder Protamin.**

isRNA (siehe Tabelle 3.1) wurde mit Poly-I-Arginin zusammengegeben und sofort (hellgrauer Balken) bzw. nach 20 min Inkubationszeit (dunkelgrauer Balken) auf humane PBMC gegeben. Entsprechend wurde isRNA mit Protamin komplexiert und ebenfalls sofort (weißer Balken) oder nach 20 min Inkubationszeit (schwarzer Balken) zur Stimulation eingesetzt. Nach 20 h wurde IL-10 und TNF- $\alpha$  im Überstand bestimmt.

### 3.2.7 Stimulation humaner PBMC mit isRNA komplexiert mit Protamin Valeant

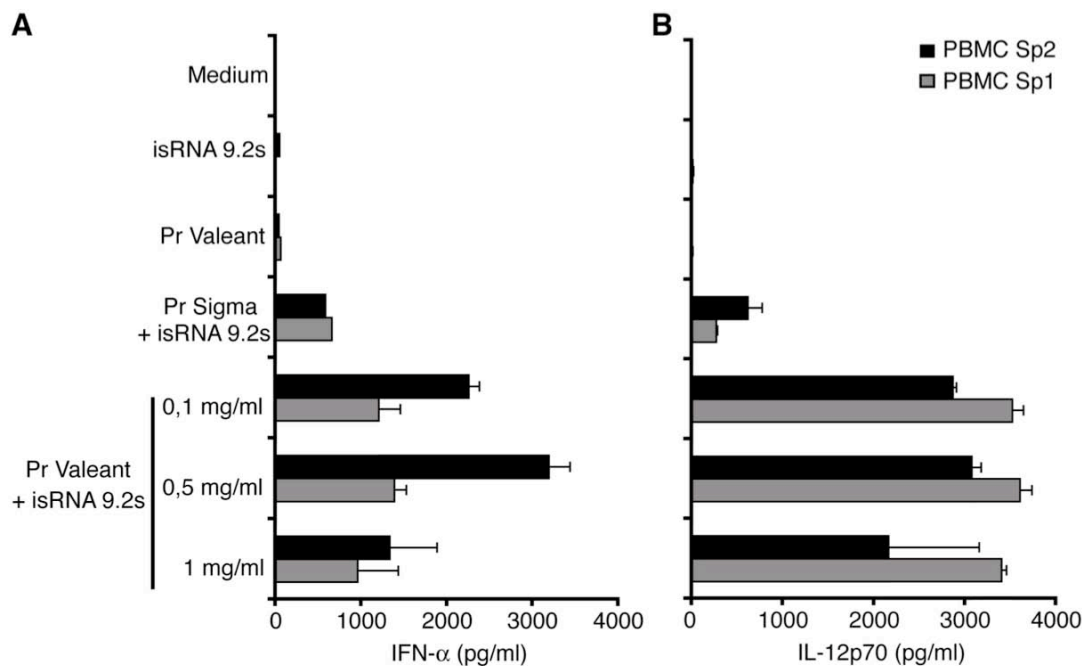
Für einen klinischen Einsatz von isRNA wäre es von Vorteil, ein bereits etabliertes Medikament für die Komplexierung der RNA zu verwenden. In dieser Arbeit wurde bisher gezeigt, dass isRNA, komplexiert mit Protamin (Sigma), insbesondere geeignet zu Stimulation von TLR8 ist. Deshalb sollte die Komplexierung der isRNA 9.2s mit dem Arzneimittel Protamin Valeant, das klinisch zur Antagonisierung von Heparin eingesetzt wird, untersucht werden.

Eine *ex vivo*-Applikation mit einem anschließenden adoptiven Transfer der stimulierten Zellen wäre für einen klinischen Einsatz denkbar. Gegenüber einer *in vivo*-Applikation der Stimuli wäre die Stimulation vereinfacht und das Risiko minimiert. Daher sollte untersucht werden, ob sich humane PBMC mit isRNA, komplexiert mit Protamin Valeant, stimulieren lassen. Für die Stimulation wurden höhere Menge isRNA 9.2s und Protamin Valeant eingesetzt als zuvor, da für eine *ex vivo*-Stimulation und den anschließenden adoptiven Transfer der autologen, nun stimulierten Zellen möglichst alle transferierten Zellen effektiv aktiviert werden sollen. Die Endkonzentration der isRNA und des Protamin Valeant für die Stimulation im Zellkulturüberstand betrug 10 µg/ml, was einer zehnfachen Menge der in vorherigen Versuchen eingesetzten Konzentration der isRNA entspricht. Die Komplexbildung wurde in 0,9 % NaCl durchgeführt. Um eine optimale Komplexbildung für eine Stimulation zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von Protamin Valeant und isRNA 9.2s variiert. Sie betragen entweder 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml oder 1 mg/ml. Als Vergleich wurde das zuvor verwendete Protamin (Sigma) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml zur Komplexbildung eingesetzt. Die Stimulationsansätze wurden 20 min vor der Stimulation der Zellen inkubiert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  und IL-12p70 in den Überständen bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass weder isRNA 9.2s noch Protamin Valeant alleine in diesen sehr hohen Konzentrationen Zytokine induzierten. isRNA 9.2s, die mit Protamin von Sigma oder Protamin Valeant komplexiert wurde, konnte in diesen Konzentrationen dagegen IFN- $\alpha$  induzieren (Abbildung 3.9 A). Es zeigte sich, dass Protamin Valeant besser geeignet zur Stimulation der Zellen mit isRNA 9.2s war, verglichen mit der isRNA, die mit dem Protamin von Sigma komplexiert wurde (Abbildung 3.9). Eine Konzentration von 0,5 mg/ml wurde als optimal für die Komplexbildung befunden. Ebenfalls wurde TLR8 sehr effizient zur Induktion von IL-12p70 stimuliert, wenn die isRNA 9.2s mit Protamin Valeant komplexiert wurde (Abbildung 3.14 B). Auch hier wurde beobachtet, dass Protamin (Sigma) schlechter zur Komplexierung von isRNA 9.2s bzw. zur Stimulation geeignet war als das Arzneimittel Protamin Valeant. Bei der Induktion von IL-12p70 schien die



Konzentration von isRNA und Protamin Valeant während der Komplexbildung nicht ausschlaggebend zu sein. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass ein klinischer Einsatz von isRNA, komplexiert mit Protamin Valeant, zur Induktion von Zytokinen generell möglich ist. Für eine selektive Stimulation von TLR7 oder TLR8 müssten geeignete isRNA-Sequenzen eingesetzt werden und die TLR-spezifische Induktion von Zytokinen in Abhängigkeit der Konzentration und der Sequenz von isRNA und Protamin Valeant erneut ermittelt werden.



**Abbildung 3.9: Induktion von IFN- $\alpha$  und IL-12p70 nach Stimulation mit isRNA 9.2s, komplexiert mit Protamin Valeant.**

Humane PBMC wurden aus Blut von zwei gesunden Spendern (Sp1 und Sp2) aufgereinigt und mit isRNA 9.2s stimuliert. isRNA 9.2s wurde mit Protamin (Pr Sigma) in 1x PBS oder mit dem Medikament Protamin Valeant (Pr Valeant) in 0,9 % NaCl zusammengegeben und 20 min inkubiert. Die Konzentration von Protamin Valeant und der isRNA bei der Partikelgenerierung betrug 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml oder 1 mg/ml. Komplezierte isRNA 9.2s, Protamin Valeant alleine oder isRNA 9.2s alleine wurden auf die Zellen gegeben (Konzentration 10  $\mu$ g/ml). Nach 20 h wurde (A) IFN- $\alpha$  und (B) IL-12p70 in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Durch die Untersuchung der einzelsträngigen isRNA konnte gezeigt werden, dass bei der Generierung spezifischer Liganden zur Stimulation von TLR7 und TLR8 nicht nur die Sequenz der isRNA eine Rolle spielt, sondern dass auch die Art der Komplexbildung und somit der Transfer der Stimuli in die Zelle die Stimulation beeinflusst. Zur Stimulation von TLR7 und TLR8 muss die isRNA in die PDC (TLR7)

oder Monozyten/Makrophagen und mCDs (TLR8) gelangen, das endosomale Kompartiment erreichen und über den entsprechenden TLR als „Gefahrensignal“ erkannt werden. Daraufhin wird die Produktion der Zytokine induziert.

Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass es Sequenzen von isRNA gibt die tendenziell verstärkt TLR7 aktivieren. Die Stimulation von TLR8 kann jedoch aufgrund der Sequenz nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ebenso ist es mit Sequenzen, die verstärkt über TLR8 erkannt werden. Erst eine geeignete Kombination aus kationischem Peptid, isRNA-Sequenz und Inkubationszeit zur Komplexbildung kann eine selektive Stimulation zur Folge haben. In dieser Arbeit konnten die isRNAs 7681.1 und 7682.1 in Kombination mit dem kationischen Peptid Protamin und einer 20-minütigen Inkubationszeit des Stimulationsansatzes als geeignet zur spezifischen Induktion TLR8-abhängiger Zytokine identifiziert werden.

### **3.3 Die Erkennung von RNA-Sekundärstrukturen im Endosom humaner Immunzellen**

Lange wurde vermutet, dass RNA in der Form von dsRNA ein Gefahrensignal für die Zelle ist. Es konnte gezeigt werden, dass enzymatisch hergestelltes pl:C – als Analog für virale dsRNA – von TLR3 erkannt wird [21]. Darüber hinaus wird pl:C auch im Zytosol über MDA-5 [6] und RIG-I [5] erkannt. Spätere Studien zeigten, dass RIG-I spezifisch 5'-Triphosphat-RNA erkennt [36, 37], die einen doppelsträngigen Anteil besitzt (Schlee et al. unpublizierte Daten). Im Gegensatz hierzu gelten TLR7 und TLR8 als Rezeptoren für ssRNA [42, 48, 51]. Lange ssRNA liegt physiologisch jedoch nicht vollkommen einzelsträngig vor sondern formt zur Minimierung der freien Energie Sekundärstrukturen, bei der sowohl doppelsträngige Abschnitte („Stems“) als auch einzelsträngige Schlaufen („Loops“) vorkommen.

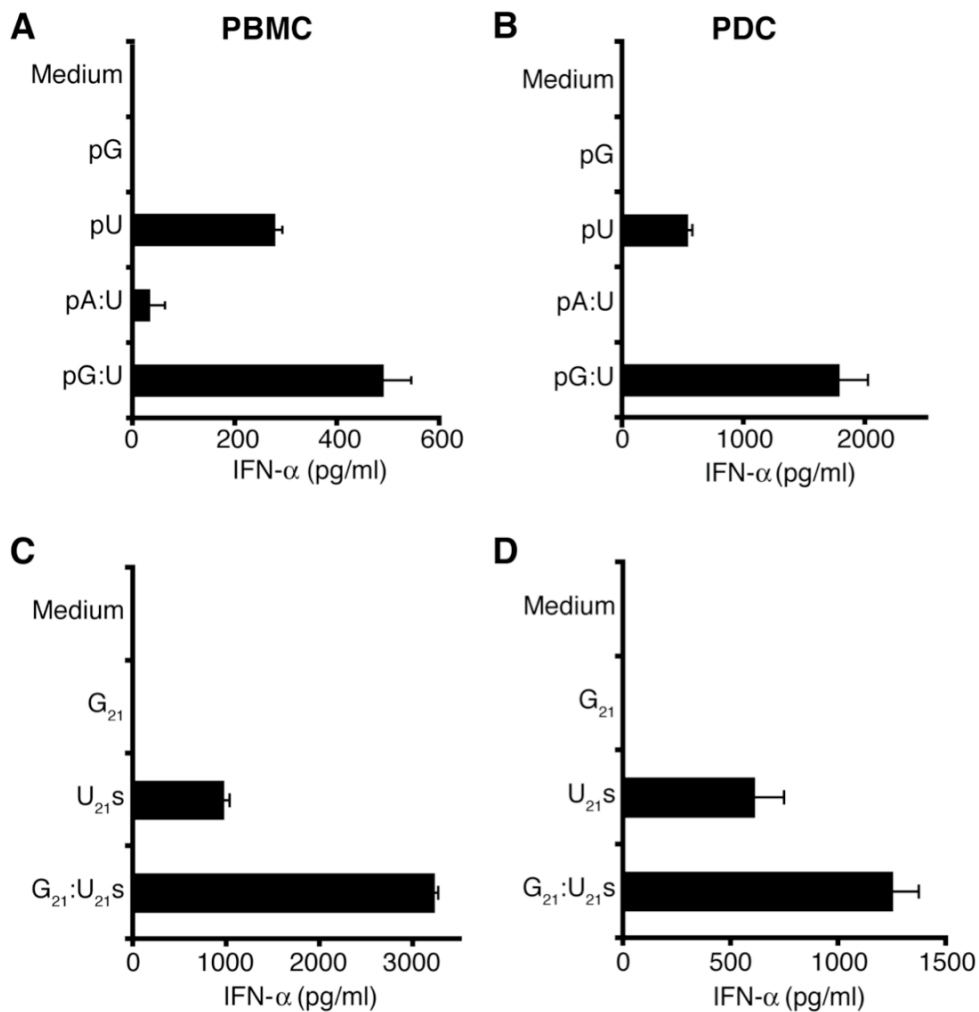
In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob und von welchen Nukleinsäurerezeptoren RNA-Sekundärstrukturen im Endosom der Immunzellen erkannt werden können.

#### **3.3.1 Erkennung langer Doppelstrang-RNA durch endosomale TLRs**

Zur Untersuchung der Erkennung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) im Endosom der Zelle wurden verschiedene RNAs mit Poly-l-Arginin komplexiert. Dadurch wurde die Aufnahme in das Endosom begünstigt und eine Erkennung der Nukleinsäuren über endosomale Rezeptoren ermöglicht. Zunächst sollten humane PBMC mit ssRNA und dsRNA stimuliert werden. Die dsRNAs pA:U und pG:U – sowie di

ssRNAs pG und pU zur Kontrolle – wurden zur Stimulation verwendet. 20 h nach der Stimulation wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. Es zeigte sich, dass pA:U in PBMC, komplexiert mit Poly-I-Arginin, nur sehr wenig IFN- $\alpha$  induzierte (Abbildung 3.10 A). Dagegen führte die Stimulation mit dem einzelsträngigen pU zur Produktion von signifikant höheren Mengen IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.10 A). pG alleine induzierte kein IFN- $\alpha$ , jedoch wurde überraschenderweise die stimulatorische Aktivität von pU durch Hybridisierung von pG an pU deutlich verstärkt (Abbildung 3.10 A). Es sollte geprüft werden ob die PDC in der Mischpopulation der PBMC für die IFN- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit pU und pG:U verantwortlich waren. Dazu wurden PDC aus PBMC isoliert und mit Poly-I-Arginin komplexierter RNA stimuliert. Als Stimuli wurden erneut dsRNAs (pA:U und pG:U) und ssRNAs (pG und pU) verwendet. Es zeigte sich, dass auch in PDC nach der Stimulation von pU IFN- $\alpha$  produziert wurde und die Menge IFN- $\alpha$  deutlich verstärkt wurde, wenn vor der Stimulation ein pG-Strang an den pU-Strang hybridisiert wurde (Abbildung 3.10 B). Weder pG alleine noch dsRNA pA:U induzierte IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.10 B). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die beobachtete IFN- $\alpha$ -Induktion durch pU und pG:U in den PBMC auf die Erkennung durch die PDC zurückzuführen war.

Es stellte sich die Frage, ob dieser Effekt nur für lange G:U-Doppelstränge zu beobachten war, oder ob auch 21 nt lange G:U-dsORNs die durch das ORN U<sub>21</sub> induzierte Menge IFN- $\alpha$  verstärkten. In vergangenen Studien zeigten Diebold et al., dass ein 21 nt langes ORN, bestehend aus 21 Uridinnukleotiden und Thiophosphatbindungen (U<sub>21</sub>s), ausreichend für eine Stimulation zur Produktion von IFN- $\alpha$  in PDC war [50]. So wurde U<sub>21</sub>s und das kurze Guanodin-ORN (21 nt) G<sub>21</sub> ausgewählt, um die stimulatorische Aktivität eines kurzen G:U-Doppelstrangs zu untersuchen. Zusätzlich zu dem Doppelstrang G<sub>21</sub>:U<sub>21</sub>s wurde G<sub>21</sub> und U<sub>21</sub>s alleine mit Poly-I-Arginin komplexiert und auf die Zellen gegeben. Die Bestimmung von IFN- $\alpha$  20 h nach der Stimulation zeigte, dass U<sub>21</sub>s sowohl in humanen PBMC (Abbildung 3.10 C) als auch in PDC (Abbildung 3.10 D) IFN- $\alpha$  induzierte. Die Hybridisierung von G<sub>21</sub> zusammen mit U<sub>21</sub>s zu einem G<sub>21</sub>:U<sub>21</sub>s-Doppelstrang verdoppelte die Menge des produzierten IFN- $\alpha$  in PBMC (Abbildung 3.10 C) und auch in den isolierten PDC (Abbildung 3.10 D). G<sub>21</sub> alleine dagegen war vollkommen inert und induzierte kein IFN- $\alpha$ .



**Abbildung 3.10: Die Produktion von IFN- $\alpha$  in humanen PBMC und PDC, induziert durch Stimulation mit pU, wird durch Hybridisierung von pG an pU verstärkt.**

Humane PBMC (A, C) oder PDC (B, D) wurden isoliert und mit 1  $\mu$ g/ml Poly-l-Arginin komplexierter RNA stimuliert. dsRNA wurde durch Hybridisierung der erforderlichen RNAs (pG, und pU, pA und pU, G<sub>21</sub>, und U<sub>21</sub>s) in gleichen Mengen (w/w) generiert. Die Bestimmung von IFN- $\alpha$  im Überstand erfolgte 20 h nach der Stimulation.

### 3.3.2 Einzelne G:U-Basenpaare verstärken die stimulatorische Aktivität von einzelsträngigem pU

Die Beobachtung, dass pG hybridisiert an pU (pG:U) die stimulatorische Aktivität von pU deutlich verbessert, war Gegenstand der Untersuchung. Es wurde festgestellt, dass die dsRNA pA:U, komplexiert mit Poly-l-Arginin, weder PBMC noch PDC (Abbildung 3.10 A, B) stimulieren konnte. Daher wurde angenommen, dass nicht alleine die bessere Stabilität eines Doppelstrangs im Vergleich zu einem Einzelstrang

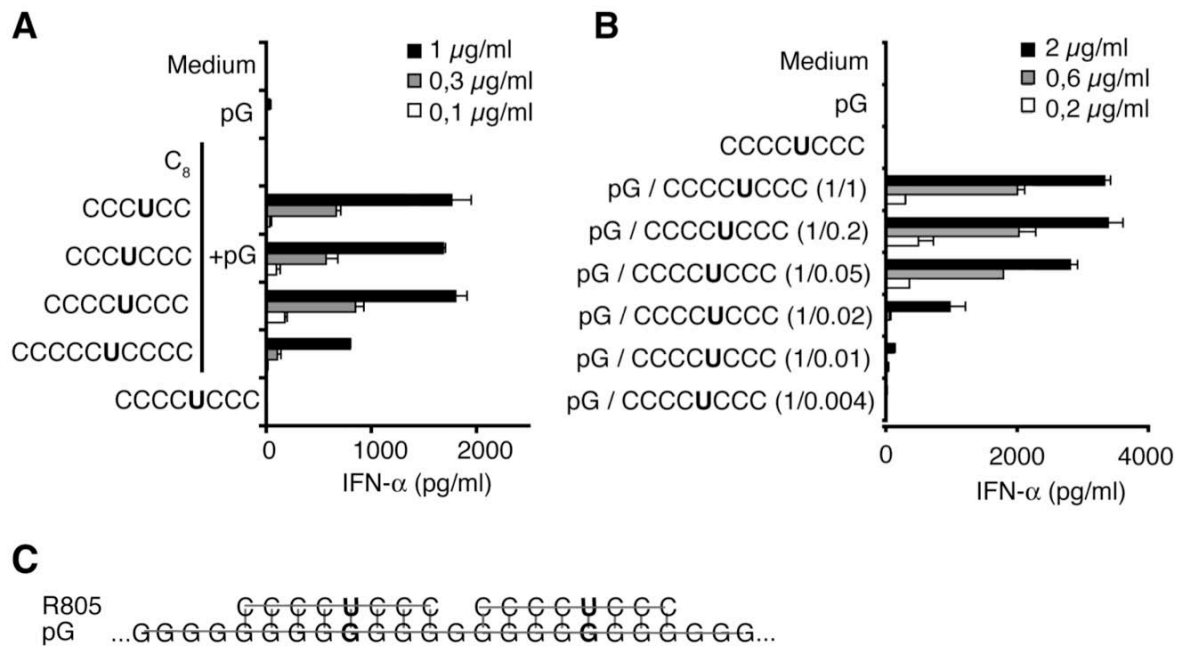
die höhere IFN- $\alpha$ -Produktion zur Folge hatte, sondern dass die Kombination aus Guanosin und Uridin die stimulatorische Aktivität beeinflusste. Daher sollte untersucht werden, ob die Erkennung einzelner G:U-Basenpaare eine Stimulation und daraufhin die Produktion von IFN- $\alpha$  zur Folge hatte. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden 21 nt lange Adenosin-reiche ORNs entworfen, die einzelne Uridinmonophosphate in ihrer Sequenz enthielten. Durch Hybridisierung von pU mit den Adenosin-reichen ORNs, die einzelne Guanosinnukleotide enthielten, entstanden neben A:U-Basenpaarungen einzelne G:U-Basenpaarungen in einer dsRNA (Abbildung 3.10 C). pU+A<sub>21</sub> bzw. pU+G<sub>21</sub> und die verschiedenen Einzelstränge dienten als Kontrolle. Humane PBMC wurden aufgereinigt und mit den RNAs, komplexiert mit Poly-l-Arginin, stimuliert. Ähnlich zu der Beobachtung, dass pA:U kaum stimulatorische Aktivität zeigte (Abbildung 3.10 A, B), wurde festgestellt, dass die Zugabe von A<sub>21</sub> zu pU die IFN- $\alpha$ -Produktion in humanen PBMC deutlich verringerte (Abbildung 3.11 A). Dagegen wurde die stimulatorische Aktivität von pU durch Hybridisierung von G<sub>21</sub> verstärkt (Abbildung 3.11 A). Das Einbringen einzelner Guanosinmonophosphate in eine 21 nt lange Adenosin-reiche RNA und die Hybridisierung an pU verstärkte – ähnlich wie G<sub>21</sub> – die Aktivität von pU (Abbildung 3.11 A). Alle 21 nt langen ssRNAs waren alleine vollkommen inert und induzierten kein IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.11 A).

Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass einzelne G:U-Basenpaare in doppelsträngigen Bereichen die IFN- $\alpha$ -Induktion durch pU alleine deutlich verstärken. Es sollte untersucht werden, ob die Erkennung der G:U-Basenpaare von der Länge der „Stem“-Strukturen abhängt. Daher wurden Adenosin-reiche ORNs entworfen, die jeweils ein mittiges Guanosin enthielten und deren Länge variierte (8 nt, 12 nt, 14 nt, 16 nt und 21 nt). Die Adenosin-reichen ORNs wurden mit pU im gleichen Verhältnis (w/w) zusammengegeben. Zusätzlich wurden A<sub>8</sub> und A<sub>21</sub> als Kontrolle an pU hybridisiert. Die dsRNAs und als Kontrolle pU sowie die einzelnen ORNs wurden mit Poly-l-Arginin komplexiert und auf humane PBMC gegeben. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. Es zeigte sich, dass ORNs, die ein Guanosin enthielten, hybridisiert an pU längenabhängig eine große Menge IFN- $\alpha$  induzierten (Abbildung 3.11 B). Die erforderliche Mindestlänge der ORNs zur Induktion von IFN- $\alpha$  durch Hybridisierung an einen pU-Strang der kurzen Adenosin-reichen ORNs lag bei 12 nt. Eine 8 nt lange Adenosin-RNA mit einem mittigen Guanosin war nicht mehr in der Lage hybridisiert an pU IFN- $\alpha$  zu induzieren (Abbildung 3.11 B). Dies könnte auf eine zu schwache Bindungsenergie des kurzen Adenosin-reichen ORNs an pU zurückzuführen sein. Ist die Bildung eines Doppelstranges nicht gewährleistet, so



stimulatorisch sind. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Erkennung von G:U-Basenpaaren in dsRNA alleine ausreichend ist, IFN- $\alpha$  in PBMC zu induzieren, oder ob für eine Stimulation zusätzlich pU erforderlich ist. Um die dsRNA herzustellen, sollte als lange ssRNA pG verwendet werden, das in vorherigen Experimenten gegenüber der IFN- $\alpha$ -Induktion als inert befunden wurde (Abbildung 3.10). Als teilkomplementäre ssRNA wurden ORNs bestehend aus Cytidin und einem mittigen Uridin gewählt. Für diese Cytidin-reichen ORNs mit dem mittigen Uridin wurden verschiedenen Längen (6 nt, 7 nt, 8 nt und 10 nt) verwendet. Es wurde angenommen, dass kurze Cytidin-reiche ORNs an pG binden können, da die Bindungsaktivität zwischen Guanosin und Cytidin aufgrund von drei Wasserstoffbrückenbindungen stärker ist als die Bindungsaktivität zwischen Adenosin und Uridin (zwei Wasserstoffbrückenbindungen). In den hybridisierten dsRNAs entstanden einzelne G:U-Basenpaare in einer Umgebung von G:C-„Stem“-Strukturen. Humane PBMC wurden mit diesen dsRNAs, komplexiert mit Poly-l-Arginin, stimuliert. Als Negativkontrolle diente dsRNA, generiert aus dem ORN C<sub>8</sub> hybridisiert an pG, die zusammen kein G:U-Basenpaar ausbilden konnten. Zusätzlich wurden die Einzelstränge pG und ein 8 nt langes Cytidin-ORN mit einem mittigen Uridin, komplexiert mit Poly-l-Arginin, auf die humanen PBMC gegeben. Es zeigte sich, dass G:U-Basenpaare auch in einer Umgebung von G:C-„Stem“-Strukturen humane PBMC zur Sekretion von IFN- $\alpha$  stimulierten (Abbildung 3.12 C). Diese Ergebnisse zeigten, dass G:U-Basenpaare alleine in einer nicht stimulierenden Umgebung ausreichend sind, PBMC zur Sekretion von IFN- $\alpha$  zu stimulieren (Abbildung 3.12 C).

Für die Herstellung der Doppelstränge wurden bisher identische Quantitäten (w/w) der beiden ssRNAs zusammengegeben. Daher lag vermutlich bisher der größte Teil der RNAs doppelsträngig vor. Wird eine 8 nt lange Cytidin-RNA mit einem zentralen Uridin (CCCCUCCC, im Folgenden R805 genannt) an einen pG-Strang hybridisiert, entstehen aufgrund der gleichen Mengenverhältnisse (w/w) der ssRNAs eine große Anzahl G:U-Basenpaarungen (etwa jedes 8. Basenpaar). Um zu untersuchen, ob auch selten auftretende G:U-Basenpaare ausreichen Zellen zu stimulieren, wurde das Verhältnis R805 zu pG titriert (Abbildung 3.12 D). Es wurde beobachtet, dass ein Verhältnis von pG zu R805 von 1:0,05 noch sehr aktiv zur Induktion von IFN- $\alpha$  in humanen PBMC war (Abbildung 3.12 D). In einer in diesem Verhältnis generierten RNA sollte nur ein Zwanzigstel der pG-RNA doppelsträngig sein und etwa in jeder 160. Base ein G:U-Basenpaar auftreten.



**Abbildung 3.12: G:U-Basenpaare induzieren IFN- $\alpha$  in einer nicht stimulierenden Umgebung.**

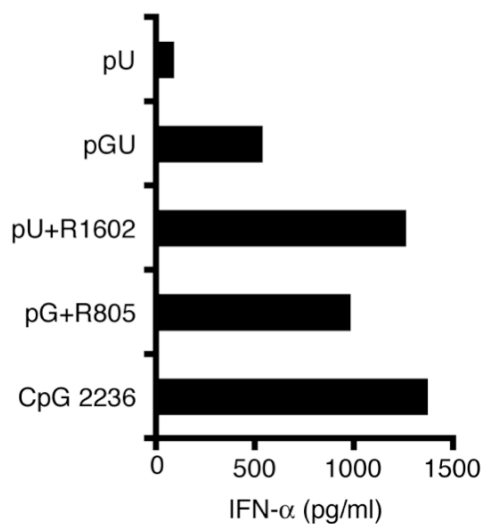
(A) Zu einem langen pG-Strang wurden kurze ORNs (6 nt bis 10 nt) gegeben. Die verwendeten kurzen ORNs waren Cytidin-reiche ORNs mit mittigem Uridin und als Kontrolle das ausschließlich aus Cytidinnukleotiden bestehende ORN  $C_8$ . Durch Zusammengabe entstanden dsRNAs, die entweder nur G:C-Basenpaarungen besaßen (pG+ $C_8$ ), oder die neben G:C-Basenpaarungen einzelne G:U-Basenpaarungen ausbildeten. Humane PBMC wurden mit 1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,3  $\mu\text{g/ml}$  oder 0,1  $\mu\text{g/ml}$  RNA stimuliert und nach 20 h Inkubation wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. (B) 8 nt lange ssRNA (CCCCUCCC; R805) wurde zu einer langen pG-RNA titriert. Das Verhältnis von pG zu R805 variierte (1/1; 1/0,2; 1/0,05; 1/0,02; 1/0,01; 1/0,004; w/w). 2  $\mu\text{g/ml}$ , 0,6  $\mu\text{g/ml}$  oder 0,2  $\mu\text{g/ml}$  RNA wurde mit Poly-l-Arginin komplexiert und in den Zellkulturüberstand gegeben. Nach 20 h wurde die Menge IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. (C) zeigt eine Teilsequenz der dsRNA pG+R805. An einen langen pG-Strang können mehrere R805-ORNs binden. Dadurch entstehen neben G:C-Basenpaaren einzelne G:U-Basenpaare.

### 3.3.4 Die Erkennung von G:U-Basenpaaren durch murine Flt3-L-PDC

Bisher wurde gezeigt, dass G:U-Basenpaare sowohl humane PBMC wie auch humane PDC stimulieren können. Unbekannt war jedoch, welcher Rezeptor verantwortlich für die Erkennung war. Um diesen eindeutig herauszufinden, ist es notwendig, Zellen gendefizienter Mäuse zu untersuchen. Daher sollte zunächst nachgewiesen werden, ob die stimulatorische Aktivität der G:U-Basenpaare auch in murinen Zellen zu beobachten war, und ob diese nach einer Stimulation IFN- $\alpha$  produzierten. Daher wurden Flt3-L-PDC aus Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen gewonnen. Diese Zellen wurden mit Dotap komplexierter RNA stimuliert. Die



Komplexierung der RNA mit Dotap ermöglicht eine Aufnahme der RNA in das Endosom, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die RNA zusätzlich in das Zytosol der Zelle gelangt. Die Bestimmung von IFN- $\alpha$  in den Überständen 20 h nach der Stimulation zeigte, dass pU alleine IFN- $\alpha$  in murinen PDC induzierte. Die stimulatorische Aktivität wurde – wie schon in humane Zellen beobachtet – durch die Hybridisierung eines pG-Strangs deutlich verstärkt (Abbildung 3.13). Auch einzelne G:U-Basenpaare (pG+R805 und pU+R1602) wurden von murinen PDC erkannt und induzierten die Produktion von IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.13). Als Kontrolle wurden die murinen PDC mit CpG 2336 stimuliert, das die Zellen ebenfalls zur Sekretion von IFN- $\alpha$  stimuliert.



**Abbildung 3.13: Die Erkennung von G:U-Basenpaaren induziert IFN- $\alpha$  in murinen Flt3-L-PDC.**

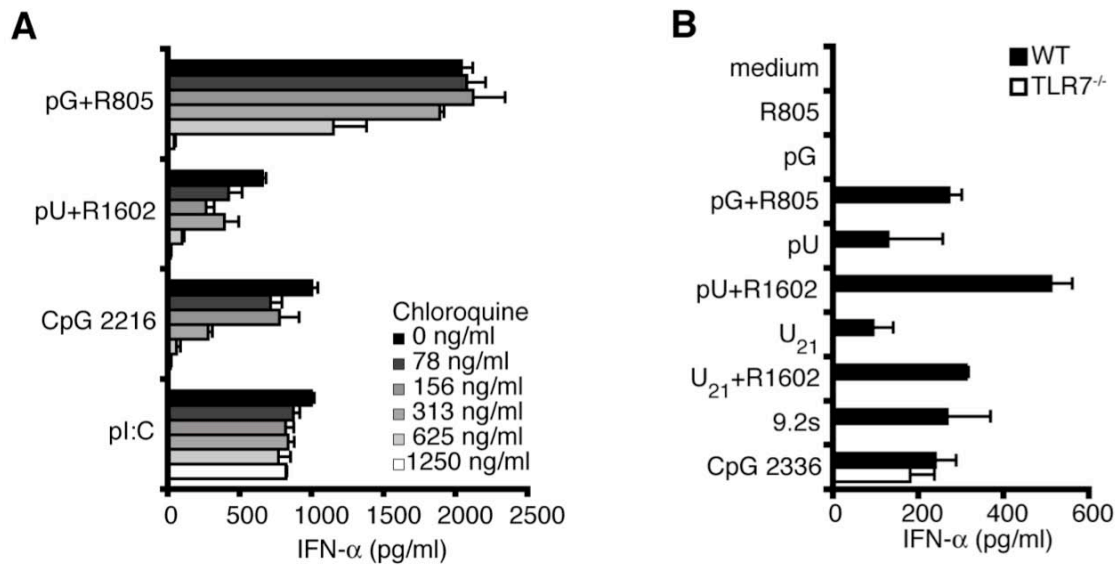
PDC wurden aus Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen mit Zugabe von Flt3-L generiert und mit 1  $\mu$ g/ml ssRNA, dsRNA bzw. CpG 2236 stimuliert. RNA sowie CpG-ODN wurden mit Dotap komplexiert. dsRNA (pG+pU, pU+R1602 und pG:U) wurde durch die Hybridisierung gleicher Mengen zweier ssRNAs (w/w) generiert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt.

### 3.3.5 G:U-Basenpaare werden über TLR7 erkannt

Es stellte sich die Frage, durch welchen Mechanismus G:U-Basenpaare in „Stem“-Strukturen erkannt werden und IFN- $\alpha$  in PDC bzw. PBMC induzieren. Die G:U-Basenpaare enthaltenden dsRNAs wurden bislang mit Poly-l-Arginin oder Dotap komplexiert, wodurch die Aufnahme in die Endosomen der Zellen ermöglicht wird. Daher wurde vermutet, dass die Erkennung der G:U-Basenpaare endosomal stattfindet. Die Erkennung von Nukleinsäuren im Endosom der Zellen kann mit Chloroquin blockiert werden, da Chloroquin die Ansäuerung der Endosomen verhindert und somit die Funktionalität der Rezeptoren inhibiert. Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Erkennung der G:U-Basenpaare endosomal stattfindet, wurden humane PBMC 30 min vor der Stimulation mit verschiedenen Mengen Chloroquin bzw. ohne Chloroquin inkubiert. Die Zellen wurden mit pG+R805 oder pU+R1602 und als Kontrolle mit CpG 2216 und pl:C stimuliert. CpG 2216 wird über

den TLR9 erkannt und induziert in PDC die Produktion von IFN- $\alpha$  [169]. Da TLR9 im Endosom der PDC lokalisiert ist, wird diese Erkennung durch Chloroquin blockiert. Dagegen stimuliert pl:C den zytosolischen Rezeptor MDA-5 [6]. Die Erkennung von pl:C sollte also durch Chloroquin nicht beeinträchtigt werden. Die produzierte Menge IFN- $\alpha$  20 h nach der Stimulation zeigte, dass die Erkennung von CpG-ODNs und die Erkennung der G:U-Basenpaare (pG+R805 und pU+R1602) durch steigende Mengen Chloroquin inhibiert wird (Abbildung 3.14 A). Eine Konzentration von 1250 ng/ml Chloroquin verhinderte die Erkennung der G:U-Basenpaare vollständig, doch die IFN- $\alpha$  Produktion der pl:C-stimulierten Zellen wurde nicht beeinträchtigt (Abbildung 3.14 A). Dadurch wurde gezeigt, dass die Erkennung der G:U-Basenpaare ausschließlich endosomal stattfindet.

Da die Erkennung von G:U-Basenpaaren sowohl in PBMC als auch in PDC beobachtet wurde, mussten humane PDC den für die Erkennung zuständigen Rezeptor exprimieren. PDC exprimieren im Endosom TLR7 und TLR9 als Nukleinsäure-detektierende Rezeptoren [26, 28]. Da TLR9 DNA (CpG-DNA) detektiert, wurde dieser Rezeptor für die Erkennung der G:U-Basenpaare ausgeschlossen. Es wurde vermutet, dass zusätzlich zu der TLR7-abhängigen Erkennung von ssRNA TLR7 G:U-Basenpaare erkennen kann. Zuvor zeigten Experimente, dass G:U-Basenpaare murine Flt3-L-PDC zur IFN- $\alpha$ -Sekretion stimulieren können (Abbildung 3.13). Daher wurden Flt3-L-PDC aus Knochenmarkszellen von Wildtyp- und von TLR7<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert. Diese wurden mit dsRNAs, die G:U-Basenpaarungen enthielten, stimuliert. Als Kontrolle diente die isRNA 9.2s, die über TLR7 erkannt wird [48], und der TLR9-Ligand CpG 2336. Wie schon von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet [50], wurde beobachtet, dass pU und U<sub>21</sub> TLR7-abhängig erkannt wird und IFN- $\alpha$  induziert (Abbildung 3.14 B). Die Hybridisierung von R1602 an pU verstärkte die IFN- $\alpha$ -Produktion. Im Vergleich zu der ssRNA pU, die Aktivierung war jedoch weiterhin abhängig von TLR7. Gleiche Ergebnisse zeigte die Stimulation mit pG+R805. Auch hier wurde kein IFN- $\alpha$  in den TLR7-defizienten PDC induziert (Abbildung 3.14 B). CpG-DNA wurde gleichermaßen in Wildtyp- und TLR7<sup>-/-</sup>-Flt3-L-PDC erkannt und induzierte IFN- $\alpha$ . Damit war die Funktionalität der TLR7<sup>-/-</sup>-PDC nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von G:U-Basenpaarungen im Endosom stattfindet und abhängig von TLR7 ist.



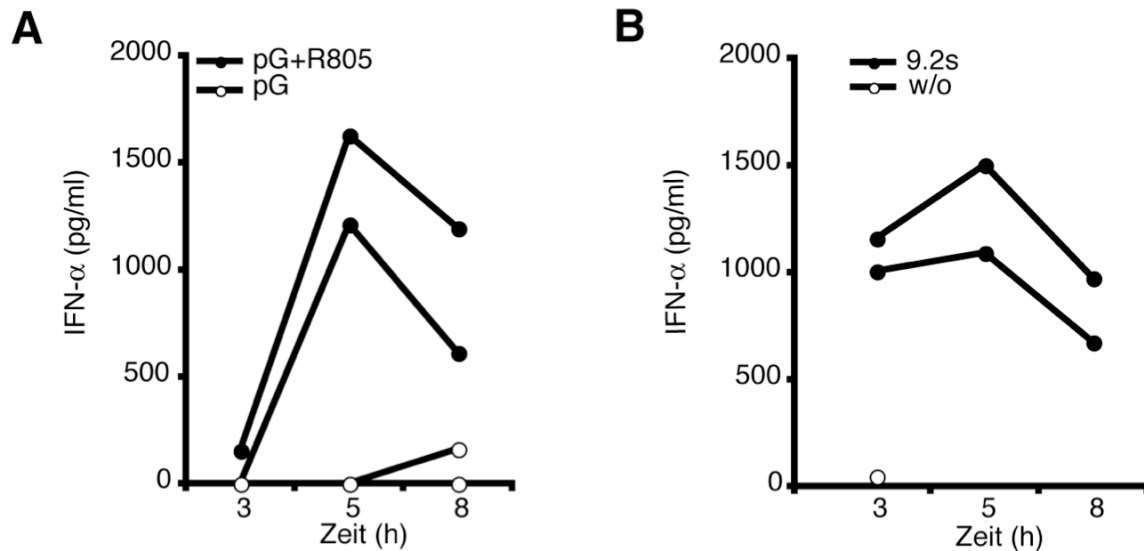
**Abbildung 3.14: Die Erkennung von G:U-Basenpaaren in einer RNA „Stem“-Struktur ist abhängig von TLR7.**

(A) Humane PBMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen Chloroquin (0 ng/ml, 78 ng/ml, 156 ng/ml, 313 ng/ml, 625 ng/ml, 1250 ng/ml) 30 min vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ g/ml pG+R805 und pU+R1602, komplexiert mit Poly-l-Arginin, stimuliert. Als Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit CpG 2216 stimuliert oder mit pl:C transfiziert. (B) Flt3-L-PDC von Wildtyp- oder TLR7<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit 2  $\mu$ g/ml ssRNA oder dsRNA, komplexiert mit Dotap, stimuliert. Als Kontrolle diente der TLR9-Ligand CpG 2336 (3  $\mu$ g/ml) bzw. die isRNA 9.2s (komplexiert mit Dotap, 2  $\mu$ g/ml), die über TLR7 erkannt wird. (A,B) Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand mit (A) dem humanen oder (B) dem murinen ELISA gemessen.

### 3.3.6 pG+805 induziert *in vivo* die Produktion von IFN- $\alpha$

Die Erkennung von G:U-Basenpaaren über TLR7 könnte bei einer viralen Infektion von großer Wichtigkeit sein. Um die *in vivo*-Relevanz für die Erkennung von G:U-Basenpaaren zu untersuchen und die Funktionalität zu bestätigen, wurde Wildtyp-Mäusen pG+R805 oder pG im Komplex mit Dotap injiziert (Abbildung 3.15 A). Nach 3, 5 oder 8 h wurde den Mäusen Blut entnommen und das IFN- $\alpha$  im Serum gemessen. Es wurde beobachtet, dass 5 h nach der Injektion von pG+R805 große Mengen IFN- $\alpha$  im Serum nachgewiesen werden konnten (1200-1700 pg/ml). Die IFN- $\alpha$ -Konzentration im Serum verringerte sich anschließend, sodass 8 h nach der Injektion der IFN- $\alpha$ -Spiegel im Serum auf 500-1200 pg/ml gesunken war. Zum Vergleich wurde Wildtyp-Mäusen ein herkömmlicher TLR7-Ligand (isRNA 9.2s), komplexiert mit Dotap, injiziert. 3 h nach der Injektion von isRNA 9.2s wurde IFN- $\alpha$  im Serum nachgewiesen (Abbildung 3.15 B). Die IFN- $\alpha$ -Konzentrationen im Serum

stiegen 5 h nach der Injektion auf Werte zwischen 1000 und 1500 pg/ml und fielen dann zeitabhängig auf Werte zwischen 500 und 1000 pg/ml (Abbildung 3.15 B). Wildtyp-Mäusen, denen pG, komplexiert mit Dotap, injiziert wurde oder die unbehandelt blieben, produzierten kein IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.15 A, B).



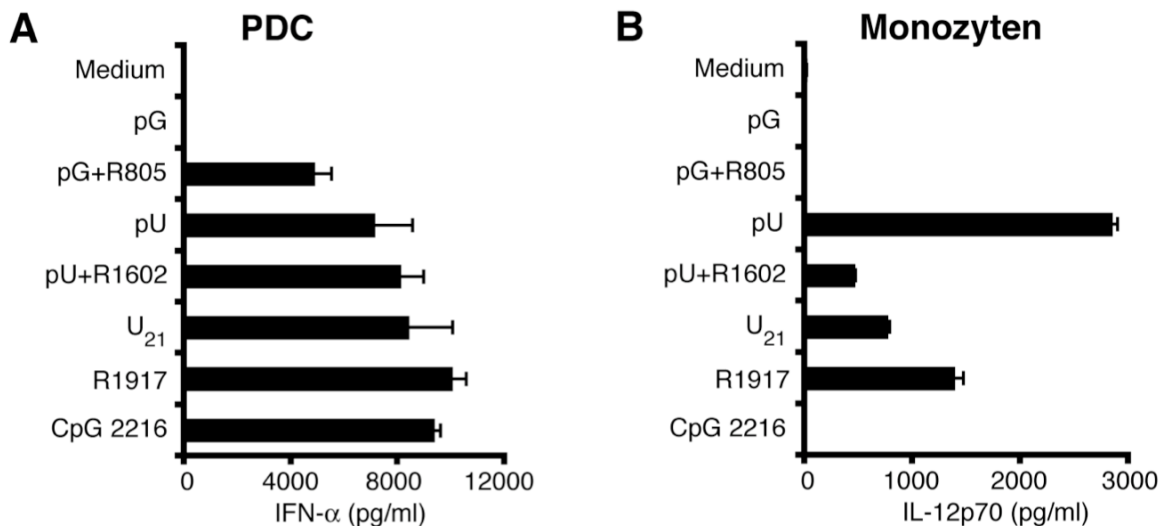
**Abbildung 3.15:** *In vivo*-Erkennung von G:U-Basenpaaren.

Wildtyp-Mäusen wurden jeweils entweder 25  $\mu$ g (A) pG, pG+R805 oder (B) isRNA 9.2s, komplexiert mit Dotap, i.v. injiziert. Serum von den behandelten und zur Kontrolle von unbehandelten Mäusen wurde 3, 5 und 8 h nach der Injektion entnommen und IFN- $\alpha$  im Serum mit dem murinen IFN- $\alpha$  ELISA bestimmt.

### 3.3.7 G:U-Basenpaaren werden in humanen Immunzellen selektiv über TLR7 erkannt

Durch Experimente mit murinen, TLR7-defizienten PDC konnte gezeigt werden, dass G:U-Basenpaare TLR7-abhängig IFN- $\alpha$  induzieren. Durch diesen Versuch konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass nicht zusätzlich eine TLR8-Aktivierung stattfindet, da der TLR8 in Mäusen inaktiv ist [27]. Viele GU-reiche ssRNAs stimulieren sowohl TLR7 als auch TLR8 [47], wodurch nach Stimulation mit diesen Liganden in humanen PBMC sowohl TLR7-abhängig in PDC IFN- $\alpha$  als auch TLR8-abhängig in Zellen wie Monozyten IL-12p70 induziert wird. Es sollte untersucht werden, ob G:U-Basenpaare in „Stem“-Strukturen, zusätzlich zu TLR7, über TLR8 erkannt werden.

Um zwischen der Stimulation von TLR7 und TLR8 differenzieren zu können, wurden aus humanen PBMC PDC und Monozyten isoliert. Diese wurden mit den RNAs pG+R805, pU+R1602, pU, pG und U<sub>21</sub>, komplexiert mit Poly-l-Arginin, stimuliert. Als Kontrolle wurden die Stimulation durch bekannte TLR7/8- und TLR9-Liganden (R1917 und CpG 2216) untersucht. 20 h nach der Stimulation wurde in den Überständen der stimulierten PDC IFN- $\alpha$  nachgewiesen, in den Überständen der Monozyten wurde IL-12p70 gemessen. Bis auf pG induzierten alle Liganden die Produktion von IFN- $\alpha$  in den PDC (Abbildung 1.1A). Die TLR8-abhängige Produktion von IL-12p70 in Monozyten wurde weder durch pG+R805 noch durch CpG induziert, während nach Stimulation mit den anderen Stimuli IL-12p70 sezerniert wurde (Abbildung 3.16 B). Nach der Erkennung von pU in Monozyten wurden große Mengen IL-12p70 produziert. Wurde R1602 an den pU-Strang hybridisiert, war die entstandene Menge IL-12p70 deutlich geringer. Da neben doppelsträngigen Bereichen bei der RNA pU+R1602 vermutlich noch begrenzte Anteile von pU einzelsträngig vorliegen, könnten diese für die TLR8-abhängige IL-12p70 Produktion zuständig sein. U<sub>21</sub> wie auch die bekannte TLR7/8-stimulierende ssRNA R1917 induzierten ebenfalls die Produktion von IL-12p70 in den Monozyten. CpG-ODNs können in bestimmten murinen Zellen neben IFN- $\alpha$  IL-12p70 induzieren, doch im humanen System ist der TLR9 sehr viel restringierter exprimiert und induziert in PDC hauptsächlich die Produktion von IFN- $\alpha$ . Die Produktion von IL-12p70 in humanen Monozyten wird, wie in Abbildung 3.16 B bestätigt, nicht durch CpG-ODN induziert. Diese Ergebnisse zeigten, dass einzelne G:U-Basenpaare, auch wenn die RNA ansonsten nicht stimulatorisch war, selektiv TLR7 stimulieren und dadurch IFN- $\alpha$  induzieren, wohingegen TLR8 nicht aktiviert wird und kein IL-12p70 in entsprechenden Zellen produziert wird.



**Abbildung 3.16: G:U-Basenpaare aktivieren selektiv TLR7.**

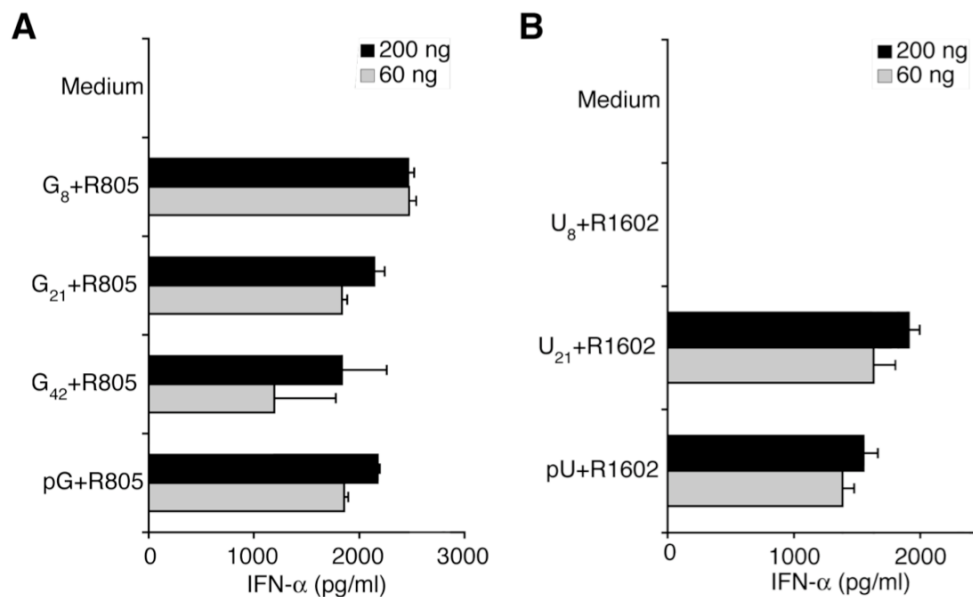
Humane PDC (A) oder humane Monozyten (B) wurden mit 1  $\mu\text{g/ml}$  ssRNA, pG, pG+R805, pU, pU+R1602 und U<sub>21</sub> stimuliert. Als Kontrolle diente der TLR9-Ligand CpG 2216 sowie der TLR7/8-Ligand R1917. Nukleinsäuren wurden zur Stimulation mit Poly-l-Arginin komplexiert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand der PDC gemessen (A); im Überstand der Monozyten wurde IL-12p70 bestimmt.

### 3.3.8 G:U-Basenpaare in kurzen doppelsträngigen ORNs induzieren IFN- $\alpha$

Bisher wurde die stimulatorische Aktivität der G:U-Basenpaare nur im Kontext langer dsRNA untersucht (mit pU oder pG hergestellt). Vor diesem Hintergrund sollte nun zusätzlich geprüft werden, ob G:U-Basenpaare auch in kurzen doppelsträngigen ORNs erkannt werden. Basierend auf der Beobachtung, dass pG+R805 und pU+R1602 besonders geeignet zur Induktion von IFN- $\alpha$  waren, wurde die stimulatorische Aktivität kürzerer pG-Stränge (G<sub>42</sub>, G<sub>21</sub> und G<sub>8</sub>) zusammen mit R805 oder kürzere pU-Stränge (U<sub>21</sub> und U<sub>8</sub>) zusammen mit R1602 untersucht. Gleiche Mengen von pG, G<sub>42</sub>, G<sub>21</sub> und G<sub>8</sub> wurden mit R805 (w/w) zusammengegeben. Entsprechend wurde mit pU, U<sub>21</sub>, U<sub>8</sub> und R1602 kurze dsRNA generiert. PDC wurden aus humanen PBMC isoliert und die dsRNA mit Poly-l-Arginin zur Stimulation der PDC komplexiert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Es wurde deutlich, dass alle untersuchten Längen der pG-RNA zusammen mit R805 IFN- $\alpha$  in PDC induzierten (Abbildung 3.17 A). Dagegen konnten nur pU und U<sub>21</sub> zusammen mit R1602 IFN- $\alpha$  in PDC induzieren, die RNA U<sub>8</sub>+R1602 blieb inaktiv (Abbildung 3.17 B). Zwischen Uridin und Adenosin bilden sich zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus; die Bindung von Guanodin und Cytidin dagegen beruht auf drei Wasserstoffbrückenbindungen. Vermutlich ist die Bindung von dem ORN U<sub>8</sub> an

R1602 aufgrund der geringeren Anzahl Wasserstoffbrückenbindungen sehr schwach und nicht ausreichend, G:U-Basenpaare auszubilden.

Insgesamt zeigte dieser Versuch, dass weder ein langer pU- noch ein langer pG-Strang (beide etwa 5000 nt) für die Aktivierung von TLR7 durch G:U-Basenpaarungen notwendig ist. Kürzere ORNs, die G:U-Basenpaarungen ausbilden können, waren ausreichend für eine Stimulation.



**Abbildung 3.17: G:U-Basenpaare in doppelsträngigen ORNs induzieren IFN-α in PDC.**

PDC wurden aus humanen PBMC isoliert und mit dsRNA stimuliert. dsRNA wurde durch Zusammengabe der gleichen Mengen (w/w) R805 und pG in verschiedenen Längen (G<sub>8</sub>, G<sub>21</sub>, G<sub>42</sub> und pG) bzw. R1602 und verschiedene Längen pU (U<sub>8</sub>, U<sub>21</sub> und pU) generiert. dsRNA wurden mit Poly-L-Arginin komplexiert, um PDC zu stimulieren. Nach 20 h wurde IFN-α im Überstand gemessen. Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt.

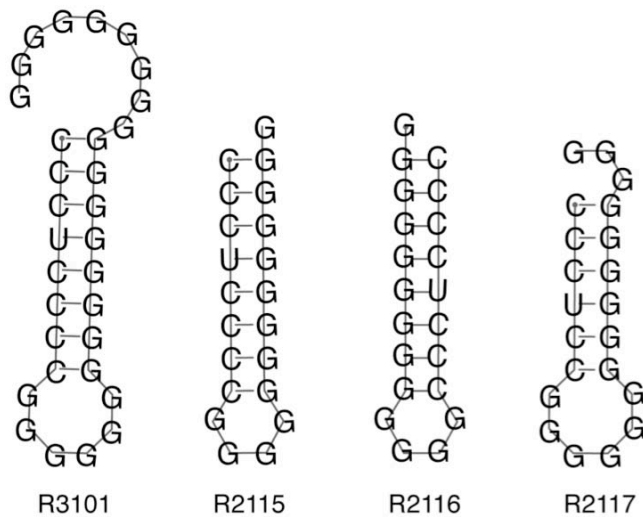
### 3.3.9 G:U-Basenpaare in doppelsträngigen Bereichen kurzer „Hairpin“-Strukturen stimulieren TLR7

Auf Basis der bisher publizierten ORNs, die sowohl TLR7 als auch TLR8 stimulieren, und der in dieser Arbeit gefundenen langen TLR7-stimulierenden dsRNA, sollte untersucht werden, ob auch einzelne ORNs in der Lage sind, durch Bildung von G:U-Basenpaaren in einer „Hairpin“-Struktur TLR7 selektiv zu stimulieren. Dazu wurden zunächst zwei kurze ORNs zusammengegeben (G<sub>21</sub> und R805), die, wie in Abbildung 3.17 gezeigt, in PDC IFN-α induzieren konnten. Zusätzlich wurde die Sequenz eines ORNs entworfen, das am 5'-Ende eine G<sub>21</sub>-Sequenz und am 3'-Ende die R805-

Sequenz besaß. Diese Sequenz (R3101) enthielt mittig zwei zusätzliche Guanosinmonophosphate, sodass die Länge (31 nt) ausreichend sein sollte, einen „Hairpin“ zu bilden, bei dem in der „Stem“-Struktur neben den G:C-Basenpaaren ein G:U-Basenpaar auftrat (Abbildung 3.18). Mit den ORNs G<sub>21</sub>+R805, R3101 und zusätzlich mit U<sub>21</sub>, G<sub>21</sub> und R805 wurden PDC (Abbildung 3.19 A) und Monozyten (Abbildung 3.19 B) stimuliert. Es wurde beobachtet, dass in PDC IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit U<sub>21</sub> und pG+R805 produziert wurde, jedoch ausschließlich die Stimulation von U<sub>21</sub> in Monozyten zur Produktion von IL-12p70 führte. Die Stimulation von PDC und Monozyten mit dem ORN R3101 zeigte, dass eine selektive TLR7-Stimulation mit einem kurzen ORN, das G:U-Basenpaare in einer nicht stimulatorisch aktiven Umgebung durch „Hairpin“-Strukturen ausbilden konnte, möglich war (Abbildung 3.18 A, B).

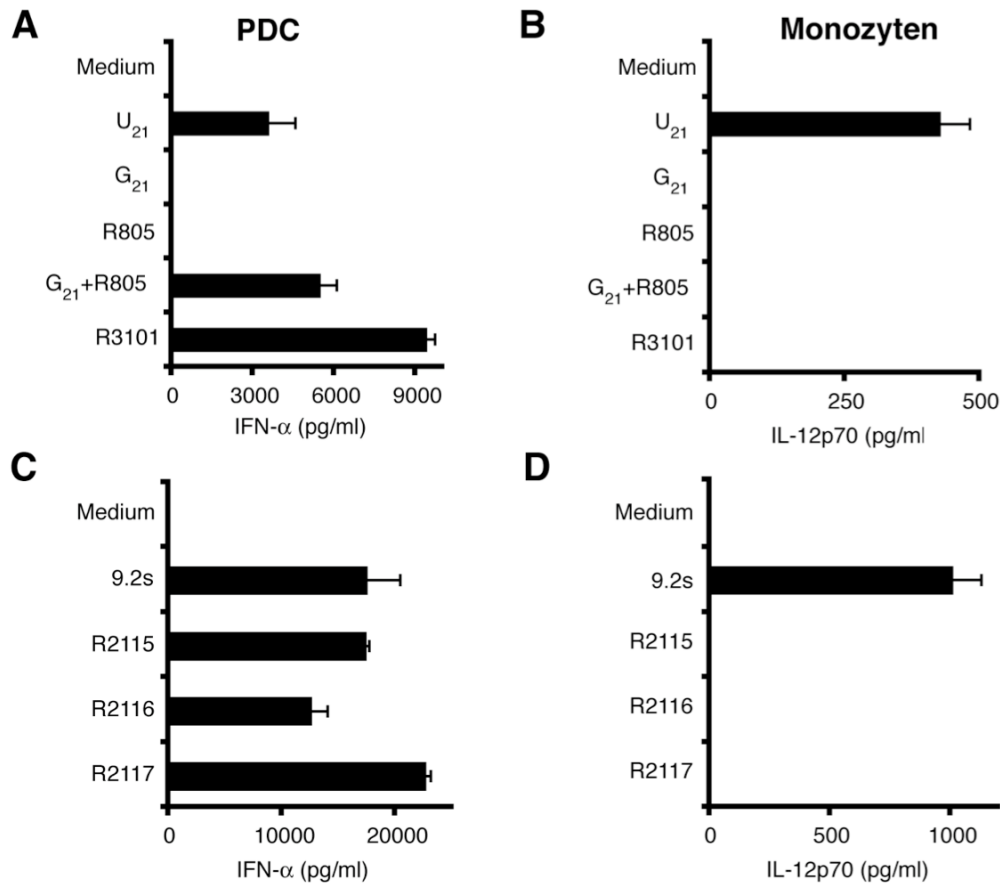
Die Länge vieler isRNAs beträgt zwischen 19 und 21 nt. Daher sollte die ssRNA R3101 auf 21 nt verkürzt werden. Dazu wurden ORNs getestet, die eine Gesamtlänge von 21 nt betragen bei denen das 8 mer CCCUCCC entweder am 5'-Ende (R2115) oder am 3'-Ende (R2116) des 13 nt-langen pG-Stranges war. Zusätzlich wurde die stimulatorische Aktivität eines verkürzten Cytidin-reichen 6 nt-langen ORN mit mittigem Uridin (CCCUCC) am 5'-Ende eines 15 nt-langen pG-Stranges (R2117) untersucht (Abbildung 3.18). Diese drei ORNs induzierten TLR7-abhängig IFN- $\alpha$  in PDC (Abbildung 3.19 C), induzierten aber kein IL-12p70 in Monozyten (Abbildung 3.19 D). Unabhängig davon, ob die Guanosin-reiche Sequenz am 5' oder am 3'-Ende lag, stimulierten diese ORNs somit selektiv TLR7. Als Kontrolle diente die isRNA 9.2s, die sowohl in PDC IFN- $\alpha$  als auch in Monozyten IL-12p70 induzierte und somit über TLR7 und TLR8 erkannt wurde (Abbildung 3.19 C, D).





**Abbildung 3.18: „Hairpin“-Strukturen kurzer ORNs.**

Die Sequenzen kurzer ORNs (31 nt: R3101 oder 21 nt: R2115, R2116, R2117) wurden hinsichtlich der sekundären „Hairpin“-Strukturen entworfen. Die Abbildung zeigt die Sekundärstruktur der ORNs, die mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der Minimierung der freien Energie auftreten. In der „Stem“-Struktur der ORNs bildet sich jeweils ein G:U-Basenpaar aus. „Loops“ formen sich aus entweder 6 Guanosinnukleotiden oder 4 Guanosinnukleotiden. Sekundärstrukturen wurden mit RNAfold erstellt (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) und anschließend bearbeitet.



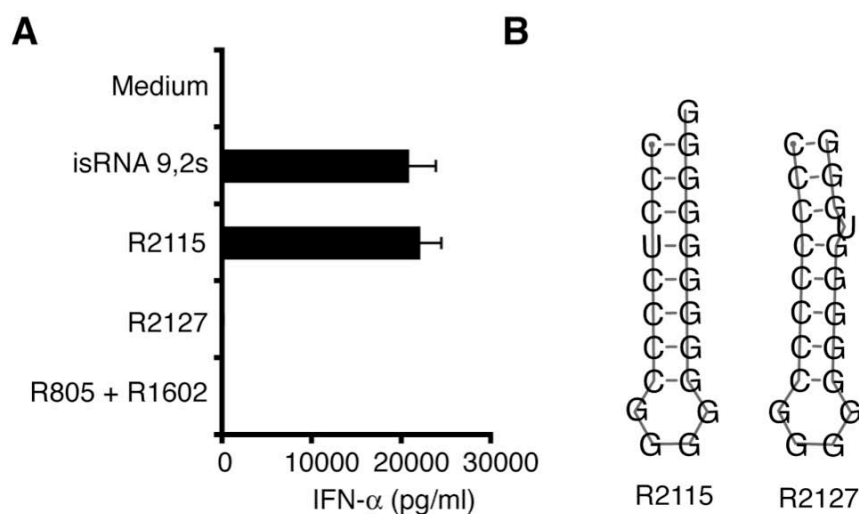
**Abbildung 3.19: G:U-Basenpaare in „Hairpin“-Strukturen kurzer ORNs induzieren selektiv IFN- $\alpha$ .**

Humane PDC (A, C) oder humane Monozyten (B, D) wurden mit verschiedenen RNAs stimuliert. Dazu wurde 1  $\mu\text{g/ml}$  G<sub>21</sub>+R805 (A, B) oder kurze ssRNAs (21mer - 31mer) mit Poly-l-Arginin komplexiert und auf die Zellen gegeben (A-D). Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  (A, C) bzw. IL-12p70 (B, D) im Überstand bestimmt.

Bisher wurde beobachtet, dass G:U-Basenpaare spezifisch IFN- $\alpha$  nach TLR7-Stimulation induzieren. Es wurde jedoch noch nicht bewiesen, dass Guanosen und Uridin eine Basenpaarung in einer „Stem“-Struktur ausbilden müssen, um IFN- $\alpha$  zu induzieren. Daher stellte sich die Frage, ob alleine die Anwesenheit von Guanosen und Uridin ausreichend sei, PDC zur Sekretion von IFN- $\alpha$  zu stimulieren. Um dies zu beantworten, wurde R2127 im Vergleich zu R2115 auf seine stimulatorische Aktivität hin untersucht. R2127 war eine kurze RNA, die eine ähnliche Sequenz wie R2115 hatte. Jedoch lag das Uridinnukleotid bei R2127 nicht im Cytidin-reichen Teil des ORNs, sondern im Guanosen-reichen Teil. Dadurch wurde die Bildung von G:U-Basenpaaren in einer „Stem“-Struktur ausgeschlossen, obwohl Guanosen und Uridin in dem ORN vorkamen (Abbildung 3.20 B). Zusätzlich wurden R805 und R1602

zusammengegeben, die die Anwesenheit von Guanosen und Uridin versprachen, eine „Stem“-Struktur mit G:U-Basenpaaren jedoch auch hier ausschlossen.

Humane PDC wurden isoliert und mit R2115, R2127 und R805+R1602 stimuliert. Als Kontrolle diente die TLR7/8-stimulierende isRNA 9.2s. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass R2115 erneut viel IFN- $\alpha$  induzierte. Dagegen blieb das ORN R2127, das kein G:U-Basenpaar in einer „Hairpin“-Struktur ausbilden konnte, inaktiv. Es wurde deutlich, dass nicht alleine die Anwesenheit von Guanosen und Uridin zur Stimulation ausreichte, sondern dass tatsächlich die Ausbildung von G:U-Basenpaarungen in einer „Stem“-Struktur erforderlich war, um IFN- $\alpha$  in PDC zu induzieren (Abbildung 3.20 A).



**Abbildung 3.20: Die Anwesenheit von Guanosen und Uridin ist nicht ausreichend zur Stimulation von TLR7.**

(A) PDC wurden aus humanen PBMC isoliert und mit kurzen ORNs, komplexiert mit Poly-l-Arginin, stimuliert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. (B) zeigt die „Hairpin“-Strukturen von R2115 und R2127. Sekundärstrukturen wurden mit RNAfold erstellt (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) und anschließend bearbeitet.

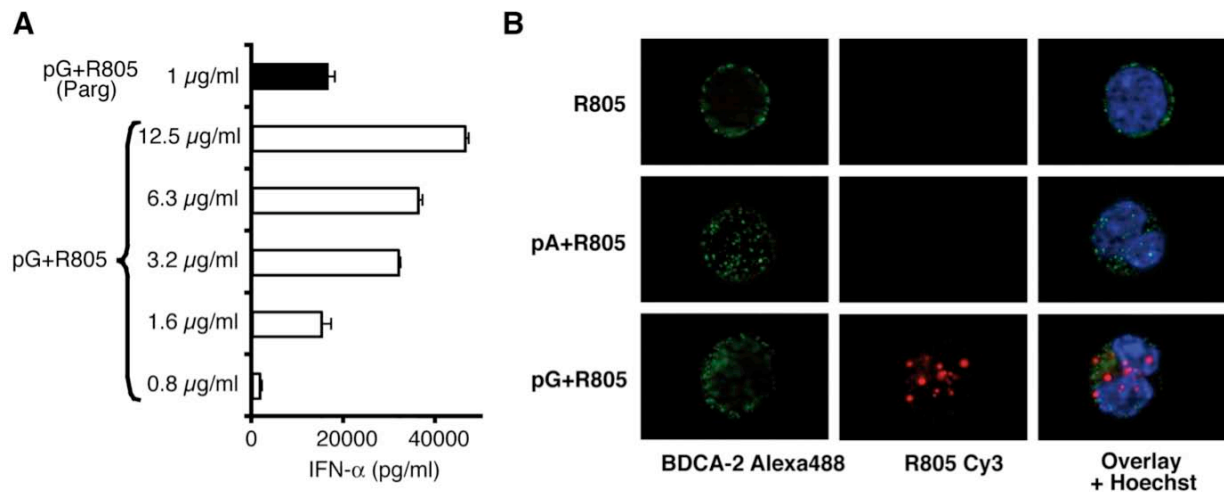
### 3.3.10 pG+R805 stimuliert humane PDC auch ohne Einsatz von Transfektionsreagenzien oder kationischen Peptiden

In bisherigen Studien wurde gezeigt, dass die Stimulation von TLR7 und TLR8 mit ORNs abhängig von der Komplexierung kationischer Peptide oder der Transfektion mit Transfektionsreagenzien ist [46-48]. Da RNA ständig RNAsen ausgesetzt ist, wird insbesondere Phosphodiester-RNA leicht degradiert. Auch kann RNA leicht durch

alkalische Hydrolyse zerstört werden. Transfektionsreagenzien und kationische Peptide schützen die RNA vor der Degradation und erleichtern die Aufnahme der ORNs. Es sollte untersucht werden, ob die dsRNA pG+R805 auch ohne Poly-l-Arginin IFN- $\alpha$  in PDC induzieren kann.

Dazu wurden PDC entweder mit Poly-l-Arginin komplexiertem pG+R805 stimuliert oder die „nackte“ dsRNA wurde in verschiedenen Konzentrationen in den Überstand der PDC gegeben. Die IFN- $\alpha$ -Produktion zeigte, dass sich PDC mit pG+R805 ohne kationisches Peptid oder Transfektionsreagenz stimulieren lassen. Schon kleine Mengen pG+R805 (1,6  $\mu\text{g/ml}$ ) induzierten vergleichbar viel IFN- $\alpha$  wie 1  $\mu\text{g/ml}$  pG+R805, komplexiert mit Poly-l-Arginin (Abbildung 3.21 A).

Um die Aufnahme von pG+R805 zu bestätigen, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht. Dazu wurden PDC aus humanen PBMC aufgereinigt und entweder Cy3-markiertes R805 (R805-Cy3, rot), pA+R805-Cy3 oder pG+R805-Cy3 (rot) in verschiedenen Konzentrationen in die Überstände der PDC gegeben. Nach 2,5 h wurden die PDC mit einem Anti-BDCA-2-spezifischen Antikörper markiert und mit einem Sekundärantikörper sichtbar gemacht (grün). Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). Die Zellen konnten R805-Cy3 alleine nicht aufnehmen. Auch die Zusammengabe eines beliebigen langen Einzelstranges (hier pA) konnte nicht zur Aufnahme der RNA beitragen. Wurde jedoch R805-Cy3 an pG hybridisiert, konnte die Cy3-markierte RNA in den Zellen aufgrund ihrer roten Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 3.21 B).



**Abbildung 3.21: Der „nackte“ TLR7-Ligand pG+R805 wird von humanen PDC ohne Komplexierung mit kationischem Peptid phagozytiert und induziert IFN- $\alpha$ .**

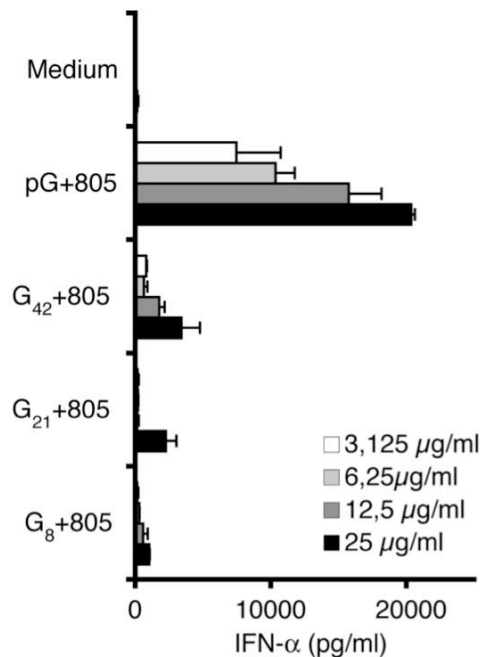
(A) Humane PDC wurden mit 1  $\mu$ g/ml pG+R805, komplexiert mit Poly-l-Arginin, stimuliert (schwarzer Balken) bzw. pG+R805 wurde nicht komplexiert in verschiedenen Konzentrationen (12,5  $\mu$ g/ml, 6,3  $\mu$ g/ml, 3,2  $\mu$ g/ml, 1,6  $\mu$ g/ml oder 0,8  $\mu$ g/ml) in den Zellkulturüberstand der PDC gegeben. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. (B) PDC wurden mit R805-Cy3 alleine, pA+R805-Cy3 oder pG+R805-Cy3 (rot) 2,5 h inkubiert. Anschließend wurden die PDC mit einem Anti-BDCA-2 Antikörper und einem sekundären Alexa488 Antikörper gefärbt (grün). Nuklei wurden mit Hoechst 33324 sichtbar gemacht (blau). Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Zeiss Observer1 mit Apotome und der dazugehörigen Software durchgeführt.

### 3.3.11 Lange pG-RNA ermöglicht die Aufnahme des „nackten“ TLR7-Ligandens pG+R805

Es wurde gezeigt, dass pG+R805 auch ohne Transfektionsreagenzien oder kationische Peptide PDC zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimuliert. Daher sollte untersucht werden, in welchem Maße pG-RNA für die Aufnahme der RNA erforderlich ist, oder ob alleine die Doppelsträngigkeit von pG+R805 die Degradation der RNA durch RNAsen verhindert und die Aufnahme begünstigt.

PDC wurden aus humanen PBMC isoliert. dsRNAs, die G:U-Basenpaare enthielten, wurden durch Zusammengabe von pG, G<sub>42</sub>, G<sub>21</sub> oder G<sub>8</sub> mit R805 generiert. dsRNA wurde in den Konzentrationen 3,125  $\mu$ g/ml, 6,25  $\mu$ g/ml, 12,5  $\mu$ g/ml und 25  $\mu$ g/ml in den Überstand der PDC gegeben. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass pG+R805, verglichen zu den mit kürzeren pG-Strängen (G<sub>42</sub>, G<sub>21</sub>, G<sub>8</sub>) gebildeten G:U-Basenpaaren, PDC deutlich stärker zur Sekretion von IFN- $\alpha$  stimulierte (Abbildung 3.22). Trotzdem zeigten G<sub>42</sub>+R805, G<sub>21</sub>+R805 und

G<sub>8</sub>+R805 wenig stimulatorische Aktivität, wenn sie in hohen Konzentrationen in den Überstand gegeben wurden (25 µg/ml). G<sub>42</sub>+R805 induzierte auch in einer etwas geringeren Konzentration (12,5 µg/ml) eine kleine Menge IFN-α in PDC. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass mit steigender Länge der pG-RNA die TLR7-abhängige IFN-α Produktion anstieg (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22: G:U-Basenpaare können im Kontext von langem pG, ohne Verwendung von kationischen Peptiden, PDC stimulieren.**

PDC wurden aus humanen PBMC isoliert. Durch Zusammengabe der gleichen Mengen (w/w) R805 und pG in verschiedenen Längen (G<sub>8</sub>, G<sub>21</sub>, G<sub>42</sub> und pG) wurde dsRNA generiert und in verschiedenen Konzentrationen (3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml und 25 µg/ml) in den Zellkulturüberstand gegeben. Nach 20 h wurde IFN-α im Überstand gemessen.

Durch die Untersuchung der stimulatorischen Aktivität von dsRNA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben TLR3 ein zusätzlicher endosomaler TLR in der Lage ist, dsRNA zu detektieren. Während pl:C eine bestimmte, bisher noch nicht identifizierte dsRNA imitiert, die über TLR3 im Endosom und über MDA-5 im Zytosol erkannt wird, konnte gezeigt werden, dass TLR7 selektiv durch die Erkennung von G:U-Basenpaarungen in „Stem“-Strukturen aktiviert wird. Damit ist neben den bereits TLR7 und TLR8 stimulierenden ssRNAs eine RNA-Struktur identifiziert worden, die selektiv TLR7 stimuliert und ohne zusätzliche Transfektionsreagenzien oder kationische Peptide in die PDC gelangt.

### 3.4 Die zytosolische Erkennung von dsRNA

Zusätzlich zu der endosomalen Erkennung von Sekundärstrukturen, die in viraler RNA geformt werden können, sollte das Erkennungsmuster viraler RNA im Zytosol von Zellen genauer untersucht werden. dsRNA galt lange Zeit als *das* Erkennungsmerkmal einer viralen Infektion im Zytosol der Zelle. Neben PKR (protein

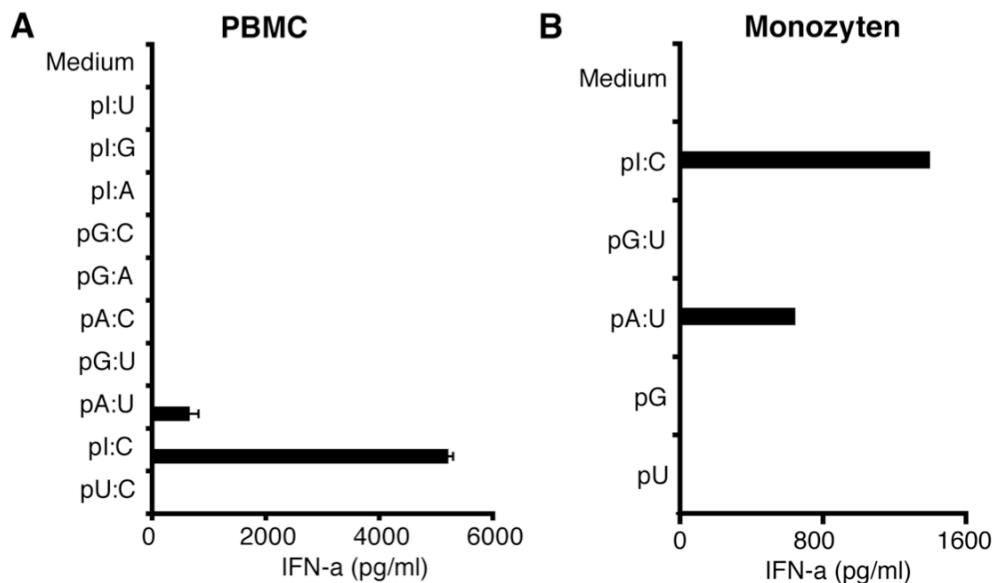
kinase activated by RNA) wurde beschrieben, dass lange dsRNA über die zytosolischen Helikasen RIG-I [5] und MDA-5 [6, 7] erkannt wird. Für Studien zur Untersuchung der Erkennung langer dsRNA wurde häufig pl:C eingesetzt, das gemeinhin als dsRNA Surrogat galt. Es stellte sich jedoch heraus, dass RIG-I spezifisch *in vitro*-transkribierte RNA erkennt [7]. In weiteren Studien wurde das 5'-Triphosphat von RNA als bestimmtes Erkennungsmuster für RIG-I identifiziert [36, 37]. Eine minimale Struktur, die eine Erkennung von RNA über MDA-5 ermöglicht, wurde bisher noch nicht identifiziert. Daher sollte untersucht werden, ob die Doppelsträngigkeit von RNA ausreichend für eine MDA-5-abhängige Erkennung ist oder ob es andere Merkmale einer RNA-Struktur oder Sequenz gibt, die eine MDA-5-Erkennung ermöglichen.

### 3.4.1 Zytosolische Erkennung von langer dsRNA in PBMC und Monozyten

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Erkennung verschiedener dsRNAs in Monozyten zur Produktion von IFN- $\alpha$  führt. Durch die Hybridisierung zwei langer ssRNAs in gleichen Mengen (w/w) wurde lange dsRNA generiert. Zur Verfügung standen die ssRNAs pl, pC, pU, pA und pG. Die Basen, die Watson-Crick-Bindungen eingehen können, bildeten Doppelstränge (pG:C, pA:U, pl:C). Andere Basenpaare können Wobble-Bindungen eingehen (pG:U, pl:U, pl:A,) oder bilden keine Basenpaare aus (pl:G, pG:A, pU:C, pA:C).

Humane PBMC aus Buffy Coats wurden aufgereinigt und mit den verschiedenen dsRNAs transfiziert. 20 h nach der Transfektion zeigte die IFN- $\alpha$ -Bestimmung, dass nicht jede dsRNA in der Lage ist, Zellen zu stimulieren (Abbildung 3.23 A). Vielmehr erwies sich pl:C als eine spezielle dsRNA, die aufgrund bestimmter, noch unbekannter Eigenschaften erkannt wird und große Mengen IFN- $\alpha$  induziert (Abbildung 3.23 A). Auch pA:U stimulierte die Zellen und diese produzierten daraufhin IFN- $\alpha$ . Die Menge des durch pA:U induzierten IFN- $\alpha$  entsprach aber nur etwa 10 % der Menge des durch pl:C induzierten IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.23 A). Obwohl pG:U – wie vorher gezeigt – IFN- $\alpha$  nach Komplexierung mit Poly-l-Arginin und Erkennung im Endosom der Zelle über TLR7 induzierte (Abbildung 3.10 A, B), führte pG:U, das mit Mirus LT-1 in das Zytosol der Zelle transfiziert wurde, nicht zur Produktion von IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.23 A). Es wurde vermutet, dass die Erkennung von pl:C und pA:U über die zytosolische RNA-Helikase MDA-5 geschah, da nach Stimulation von MDA-5 Typ I IFN produziert wird [6]. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden aus humanen PBMC Monozyten aufgereinigt, um die IFN- $\alpha$ -Produktion aufgrund einer Erkennung durch TLRs in anderen Zelltypen auszuschließen. Monozyten wurden mit einer Auswahl an ssRNAs und dsRNAs

transfiziert. Als Stimuli wurde pl:C, pA:U und zusätzlich pG:U ausgewählt. Als Kontrolle dienten die Einzelstränge pU und pG. Sowohl die Transfektion mit pl:C als auch mit pA:U induzierte IFN- $\alpha$  in den Monozyten (Abbildung 3.23 B). pG:U dagegen konnte die Monozyten nicht zur Sekretion von IFN- $\alpha$  stimulieren. Nach der Stimulation mit den ssRNAs pG und pU sowie der dsRNA pG:U wurde wie erwartet kein IFN- $\alpha$  produziert (Abbildung 3.23 B).



**Abbildung 3.23: Induktion von IFN- $\alpha$  durch Transfektion mit langer dsRNA.**

PBMC (A) oder Monozyten (B) wurden aus frischen Buffy-Coats isoliert und mit 1  $\mu\text{g/ml}$  langer dsRNA (A) oder zusätzlich mit langer ssRNA (B) mit dem Transfektionsreagenz Mirus LT-1 in das Zytosol der Zelle transfiziert. dsRNA wurde durch Zusammengabe der gleichen Mengen (w/w) der beiden Einzelstränge (ssRNA) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  generiert. Die Menge des produzierten IFN- $\alpha$  wurde nach 20 h im Überstand bestimmt.

### 3.4.2 Virale RNA von EMCV kann Zellen MDA-5-abhängig stimulieren

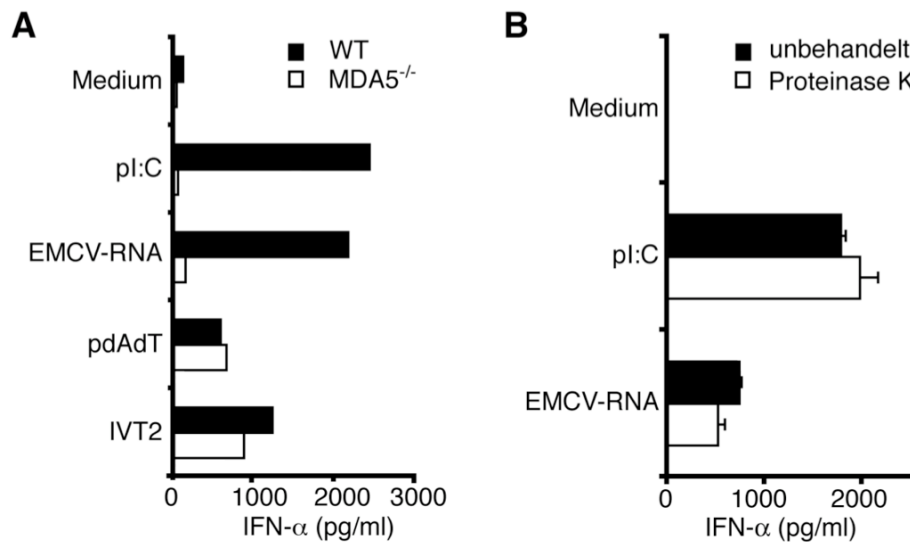
Es zeigte sich, dass pl:C als einzige dsRNA große Mengen IFN- $\alpha$  nach zytosolischer Erkennung induzieren kann (Abbildung 3.23). Daher scheint pl:C ein bestimmtes Erkennungsmuster zu enthalten, das eine zytosolische Erkennung erlaubt. Bisher war bekannt, dass pl:C und Picornaviren MDA-5 stimulieren [6, 7]. Um genauere Eigenschaften für ein Erkennungsmuster von MDA-5 zu identifizieren, sollte zunächst untersucht werden, ob die Erkennung von viraler RNA aus Picornaviren ausreichend für eine Stimulation von MDA-5 ist. Als Modell für die Picornaviren wurde der murine



Encephalomyocarditis Virus (EMCV) gewählt. A549-Zellen wurden mit EMCV infiziert, damit sich der Virus replizieren konnte. Nach etwa 48 h hatten sich die Viren ausreichend vermehrt und der Überstand, der nun die Viruspartikel enthielt, wurde gesammelt. Die Viren wurden mit  $\text{CaCl}_2$  ausgefällt und anschließend wurde die virale RNA isoliert.

Aus Knochenmarkzellen von Wildtyp- und MDA-5-defizienten Mäusen wurden unter Zugabe von GM-CSF mDC generiert. mDC wurden mit pl:C und EMCV-RNA transfiziert, um eine MDA-5-abhängige Erkennung zu überprüfen. Als Kontrolle zur Funktionalität der MDA-5-defizienten mDC wurden die Zellen zusätzlich mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT2) und mit pdAdT transfiziert. Nach 20 h wurde  $\text{IFN-}\alpha$  im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl pl:C als auch die EMCV-RNA MDA-5-abhängig  $\text{IFN-}\alpha$  induzierte. Die Sekretion von  $\text{IFN-}\alpha$  nach Stimulation mit pdAdT und IVT2 dagegen war unabhängig von MDA-5 (Abbildung 3.24 A). Mit diesem Versuch war bestätigt, dass die zytosolische Erkennung von pl:C und EMCV-RNA abhängig von MDA-5 geschah.

Durch Veränderungen von pl:C als auch von EMCV-RNA sollten Charakteristika untersucht werden, die eine zytosolische Erkennung von RNA ermöglichen. Dazu sollten verschiedene Versuche in humanen Monozyten durchgeführt werden. Da Picornaviren am 5'-Ende des RNA-Genoms ein Protein-Cap (VpG) besitzen, das anderen Viren fehlt, wurde vermutet, dass dieses für die Erkennung verantwortlich sein könnte. Um das Protein-Cap zu verdauen, wurde die EMCV-RNA mit Proteinase K behandelt und anschließend mit einer Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt. Zur Kontrolle, dass die Proteinase die RNA nicht verdaute hatte, wurde Proteinase K in der gleichen Konzentration zu pl:C gegeben. Nach dem Proteinverdau wurden die Zellen entweder mit der unbehandelten RNA oder mit der mit Proteinase K behandelten RNA transfiziert. Nach 20 h Inkubation der Monozyten mit der entsprechenden RNA wurde  $\text{IFN-}\alpha$  im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass das VpG-Cap am 5'-Ende der EMCV-RNA nicht notwendig für eine Erkennung war. Die mit Proteinase K behandelte EMCV-RNA induzierte etwa gleich viel  $\text{IFN-}\alpha$  wie die unbehandelte EMCV-RNA (Abbildung 3.24 B). Auch das pl:C, das mit Proteinase K inkubiert worden war, wies noch die gleiche stimulatorische Aktivität wie das unbehandelte pl:C auf. Daher konnte angenommen werden, dass weder die Proteinase K oder deren Puffer noch die Phenol-Chloroform-Fällung die RNA beschädigt oder die Stimulation beeinflusste hatte.



**Abbildung 3.24: pl:C und EMCV-RNA stimulieren MDA-5-abhängig murine mDC und induzieren in humanen Monozyten unabhängig vom VpG-Cap IFN- $\alpha$ .**

(A) mDC wurden aus Wildtyp- (WT) oder MDA-5-defizienten Mäusen unter Zugabe von GM-CSF generiert. Genomische RNA aus Picornaviren (EMCV) wurde isoliert und mDC mit pl:C, EMCV-RNA bzw. als Kontrolle mit pdAdT und IVT2 transfiziert (B) 5  $\mu$ g EMCV-RNA oder 5  $\mu$ g pl:C wurden in einem Endvolumen von 100  $\mu$ l 1,5 h mit Proteinase K bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die Proteinase K mit einer Phenol-Chloroform-Fällung inaktiviert und die RNA aufgereinigt. Humane Monozyten wurden mit unbehandeltem pl:C, EMCV-RNA oder mit Proteinase K behandelter RNA stimuliert. (A-C) Nach 20 h Inkubation wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt.

### 3.4.3 Inosinnukleotide sind nicht ausreichend für eine Stimulation

ADAR (adenosine desaminase acting on RNA) desaminiert spezifisch Adenosin in dsRNA zu Inosin und kann dadurch die Sequenz von dsRNA modifizieren. Die zytosolisch exprimierte Form von ADAR ist IFN-induzierbar und könnte daher im Zusammenhang mit einer viralen Infektion stehen. Es sollte untersucht werden, ob eine MDA-5-abhängige Erkennung von pl:C auf die Anwesenheit der Inosinnukleotide zurückzuführen ist.

Wird in einer dsRNA durch ADAR Adenosin zu Inosin desaminiert, entsteht zunächst eine Inosin:Uridin (I:U)-Basenpaarung. Uridin bildet zusammen mit Inosin eine Wobble-Basenpaarung. Inosin paart anschließend bevorzugt mit Cytidin, daher können sowohl I:U als auch Inosin:Cytidin (I:C)-Basenpaare in zytosolischer dsRNA vorkommen, die durch ADAR modifiziert wurde. Es sollte untersucht werden, ob I:U- als auch I:C-Basenpaare ausschlaggebend für die Erkennung durch MDA-5 sind.

Dazu wurden synthetische ORNs entworfen, die einzelne Inosinnukleotide enthielten oder mit einem Inosin-Strang hybridisieren konnten (Tabelle 3.2). Die Sequenz von

R32i1 und R32i4 wurde so gewählt, dass diese ORNs teilkomplementär sind. Mehrere 32 nt langen ORNs (R32i4 und 32i1 1:1, w/w) können zusammen durch überlappende Hybridisierung Konkatemere bilden und somit eine lange dsRNA imitieren. Diese weist jedoch „Bruchstellen“ aufgrund fehlender Phosphatbindungen auf. Neben A:U- und G:C-Basenpaarungen können sich aufgrund der Sequenz zusätzlich I:U- bzw. I:C-Basenpaarungen ausbilden. Das ORN R21i5 kann an einen pC-Strang hybridisieren und es entstehen neben G:C-Basenpaarungen zusätzlich I:C-Basenpaarungen.

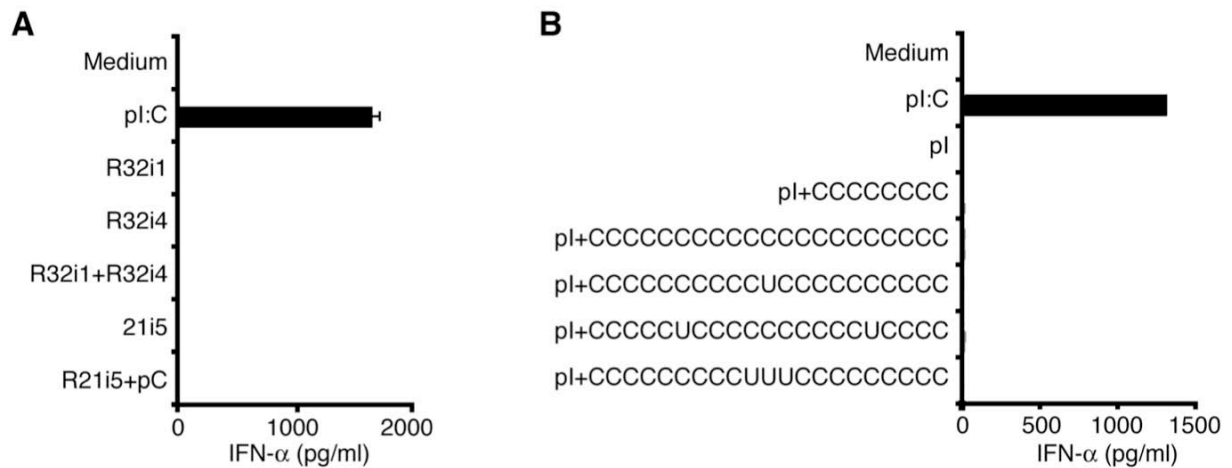
Monozyten wurden mit den Einzelsträngen R32i1, R32i4, R21i5 oder den Doppelsträngen (R32i1+R32i4 und R21i5+pC) und pl:C transfiziert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. Es zeigte sich, dass keiner der untersuchten ORNs alleine oder im Doppelstrang IFN- $\alpha$  induzieren konnte (Abbildung 3.25 A). pl:C induzierte erneut IFN- $\alpha$  wodurch die Funktionalität der Monozyten bestätigt wurde.

ORN	RNA-Sequenz
R32i1	CGICGUUCCUIACAUGCAIUCGUACGIUCCUG
R32i4	CIUGUCAGGIACGCCGCIGGACCGUICGACUG
R21i5	GGIGGIIGGIIIGIGIGGGIG

**Tabelle 3.2: Sequenzen der Inosin-haltigen ORNs.**

R32i4 und R32i1 sind partiell komplementär und können daher bei Zusammengabe zu konkatemersierenden Doppelsträngen hybridisieren. R21i5 bindet aufgrund der Sequenz an einen pC-Strang und bildet neben G:C-Basenpaaren I:C-Basenpaare aus.

Es sollte untersucht werden, ob für die zytosolische Stimulation durch pl:C der lange pC-Strang notwendig ist und ob I:U-Basenpaare die Aktivität von pl:C beeinflussen. Anstelle eines langen pC-Stranges wurden kurze Cytidin-ORNs (C<sub>8</sub> und C<sub>21</sub>) an den pC-RNA hybridisiert. Zusätzlich wurden Cytosin-reiche 21 nt lange ORNs zu pl-RNA gegeben, die einzelne Uridinnukleotide enthielten (R217, R219 und R214). Monozyten wurden isoliert und mit den oben beschriebenen Stimuli und zusätzlich mit pl:C transfiziert. Die IFN- $\alpha$ -Bestimmung nach 20 h zeigte, dass bis auf pl:C keiner der untersuchten Stimuli IFN- $\alpha$  induzieren konnte (Abbildung 3.25 A).

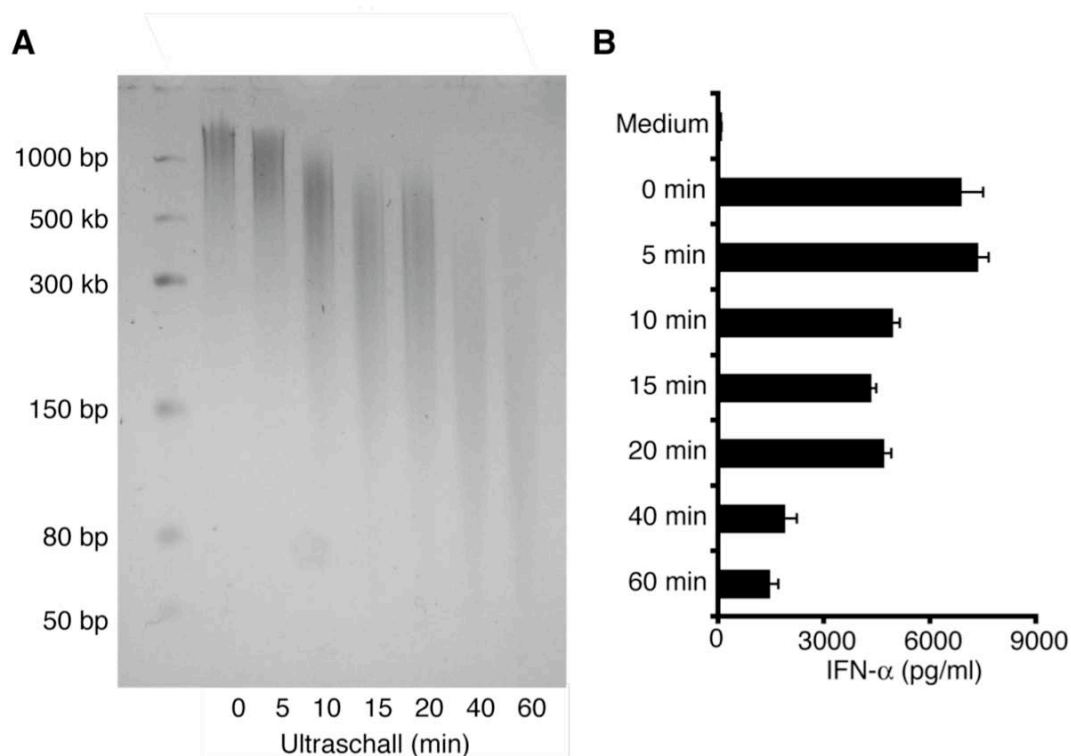


**Abbildung 3.25: Erkennung von Inosin in ORNs oder in dsRNA.**

(A, B) Humane Monozyten wurden aus humanen PBMC aufgereinigt und mit 2  $\mu\text{g/ml}$  ssRNA oder dsRNA stimuliert. dsRNA wurde generiert, indem ssRNA im gleichen Verhältnis (w/w) zusammengegeben wurde. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen.

### 3.4.4 Die Länge von pl:C beeinflusst die IFN- $\alpha$ -Induktion

Es wurde gezeigt, dass bereits eine kleine Veränderung von pl:C die Produktion von IFN- $\alpha$  verhindert. Wurde bei pl:C das pC durch kurze Cytidin-ORNs (8 mer, 21 mer) ersetzt, wies die dsRNA keine stimulatorische Aktivität mehr auf (Abbildung 3.25 B). Es stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Länge von pl:C auf die zytosolischer Erkennung hat. Um eine mögliche Längenabhängigkeit von pl:C auf die IFN- $\alpha$ -Induktion zu untersuchen, wurde pl:C in einem Ultraschallbad sonifiziert (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 40 min oder 60 min). Das behandelte pl:C wurde zur Überprüfung der Fragmentierung im Ultraschallbad und zur Längenbestimmung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Es zeigte sich deutlich, dass die Länge vom pl:C mit steigender Inkubationszeit im Ultraschallbad stetig abnahm (Abbildung 3.26 A). Die IFN- $\alpha$ -Produktion der transfizierten Monozyten wies erneut eindeutig auf eine längenabhängige Erkennung von pl:C hin: Je kürzer die pl:C-Fragmente waren, desto weniger IFN- $\alpha$  wurde von den Monozyten produziert (Abbildung 3.26 B). Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Länge bei der Erkennung von pl:C eine wichtige Rolle spielt.



**Abbildung 3.26: Die stimulierende Aktivität von pl:C ist längenabhängig.**

pl:C wurde im Ultraschallbad unterschiedlich lang (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 40 min oder 60 min) sonifiziert. (A) Die Auftrennung von pl:C auf einem Polyacrylamidgel zeigt, dass mit steigender Dauer der Sonifikation die Länge des pl:Cs abnimmt (Größenstandard in aufsteigender Länge: 50 bp, 80 bp, 150 bp, 300 bp, 500 bp, 1000 bp). (B) Monozyten wurden isoliert und mit sonifiziertem bzw. als Kontrolle mit unbehandeltem pl:C transfiziert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt.

### 3.4.5 pl:C – was macht die Erkennung durch MDA-5 aus?

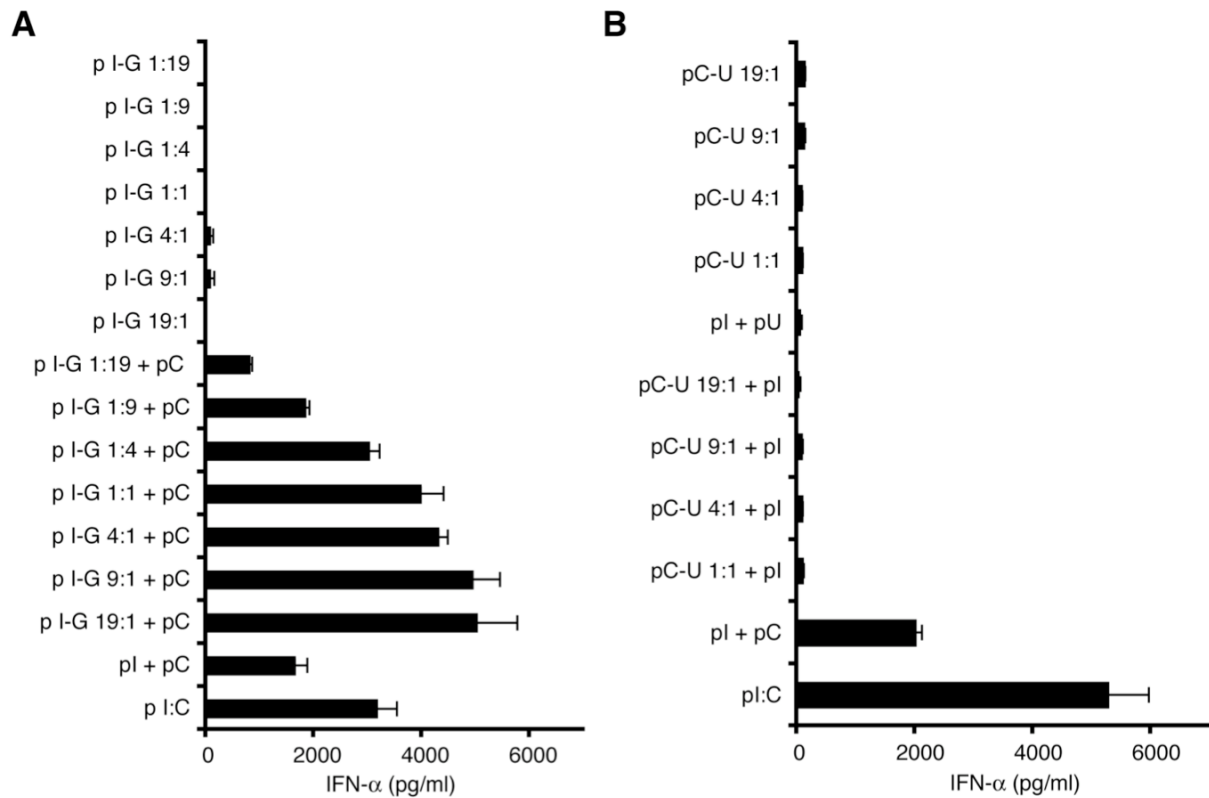
Bisher wurde gezeigt, dass pl:C in seiner ursprünglichen Form als langer Doppelstrang, bestehend aus zwei langen Einzelsträngen, sehr aktiv ist und IFN- $\alpha$  induziert. Dennoch konnten kurze Cytidin-ORNs anstelle der langen pC-RNA die Aktivität von pl:C nicht erhalten. Ebenso war ein nachgestellter Doppelstrang, bestehend aus konkatemerisierenden ORNs, der I:C- als auch I:U-Basenpaarungen aufweist, inaktiv.

pl:C wird enzymatisch mit Polynukleotidphosphorylase (PNPase) hergestellt. Bei dieser Reaktion reagieren Nukleotiddiphosphate unter Abspaltung einer Phosphatgruppe zu einem langen RNA-Strang. Mit Hilfe einer PNPase-Reaktion wurden lange RNA synthetisiert, die entweder ausschließlich mit Inosindiphosphaten (IDP) oder durch Beimischung verschiedener Anteile von Guanosindiphosphaten

(GDP) hergestellt wurden. Zum Beimischen wurde GDP ausgewählt, da dieses – genau wie Inosin – mit Cytidin Watson-Crick-Basenpaarungen ausbilden kann. Die langen Inosin-Guanosin ssRNAs (pl-G) oder pl, die mit der PNPase Reaktion hergestellt wurden, wurden zur Ausbildung von dsRNA mit pC zusammengegeben. Die Einzelstränge wurden alleine oder zusammen mit pC in zuvor isolierte Monozyten transfiziert. Zusätzlich wurden Monozyten mit dem käuflich erhältlichen pl:C transfiziert und nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. pl:C induzierte wie erwartet IFN- $\alpha$ . Wurden die Monozyten mit pl-G 19:1+pC transfiziert, wurden diese ebenfalls zur Sekretion von IFN- $\alpha$  stimuliert. Die Menge des produzierten IFN- $\alpha$  20 h nach der Transfektion war sogar noch erhöht im Vergleich zu der Menge IFN- $\alpha$ , die durch das käuflich erhältliche pl:C induziert wurde (Abbildung 3.27 A). Überraschenderweise konnte der Anteil von IDP in dem Gemisch von IDP und GDP deutlich verringert werden (IDP:GDP 9:1, 4:1, 1:1, 1:4, 1:9, 1:9), ohne hybridisiert an pC inaktiv zu werden. pl-G 1:19+pC induzierte im Vergleich zu pl:C nur noch wenig IFN- $\alpha$ . Die Einzelstränge (pl-G) induzierten unabhängig von dem eingesetzten Verhältnis von IDP zu GDP in den Monozyten nicht die Produktion von IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.27 A).

Nun sollte untersucht werden, ob auch eine Veränderung der Sequenz des pC-Stranges die Aktivität erhält. Da Inosin zusammen mit Uridin Wobble-Basenpaare ausbilden kann, und auch eine ADAR-Modifikation von dsRNA zunächst zu I:U-Basenpaaren führt, wurde zu der PNPase Reaktion mit Cytidindiphosphaten (CDP) in verschiedenen Verhältnissen Uridindiphosphat (UDP) gegeben (CDP:UDP 19:1, 9:1, 4:1, 1:1). Nach Transfektion der Monozyten mit den Einzelsträngen, sowie mit der Cytidin-Uridin-RNA (pC-U), hybridisiert an pl, zeigte sich, dass eine Veränderung des pC-Stranges die Aktivität vollkommen aufhob (Abbildung 3.27 B). Obwohl pl:C erneut IFN- $\alpha$  induzierte, war keiner der PNPase generierten pC-U-Stränge zusammen mit pl in der Lage, die Produktion von IFN- $\alpha$  in den Monozyten zu induzieren.

Mit diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine Sequenzveränderung der Inosin-RNA durch Guanosinnukleotide im Vergleich zu pl:C die Aktivität – abhängig vom Verhältnis – erhält oder sogar verbessert, wogegen eine kleine Sequenzveränderung von pC-RNA durch Einfügen von Uridinnukleotiden zur stimulatorischen Inaktivität führt.



**Abbildung 3.27: pI-G+pC induziert vergleichbare Mengen pI:C in Monozyten wie pI:C.**

RNA wurde mit Polynukleotidphosphorylase (PNPase) hergestellt. Die Zusammensetzung der Nucleotiddiphosphate variierte: Es wurde RNA generiert, die sich in verschiedenen Verhältnissen aus Inosin und Guanosin (19:1, 9:1, 4:1, 1:1, 1:4, 1:9, 1:19) zusammensetzte. (A) Inosin-Guanosin (pI-G) wurde entweder alleine in Monozyten transfiziert oder vorher mit pC zusammengegeben. (B) pC-U-Stränge wurden ebenfalls entweder alleine transfiziert oder mit pI hybridisiert. (A, B) Als Kontrolle wurde pI:C (Sigma) oder pC, hybridisiert mit PNPase-generiertem pI (pI + pC), in humane Monozyten transfiziert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Teilabbildung B wurde in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt.

Durch die Untersuchung der zytosolischen Stimulation von dsRNA konnten unterschiedliche Merkmale identifiziert werden, die eine zytosolische Erkennung ermöglichen und daraufhin die Produktion von IFN- $\alpha$  in Monozyten induzieren: a) virale RNA (EMCV) ohne Protein-Cap induziert IFN- $\alpha$ , b) die Erkennung von Inosin alleine ist nicht verantwortlich für die Stimulation und c) die Sequenz von pI hybridisiert an pC, nicht aber die Sequenz des pC-Stranges, hybridisiert an pI, kann unter Beibehaltung der Aktivität verändert werden.

### 3.5 Zytosolische Erkennung von DNA

Schon lange ist bekannt, dass neben viraler RNA auch DNA viralen oder bakteriellen Ursprungs im Zytosol von Zellen detektiert wird [85, 87, 88]. Insbesondere Immunzellen produzieren nach zytosolischer Erkennung von DNA Typ I IFN. Als Ligand zur zytosolischen, TLR9-unabhängigen Erkennung von DNA im Zytosol dient bisher die lange (etwa 5000 kb), enzymatisch hergestellte dsDNA pdAdT. Es sollte untersucht werden, ob kurze, definierte ODNs Zellen unabhängig von TLR9 durch eine zytosolische DNA-Erkennung stimulieren können.

#### 3.5.1 Erkennung zytosolischer DNA

Die Suche nach einem kurzen ODN, das im Zytosol der Zelle erkannt wird, sollte im humanen System durchgeführt werden. Als Zelltyp für die anstehenden Experimente wurden Monozyten ausgewählt, da diese keinen TLR9 exprimieren [28] und die TLR9-abhängige IFN- $\alpha$  Produktion somit ausgeschlossen werden kann. Die Transfektion der Stimuli erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine, das Nukleinsäuren in das Zytosol von Zellen transfizieren kann.

Zunächst wurden Monozyten aus humanen PBMC aufgereinigt und mit pdAdT transfiziert. Wie erwartet produzierten die Monozyten nach der Transfektion IFN- $\alpha$ , das nach 20 h im Überstand nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.28 A). pdAdT ist ein langes, doppelsträngiges DNA-Polymer, das eine alternierende AT-Sequenz besitzt (Abbildung 3.28 B). Da pdAdT ein sehr aktiver Stimulus für eine zytosolische DNA-Erkennung ist, sollten Sequenzen für kurze, synthetisch herzustellende ODNs entworfen werden, die ähnlich wie pdAdT aufgebaut sind. Weiter wurde vermutet, dass die zytosolische DNA-Erkennung auf der Erkennung langer dsDNA basiert. Daher wurden ODNs entworfen, die eine bipalindromische Sequenz hatten (Abbildung 3.28 C) und daher mehrere ODNs der gleichen Sequenz konkaterisierende Strukturen bilden konnten (Abbildung 3.28 E). Somit imitierten kurze, definierte bipalindromisch-konkaterisierende ODNs (bipalindromic concatemering ODNs; bpcODNs) eine lange dsDNA. Die palindromische Sequenz am 5'-Ende sollte, entsprechend zu pdAdT, aus einer Abfolge alternierender Adenosin- Thymin (AT)-Nukleotide bestehen. Die zweite palindromische Sequenz sollte kürzer sein, um eine möglichst lange AT-Sequenz in einem ODN zu ermöglichen. Daher wurde eine palindromische Guanosin-Cytidin (GC)-reiche Sequenz ausgewählt, die aufgrund der drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanosin und Cytidin eine höhere Bindungsaktivität hatte als eine entsprechend kurze AT-reiche Sequenz. Diese GC-reiche Sequenz hatte eine Länge von 8 nt und



wird im Folgenden Ankerregion genannt. Während die AT-reiche Sequenz bei einer Hybridisierung gegeneinander verschoben werden kann, ermöglicht die GC-reiche Sequenz nur eine bestimmte Hybridisierung zweier bpcODNs, da Guanosin und Cytidin nicht in einer alternierenden Abfolge im ODN vorkommen (Abbildung 3.28 D, E).



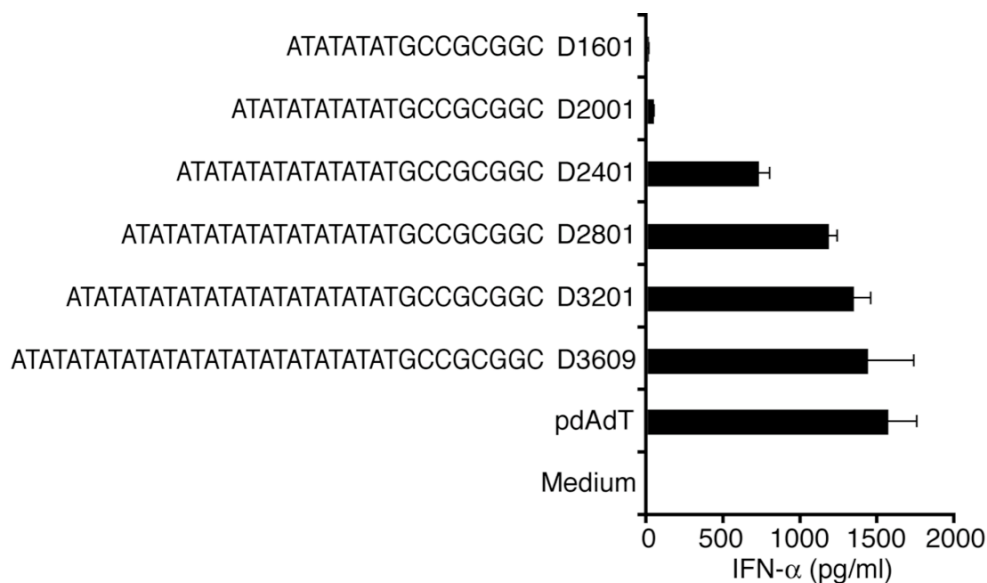
**Abbildung 3.28: Monozyten produzieren IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit pdAdT.**

(A) Humane Monozyten wurden isoliert und mit 1  $\mu\text{g/ml}$  pdAdT stimuliert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. B zeigt die lange dsDNA pdAdT mit einer Sequenz, bestehend aus einer alternierenden AT-Basenfolge. (C) Darunter dargestellt ist D3201, ein einzelsträngiges ODN, das zwei palindromische Sequenzen besitzt. Das erste Palindrom am 5'-Ende besteht – wie pdAdT – aus einer alternierenden Abfolge von Adenosin und Thimidin. Das zweite Palindrom am 3'-Ende, Ankerregion genannt, ist eine palindromische Sequenz, bestehend aus Guanosin und Cytidin. (D) Zwei ODNs bilden über Watson-Crick Basenpaarungen partielle Doppelstränge. (E) Viele ODNs können eine lange konkatemerierte dsDNA imitieren.

### 3.5.2 Kurze bipalindromische konkatemerierte ODNs (bpcODNs) induzieren IFN- $\alpha$ in Monozyten

Die zytosolische Erkennung der bpcODNs sollte anhand der IFN- $\alpha$  Produktion in Monozyten nach der Transfektion bestimmt werden. Um eine mögliche längenabhängige Erkennung der AT-reichen Sequenz zu berücksichtigen, sollten bpcODNs untersucht werden, die eine gleichbleibende Ankerregion (GCCGCGGC) hatten und deren AT-Bereich in der Länge variierte. bpcODNs in der Länge von 16 nt, 20 nt, 24 nt, 28 nt, 32 nt oder 36 nt wurden in Monozyten transfiziert. pdAdT diente bei der Transfektion als Positivkontrolle. Nach 20 h Inkubation der stimulierten Monozyten wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass die IFN- $\alpha$ -Produktion nach Erkennung von bpcODNs möglich war (Abbildung 3.29).

Längere bpcODNs (D3201 und D3609), die aufgrund der gleichbleibenden Ankerregion einen längeren AT-Bereich hatten, zeigten eine stärkere IFN- $\alpha$ -induzierende Aktivität. Eine AT-reiche Sequenz, kürzer als 16 nt, konnte die stimulatorische Aktivität und die IFN- $\alpha$ -Induktion nicht mehr erhalten. Die Länge eines bpcODNs von 32 nt bis 36 nt wurde als optimal zur Induktion von IFN- $\alpha$  befunden.



**Abbildung 3.29: Bipalindromische konkatemerisierende ODNs (bpcODN) induzieren längenabhängig IFN- $\alpha$  in Monozyten.**

Bipalindromische Sequenzen wurden entworfen, die jeweils eine 8 nt lange Ankerregion am 3'-Ende und eine AT-reiche Sequenz am 5'-Ende besaßen. In den Sequenzen der verschiedenen bpcODNs wurde jeweils die gleiche Ankerregion verwendet (GCCGCGGC) während der AT-Bereich in der Länge variierte. Humane Monozyten wurden mit 1  $\mu$ g/ml ODN transfiziert und nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen.

### 3.5.3 ODNs ohne palindromische Ankerregion sind inaktiv

Erste Untersuchungen zeigten, dass bpcODNs Monozyten zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimulieren konnten. Es stellte sich die Frage, ob die bipalindromische Sequenz notwendig zur IFN- $\alpha$  Induktion war oder ob auch kurze ODNs, die keine Konkatemere bilden konnten, IFN- $\alpha$  induzieren. Daher wurde ein 32 nt langes ODN (D3207) untersucht, das nicht die palindromische Ankerregion besaß, sondern eine GC-reiche Sequenz, die die gleiche Anzahl Guanosin- und Cytidinnukleotide enthielt, aber nicht selbstkomplementär war (GGCCCCGG). Die AT-reiche Sequenz wurde entsprechend zu D3201 beibehalten. Zusätzlich wurde die IFN- $\alpha$ -Induktion in

Monozyten durch D3203 untersucht, einem bpcODN, dessen Ankerregion am 5'-Ende lag. Die AT-reiche Sequenz befand sich am 3'-Ende des bpcODNs. Die ODNs D3207, D3203 und als Kontrolle D3201 wurden in die Monozyten transfiziert und nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Während die bpcODNs D3201 und D3203 IFN- $\alpha$  in den Monozyten induzierten, produzierten Zellen, die mit dem nicht bipalindromischen ODN D3207 transfiziert worden waren, kein IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.30 A). Insgesamt zeigten diese Untersuchungen, dass eine bipalindromische Struktur der ODNs und somit die Imitation einer langen dsDNA für eine zytosolische Erkennung von DNA erforderlich ist. Die 24 nt lange AT-reiche Sequenz alleine war nicht ausreichend zur Stimulation.

Bisher wurde beobachtet, dass bpcODNs mit einer 8 nt langen Ankerregion zur Induktion von IFN- $\alpha$  geeignet waren. Der Einfluss der Länge der Ankerregion auf die stimulatorische Aktivität sollte genauer untersucht werden. Dazu wurden bpcODNs entworfen, die eine gleichbleibende AT-reiche Sequenz besaßen (32 nt), deren Ankerregion jedoch variierte (4 nt, 6 nt, 8 nt). Nach der Transfektion dieser bpcODNs in Monozyten wurde beobachtet, dass alle bpcODNs IFN- $\alpha$  induzierten (Abbildung 3.30 B). Die Menge IFN- $\alpha$  war etwas geringer, wenn die Ankerregion nur 4 nt-lang war. Das könnte auf eine schlechtere Bildung von Konkatemeren aufgrund der sehr kurzen Ankerregion zurückzuführen sein. Für weitere Untersuchungen wurde die 8 nt lange Ankerregion als Standard verwendet.

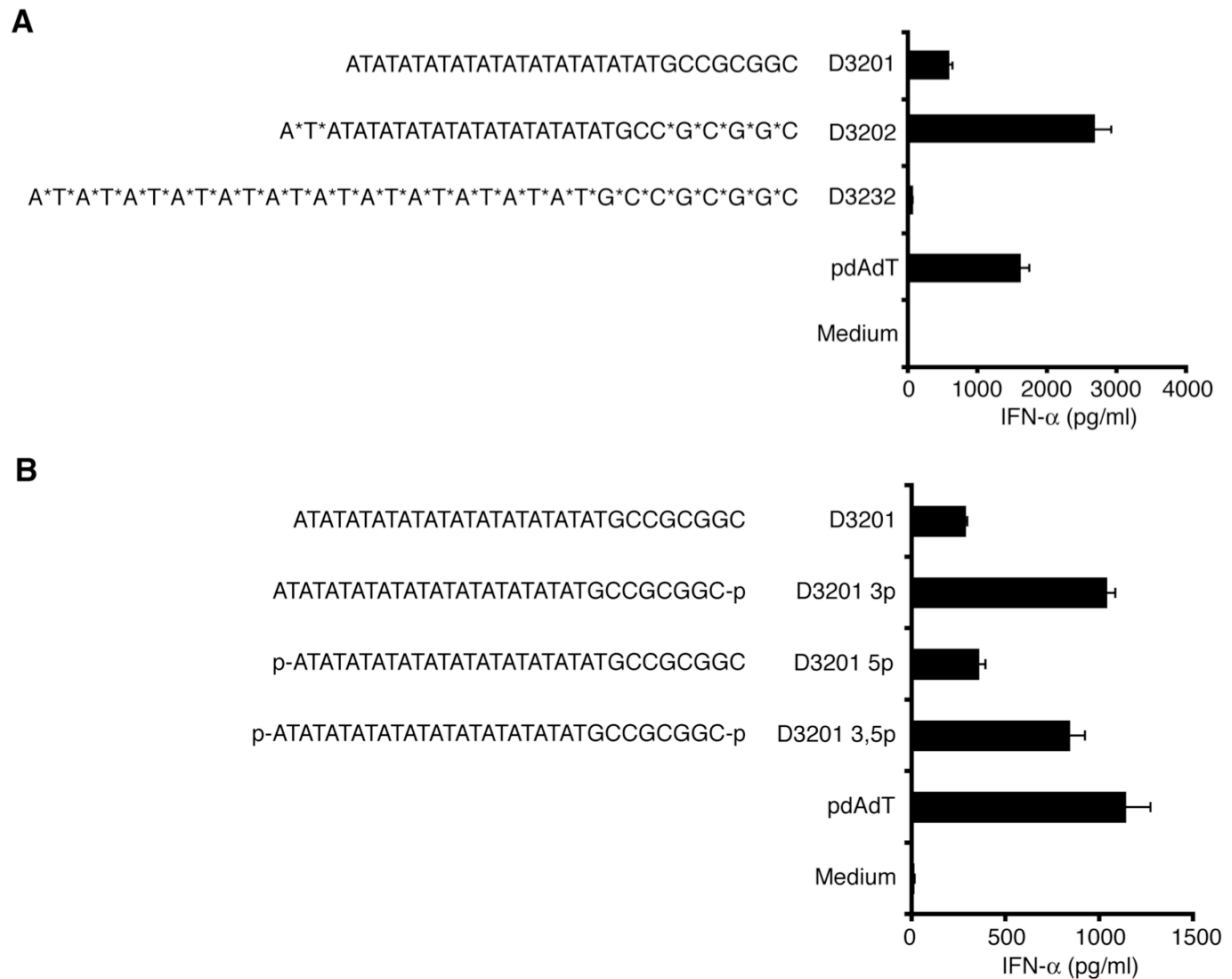


CpG-A 2216) [169] oder das gesamte Rückgrat aus PTO-Bindungen besteht (z.B. CpG-C M362) [40], sollte das Rückgrat von dem bpcODN modifiziert werden.

Daher wurde – im Vergleich zu der Aktivität des Phosphodiester bcpODNs D3201 – die Induktion von IFN- $\alpha$  in Monozyten durch bcpODNs untersucht, die entweder zwei PTO-Bindungen am 5'-Ende und fünf PTO-Bindungen am 3'-Ende (entsprechend CpG 2216) (D3202) oder ein gesamtes PTO-Rückgrat (D3232) besaßen.

Humane Monozyten wurden isoliert und mit den oben beschriebenen bpcODNs transfiziert. Nach einer Inkubation von 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. D3201 induzierte wie erwartet IFN- $\alpha$ . Im Vergleich dazu induzierte D3202 signifikant mehr IFN- $\alpha$ . Das bpcODN mit dem gesamten PTO-Rückgrat war dagegen nicht in der Lage, Monozyten zur IFN- $\alpha$ -Sekretion zu stimulieren (Abbildung 3.31 A). Diese Untersuchungen zeigten, dass PTO-Modifizierungen an den Enden des bcpODNs die stimulatorische Aktivität verbessern. bpcODNs, bei denen die gesamten Phosphodiesterbindungen durch PTO-Bindungen ersetzt sind, waren jedoch inert.

Durch Zusammenlagerung der bpcODNs wird vermutlich eine lange dsDNA imitiert, die daher ähnliche Aktivität zeigt wie pdAdT bei der Induktion von IFN- $\alpha$  in Monozyten. Da durch Zusammenlagerung der kurzen ODNs im Gegensatz zu einer langen dsDNA „Bruchstellen“ durch das Fehlen der Phosphatbindungen zwischen den einzelnen ODNs entstehen, sollte die stimulatorische Aktivität von bpcODNs mit Monophosphaten am 3'-Ende (D3201 3p) oder am 5'-Ende (D3201 5p) untersucht werden. Diese sollten die fehlenden Phosphatbindungen ersetzen, sodass nur noch eine Bindung – die zwischen Phosphat und Desoxyribose – fehlte und eine vollständige dsDNA imitiert wurde. Zusätzlich wurde ein bpcODN untersucht, das an beiden Enden mit Monophosphaten versehen war (D3201 3,5p) und dadurch eine konkatemerisierenden dsDNA entstand, die jeweils zwei Phosphatgruppen an den Übergängen der bpcODNs besaß. Monozyten wurden isoliert und mit den verschiedenen bpcODNs sowie als Positivkontrolle mit pdAdT transfiziert. Überraschenderweise induzierte D3201 5p (Monophosphat am 5'-Ende) die gleiche Menge IFN- $\alpha$  wie D3201 (ohne Monophosphat), dagegen verstärkten sowohl D3201 3p (Monophosphat am 3'-Enden) wie auch D3201 3,5p (Monophosphat am 5'- und am 3'-Ende) die Menge des induzierten IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.31 B). Die stimulatorische Aktivität wurde also nicht beeinträchtigt, wenn zwei Phosphatgruppen an den Übergängen der bpcODNs auftraten. Anhand dieser Beobachtungen wurde deutlich, dass nicht das „Verschließen“ der Lücken durch Monophosphatgruppen die stimulatorische Aktivität verbesserte, sondern dass alleine durch das 3'-Monophosphat die IFN- $\alpha$  Induktion deutlich gesteigert wurde.



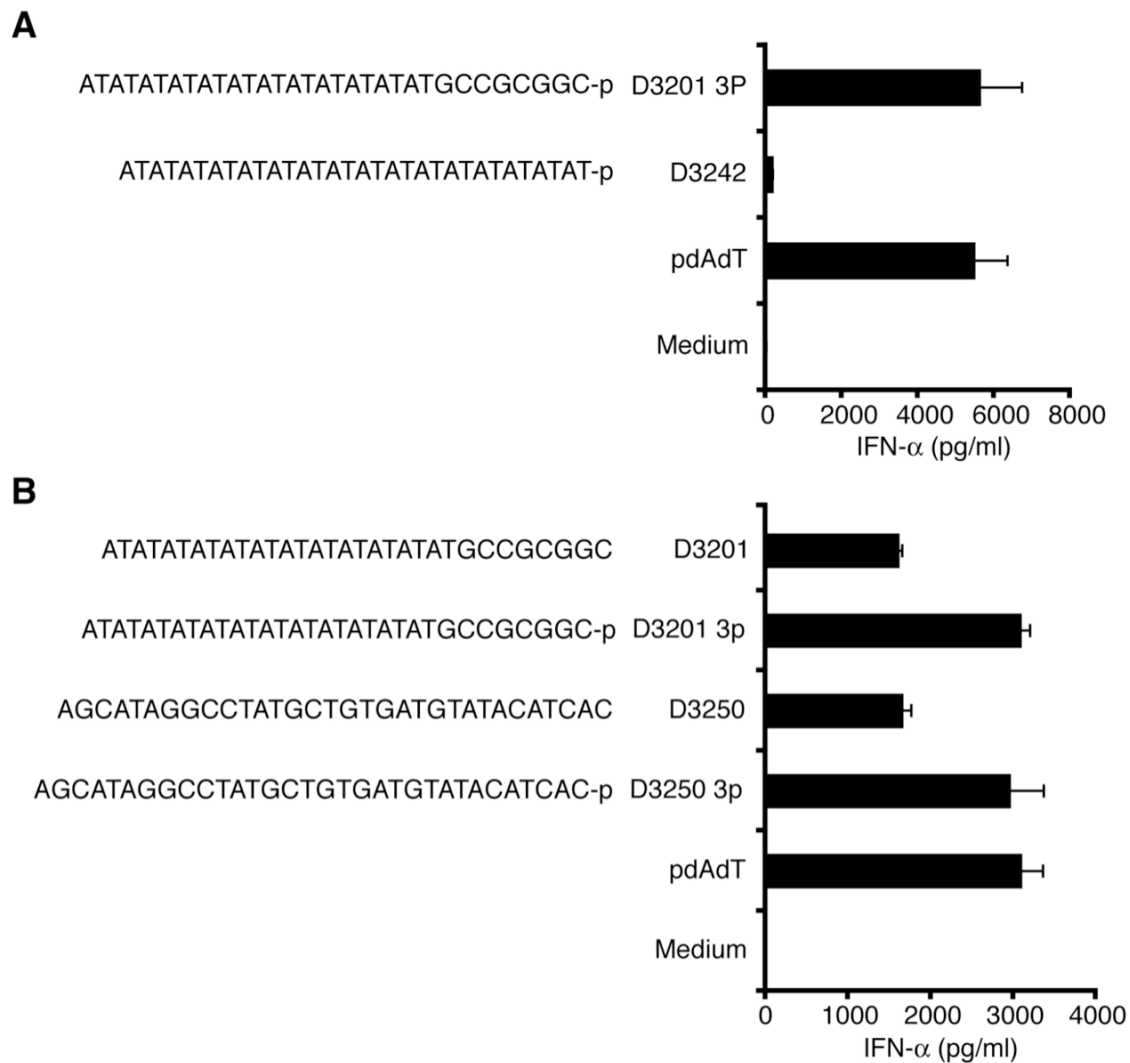
**Abbildung 3.31: Die stimulatorische Aktivität der bpcODNs wird durch partiell PTO-stabilisierte ODN-Rückgrate und 3'-Monophosphate verbessert.**

(A) D3201 wurde zur Stabilisierung mit PTO-Bindungen am 3'-Ende (fünf PTO-Bindungen) und am 5'-Ende (zwei PTO-Bindungen) versehen (D3202) oder die gesamten Phosphodiesterbindungen des ODNs wurden durch PTO-Bindungen ersetzt (D3232). (B) D3201 wurde am 3'-Ende (D3201 3p), am 5'-Ende (D3201 5p) oder an beiden Enden (D3201 3,5p) mit einem Monophosphat modifiziert. 1  $\mu$ g/ml (A) D3201, D3202, D3232 oder (B) D3201, D3201 3p, D3201 5p, D3201 3,5p und als Positivkontrolle pdAdT wurde in Monozyten transfiziert und nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt.

### 3.5.5 3'-Monophosphate verstärken die stimulierende Aktivität von bpcODNs sequenzunabhängig

Es wurde beobachtet, dass ein 3'-Monophosphat die stimulatorische Aktivität eines bpcODNs mit der Sequenz von D3201 verbessert. Daher sollte untersucht werden, ob alleine die Erkennung eines 3'-Monophosphats ausreicht, die Zellen zu stimulieren. Daher wurde die stimulatorische Aktivität eines AT-reichen ODNs (D3242) untersucht, das ein 3'-Monophosphat besaß, dem aber die palindromische GC-reiche Ankerregion fehlte. D3201 3p, D3242 und als Kontrolle pdAdT wurde in

Monozyten transfiziert. Die Bestimmung von IFN- $\alpha$  nach 20 h zeigte, dass ein AT-reiches ODN ohne Ankerregion mit 3'-Monophosphat kaum aktiv war und daher nur sehr wenig IFN- $\alpha$  induzierte (Abbildung 3.32 A). Aufgrund seiner alternierenden Sequenz könnte dieses ODN auch Konkatemere bilden, die sich jedoch verschieben können und deren Bindung nicht durch eine GC-reiche Ankerregion verstärkt wird. Vermutlich ist durch die fehlende GC-reiche Sequenz die Bindungsenergie nicht ausreichend und es können sich keine langen, stabilen dsDNAs zusammenlagern. Ein 3'-Monophosphat alleine an einem ODN wird in Monozyten daher nicht erkannt. Um zu untersuchen, ob eine AT-reiche Sequenz notwendig für die zytosolische Erkennung von DNA war, wurde ein bpcODN mit einer von der AT-reichen Sequenz und der GC-reichen Ankerregion abweichenden Zufallssequenz entworfen (D3250). Dieses bpcODN war jedoch weiterhin bipalindromisch und konnte daher Konkatemere bilden und eine lange dsDNA imitieren. Die Sequenz besaß etwa die gleiche Menge Adenosin- und Thymidinnukleotide wie Guanosen- und Cytidinnukleotide. Adenosin- und Thymidinnukleotide bilden Watson-Crick-Paarungen mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Guanosen und Cytidin dagegen bilden Watson-Crick-Basenpaarungen mit drei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Dadurch sollte die Bildung eines Konkatemers bei etwa der gleichen Menge AT- wie auch GC-Basenpaarungen gewährleistet sein. Wie in Abbildung 3.32 B gezeigt wird produzierten Monozyten, die mit dem bpcODN transfiziert wurden, das keine AT-reiche Sequenz besaß, jedoch bipalindromisch war, IFN- $\alpha$ . Die Menge IFN- $\alpha$  entsprach etwa der durch D3201 induzierten Menge IFN- $\alpha$ . Ein 3'-Monophosphat verdoppelte die Menge des produzierten IFN- $\alpha$  unabhängig von der Sequenz (D3201 3p und D3250 3p). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass für eine zytosolische Erkennung eine Konkatemerbildung der bpcODNs nötig ist. Erst eine Imitation einer langen dsDNA ermöglicht die Stimulation und Induktion von IFN- $\alpha$  in Monozyten. Ein 3'-Monophosphat verstärkt die stimulatorische Aktivität von bpcODNs.



**Abbildung 3.32: 3'-Monophosphate verstärken die stimulatorische Aktivität von bpcODNs in Monozyten unabhängig von der Sequenz.**

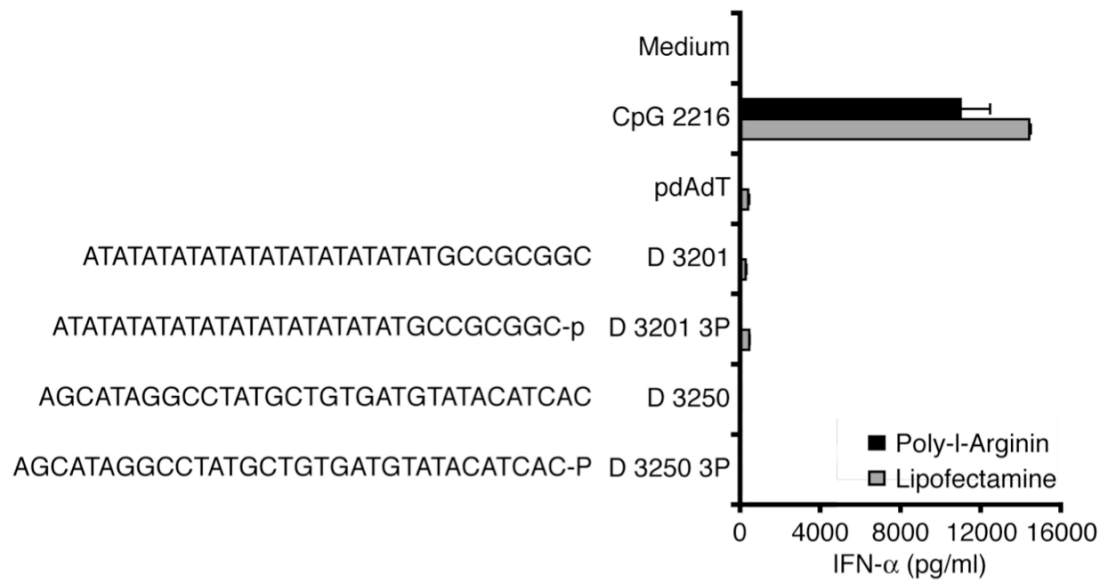
(A) D3201 wurde mit 3'-, 5'- oder 3'- und 5'-Monophosphaten versehen. (B) Zusätzlich wurde eine bipalindromische Zufallssequenz entworfen, die entweder nicht modifiziert war oder eine 3'-Monophosphatmodifikation besaß. (A, B) bpcODNs und pdAdT wurde in Monozyten transfiziert und nach 20 h wurde die Menge IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt.

### 3.5.6 bpcODNs induzieren kein IFN- $\alpha$ in PDC

DNA wird neben der zytosolischen Erkennung über TLR9 detektiert. Dabei stimulieren nicht methylierte CpG-Motive in bakterieller DNA TLR9 [168]. Nach Stimulation mit bestimmten CpG-Motiven produzieren PDC daher große Mengen IFN- $\alpha$  [169]. Bisher wurden in dieser Arbeit Experimente zur zytosolischen DNA-Erkennung in Monozyten durchgeführt, die keinen TLR9 exprimieren [28]. Daher



kann davon ausgegangen werden, dass die gemessene Menge IFN- $\alpha$  unabhängig von TLR9 induziert wurde. Auch wurde das Transfektionreagenz Lipofectamine verwendet, das zusätzlich eine Aufnahme der Nukleinsäure in das Zytosol begünstigt. Jedoch kann das Erreichen der endosomalen Kompartimente durch Nukleinsäuren nach Transfektion mit Lipofectamine nicht ausgeschlossen werden. Es sollte untersucht werden, ob die identifizierten bpcODNs selektiv eine zytosolische DNA-Erkennung ermöglichen oder ob auch TLR9 bpcODNs detektieren kann. Ebenso sollte analysiert werden, ob eine zytosolische Erkennung der bpcODNs in PDC stattfindet. Dazu wurden aus humanen PBMC PDC isoliert und mit pdAdT, CpG 2216 und einer Auswahl von bpcODNs (D3201, D3201 3P, D3250 und D3250 3P) transfiziert oder stimuliert. Zur Stimulation wurde die DNA mit Poly-l-Arginin komplexiert und auf die PDC gegeben. Zur Transfektion wurde Lipofectamine verwendet. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Es wurde beobachtet, dass weder pdAdT in der Lage war, PDC zur Sekretion von IFN- $\alpha$  zu stimulieren, noch die bpcODNs die Produktion von IFN- $\alpha$  induzierten. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob DNA zur Stimulation komplexiert worden war oder ob sie in die PDC transfiziert wurde. Daher kann eine zytosolische als auch eine Erkennung über TLR9 der bpcODNs in den PDC ausgeschlossen werden. CpG 2216, komplexiert mit Poly-l-Arginin und transfiziert mit Lipofectamine, induzierte wie erwartet IFN- $\alpha$  in PDC (Abbildung 3.33). Diese Ergebnisse zeigen, dass PDC nach zytosolischer DNA-Erkennung kein IFN- $\alpha$  produzieren oder dass die DNA das Zytosol in PDC nicht effektiv erreichen kann.



**Abbildung 3.33: bpcODNs induzieren kein IFN- $\alpha$  in PDC.**

Humane PDC wurden isoliert und mit bpcODNs (D3201, D3201 3P, D3250 und D3250 3P), pdAdT bzw. mit CpG 2216 stimuliert bzw. transfiziert. Zur Stimulation wurden ODNs mit Poly-I-Arginin komplexiert und auf die PDC gegeben oder zur Transfektion mit Lipofectamine in die PDC transfiziert. Nach 20 h wurde IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die zytosolische Erkennung langer dsDNA durch kurze, gut definierte und synthetisch herzustellende bpcODNs nachgestellt werden kann. Optimale bpcODNs induzieren in Monozyten vergleichbare Mengen IFN- $\alpha$  wie pdAdT.

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifikation spezifischer Nukleinsäureliganden für Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

Endosomale und zytosolische Rezeptoren, die auf die Erkennung von Viren spezialisiert sind, werden durch die Erkennung viraler Nukleinsäuren aktiviert. Neben der antiviralen angeborenen Immunantwort werden dadurch auch indirekt Mechanismen der adaptiven antiviralen Immunabwehr bestimmt. Mit der Identifizierung von Nukleinsäurestrukturen oder Sequenzen, die über endosomale oder zytosolische PRR erkannt werden, ist es möglich chemisch definierte Agonisten zu synthetisieren. Mit diesen Agonisten kann eine immunstimulierende oder antivirale Wirkung erzielt werden ohne eine Infektion hervorzurufen. So eröffnen sich Möglichkeiten zur gezielten Induktion von Zytokinen, zur Aktivierung bestimmter Zelltypen und somit zur Entwicklung potentieller Immuntherapeutika.

In dieser Arbeit wurden neue immunstimulatorische Nukleinsäuremuster zur Stimulation endosomaler TLRs als auch zytosolischer Rezeptoren identifiziert und Methoden entwickelt, die für eine selektive Stimulation bestimmter PRR nötig sind. Um die Stimulation von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort für einen möglichen klinischen Einsatz zu etablieren, müssen verschiedene Kriterien gewährleistet sein. Einerseits sollten die Oligonukleotide einfach hergestellt und spezifisch erkannt werden. Andererseits müssen diese von der Targetzelle aufgenommen werden und das entsprechende Zellkompartiment erreichen. Daher ist neben der Identifikation selektiver Liganden der Transfer an den Ort der Erkennung durch geeignete Präparate erforderlich. Die Untersuchung eines möglichen Einflusses der Komplexierung von isRNA auf das Zytokinmuster ist entscheidend für eine potentielle Immuntherapie.

#### 4.1.1 Protamin komplexierte isRNA zur Stimulation von TLR7 und TLR8

Da die Rezeptoren der angeborenen Immunität entweder im Zytosol [5, 68] oder in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten [14, 43] lokalisiert sind, kann die Erkennung viraler Nukleinsäuren in verschiedenen Zellkompartimenten stattfinden. Die Nukleinsäure-erkennenden TLRs befinden sich in endosomalen Kompartimenten bestimmter Immunzellen. Daher ist die effektive Aufnahme der Nukleinsäure durch die Zelle und das Erreichen des Endosoms für eine TLR-abhängige Stimulation durch isRNA unumgänglich für eine Stimulation.

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Erkennung von immunstimulierender RNA (isRNA) im Endosom über TLR7 und TLR8 untersucht. TLRs werden restringiert in unterschiedlichen Subtypen von humanen Immunzellen exprimiert [26, 28]. Nach der Stimulation der Zelle sezerniert diese daraufhin bestimmte Zytokine, was einen Rückschluss auf eine erfolgte Erkennung von Nukleinsäuren über den zuständigen Rezeptor zulässt. Während eine Stimulation des humanen TLR7 in PDC zur Produktion großer Mengen IFN- $\alpha$  führt [45, 47], werden überwiegend Monozyten und Makrophagen nach TLR8-Stimulation zur Produktion von Zytokinen wie IL-12 und TNF- $\alpha$  angeregt [47, 51, 132].

Die Zytokine steuern die Immunantwort und sind daher wesentlich für die effektive Beseitigung von Pathogenen. Eine gezielte Stimulation von entweder TLR7 oder TLR8 eröffnet die Möglichkeit, verschiedene Immunzelltypen zu aktivieren und somit das induzierte Zytokinmuster zu beeinflussen. Die durch die Zytokine induzierte Immunantwort könnte somit durch selektive Stimulation von TLR7 oder TLR8 modelliert werden. Um entweder vermehrt TLR7- oder TLR8-spezifische Zytokine zu induzieren, wurde die Stimulation mit verschiedenen isRNA-Sequenzen untersucht. In vergangenen Studien wurde gezeigt, dass einige dieser isRNA-Sequenzen verstärkt über TLR7 erkannt werden, andere dagegen stimulieren überwiegend TLR8 (Hornung et al, unpublizierte Daten [51]).

Durch Formulierung von ssRNA mit geeigneten Reagenzien gelangt die RNA in die endosomalen Kompartimente und kann dort über TLR7 oder TLR8 erkannt werden [47, 48]. Eine Komplexierung von isRNA mit kationischen Peptiden reduziert deren Degradierung und ermöglicht die Aufnahme und die darauf folgende Stimulation. Bisher wurde gezeigt, dass isRNA zusammen mit dem kationischen Peptid Poly-l-Arginin zur Stimulation von TLR7 geeignet ist [48]. Für eine mögliche klinische Anwendung von isRNA zur Stimulation von TLR7 und TLR8 wäre die Verwendung eines bereits etablierten Medikamentes sinnvoll und würde das Risiko eines medizinischen Einsatzes minimieren. Anionische Nukleinsäuren können aufgrund der Ladung mit kationischen Peptiden Komplexe bilden. Zusätzlich zu dem bereits zur Komplexierung etablierten Poly-l-Arginin [48] wurde daher Protamin zur Formulierung von isRNA ausgewählt. In vergangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Komplexierung von CpG-ODN [170] als auch von mRNA [172] oder antisense RNA [173] mit Protamin die Aufnahme der komplexierten Nukleinsäuren in die Zelle gewährleistet.

Protamin ist ein kationisches, Arginin-reiches Peptid, das ähnlich wie Poly-l-Arginin aufgebaut ist. Als Medikament wird Protamin (Valeant) bei einer Heparin-Überdosierung eingesetzt und kann aufgrund der antagonisierenden Eigenschaften die Heparin-Wirkung aufheben. Für den therapeutischen Gebrauch wird es schon

lange Zeit eingesetzt und wurde durch die FDA (Food and Drug Administration) als „sicher“ befunden [174].

In dieser Arbeit wurde zunächst die stimulatorische Aktivität der isRNA 9.2s in Kombination mit Poly-l-Arginin und Protamin untersucht (Abbildung 1.1). Diese isRNA wurde 2005 als TLR7-stimulierende isRNA identifiziert [48]. Da ssRNA im humanen System sowohl über TLR7 als auch über TLR8 erkannt wird [47], wurde angenommen, dass die isRNA 9.2s, die eine komplexe Sequenz besitzt, sowohl TLR7 als auch TLR8 stimulieren kann. Um die Stimulation von TLR7 oder TLR8 zu evaluieren, wurden die Zytokine IFN- $\alpha$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$  und IL-10 nach Stimulation humaner PBMC bestimmt. Eine Erkennung von isRNA durch zytosolische, Nukleinsäure-erkennende PRRs konnte weitgehend ausgeschlossen werden, da die zytosolische RNA-Helikase RIG-I spezifisch das 5'-Triphosphat einer RNA erkennt [36, 37]; MDA-5 dagegen wird durch pl:C oder nach einer Infektion der Zelle mit Picornaviren aktiviert [6, 7]. Die synthetische isRNA 9.2s entsprach diesen Voraussetzungen nicht. Zusätzlich sollte isRNA, die komplexiert mit kationischen Peptiden von den Zellen endozytiert wird, das Endosom erreichen und nicht ins Zytosol gelangen.

Die Experimente zur Erkennung von komplexierter isRNA wurden in humanen PBMC durchgeführt. Da die Erkennung von isRNA über zytosolische Rezeptoren unter diesen Bedingungen sehr unwahrscheinlich ist, konnte die Produktion von IFN- $\alpha$  nach endosomaler Erkennung von isRNA auf die Stimulation von TLR7 in PDC zurückgeführt werden. Die Produktion von IL-12p70 und TNF- $\alpha$  dagegen deutete auf eine Erkennung über TLR8 durch Monozyten und Makrophagen hin [47, 51], da diese myeloiden Zellen den TLR8 exprimieren [26, 28]. Neben den proinflammatorischen Zytokinen IL-12p70 und TNF- $\alpha$ , wurde zusätzlich die Produktion von IL-10 in der Mischpopulation der humanen PBMC untersucht. Dem Zytokin IL-10 wird eine immunregulierende Wirkung zugeschrieben [164-166], die der proinflammatorischen Reaktion und der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-12 entgegenwirken kann [175]. Da IL-10 u. a. von Monozyten/Makrophagen und von T-Zellen produziert wird, könnte die Produktion von IL-10 in der Mischpopulation der humanen PBMC auf eine direkte Erkennung von TLR8 in Monozyten zurückzuführen sein. Ebenso könnte es aufgrund eines sekundären Effekts, bei dem T-Zellen zur Produktion von IL-10 stimuliert werden, produziert werden.

Es zeigte sich, dass die Induktion von Zytokinen mit Protamin komplexierter isRNA möglich war, doch dass interessanterweise die Verwendung von Protamin im Vergleich zu Poly-l-Arginin das induzierte Zytokinmuster durch die verwendete isRNA

9.2s signifikant beeinflusste (Abbildung 3.5). Zusätzlich hatte die Inkubationszeit, in der sich Komplexe aus isRNA und den kationischen Peptiden bildeten, einen wesentlichen Einfluss auf das resultierende Zytokinmuster.

Die isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-l-Arginin, induzierte IFN- $\alpha$  und IL-12p70 in humanen PBMC; Zellen, die mit Protamin komplexierter isRNA stimuliert wurden, produzierten dagegen deutlich weniger IFN- $\alpha$ , während die Menge IL-12p70 gleich blieb (Abbildung 3.5). Die Produktion der Zytokine war abhängig von der Inkubationszeit der isRNA mit dem kationischen Peptid zur Komplexbildung. Eine längere Inkubationszeit (20 min) von isRNA mit dem kationischen Peptid Poly-l-Arginin oder Protamin führte zur Produktion von IL-12p70, während bei sofortiger Zugabe des Stimulationsansatzes zu den Zellen wenig bzw. kein IL-12p70 produziert wurde. Die Induktion von IFN- $\alpha$  war verstärkt, wenn Poly-l-Arginin und isRNA 9.2s sofort nach Zusammengabe auf die humanen PBMC gegeben wurde, jedoch induzierte die isRNA auch IFN- $\alpha$ , wenn sie vor der Stimulation 20 min zusammen mit Poly-l-Arginin inkubiert worden war (Abbildung 3.5). Das durch isRNA induzierte Zytokinmuster schien also abhängig von dem verwendeten kationischen Peptid und der Inkubationszeit zur Komplexbildung zu sein.

Da das Expressionsmuster der Nukleinsäure-detektierenden TLRs zelltypspezifisch sehr variiert [26, 28], könnte einerseits die bevorzugte Internalisierung verschiedener Komplexe durch unterschiedliche Zelltypen eine Erklärung für das variiierende Zytokinmuster sein. Andererseits könnte die Zugänglichkeit und die Struktur der isRNA in den Partikeln die Erkennung über die TLRs beeinflussen. Um Charakteristika der Komplexe zu analysieren, wurden elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt, bei denen die Komplexe aus isRNA und den kationischen Peptiden auf ihre Größe hin analysiert wurden (Abbildung 3.6). Es zeigte sich, dass nach einer Inkubationszeit von 20 min Poly-l-Arginin oder Protamin zusammen mit isRNA Partikel mit einem Durchmesser zwischen 260 und 310 nm gebildet hatten (Abbildung 3.6). Ähnliche Partikelgrößen wurden auch in anderen Studien nachgewiesen, in denen Komplexe von Nukleinsäuren und Protamin untersucht wurden [170, 174]. Obwohl die Protamin-isRNA-Partikel tendenziell größer waren als die mit Poly-l-Arginin gebildeten Partikel, war die Beschaffenheit der runden, gleichförmigen Partikel ähnlich wie die der Poly-l-Arginin-isRNA-Partikel.

Die Charakterisierung der Komplexe, die sich sofort nach Zusammengabe der kationischen Peptide und der isRNA gebildet hatten, wies in Abhängigkeit des kationischen Peptids deutliche Unterschiede auf. Während Poly-l-Arginin zusammen mit isRNA kleine ungleichmäßige Strukturen gebildet hatte (mittlerer Durchmesser: 54 nm  $\pm$  3 nm), formten isRNA und Protamin zu diesem Zeitpunkt noch keine sichtbaren Komplexe (Vergrößerungsfaktor 96000) (Abbildung 3.6). Dennoch kann

nicht ausgeschlossen werden, dass sich winzige Komplexe gebildet hatten, die unter dem Elektronenmikroskop bei dem gewählten Vergrößerungsfaktor nicht zu erkennen waren. In anderen Studien wurde berichtet, dass eine spontane Komplexbildung von Nukleinsäuren und Protamin beobachtet wurde [172, 176], was daraufhin weist, dass sich spontan Komplexe – wenn auch minimaler Größe – bilden können.

Berücksichtigt man die elektronenmikroskopischen Analysen, sieht man einen direkten Zusammenhang zwischen Partikelgröße und dem induzierten Zytokinmuster. Kleine Formationen (Poly-l-Arginin und isRNA), die sich sofort bei Zusammengabe von Poly-l-Arginin und isRNA gebildet hatten, stimulierten die Zellen überwiegend zur Produktion von IFN- $\alpha$ . Das lässt vermuten, dass PDC, die den TLR7 exprimieren [28], kleine Komplexe phagozytieren, während die TLR8-exprimierenden myeloiden Zellen eine effektive Aufnahme dieser Komplexe nicht gewährleisten. Die größeren Partikel, die nach 20 min Inkubationszeit des Stimulationsansatzes mit beiden kationischen Peptiden entstanden, induzierten in humanen PBMC IL-12p70. Das deutet daraufhin, dass myeloide Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, die den TLR8 exprimieren [28], bevorzugt Partikel mit einer Größe zwischen 260 und 310 nm – im Vergleich zu sehr kleinen Komplexen (< 54 nm) – aufnehmen.

Obwohl die Partikel, die mit kationischen Peptiden und isRNA während 20 min gebildet wurden, ähnliche Größen bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme zeigten (Abbildung 3.6 B-E), induzierten die Partikel der mit Poly-l-Arginin komplexierten isRNA wesentlich mehr IFN- $\alpha$  als die mit Protamin komplexierte isRNA (Abbildung 3.5 A). Die Begründung könnte darin liegen, dass auch nach 20-minütiger Inkubationszeit des Stimulationsansatzes bei Poly-l-Arginin kondensierter isRNA zusätzlich zu den größeren Partikeln kleine Komplexe vorlagen, die jedoch bei dieser Vergrößerungsstufe (64000x) der elektronenmikroskopischen Aufnahme nicht zu sehen waren. Eine andere Möglichkeit war, dass zusätzlich zur Partikelgröße ein weiterer Faktor das „Delivery“ der isRNA in die endosomalen Kompartimente oder die Erkennung über den TLR7 beeinflusste. Dazu könnten Oberflächenstrukturen der Partikel oder Zugänglichkeit der komplexierten isRNA für den TLR zählen. Da die Komplexe aufgrund von Ladungsunterschieden von kationischen Peptiden und anionischer RNA entstehen [176], könnte auch die absolute Ladung der Komplexe variieren und die Stimulation oder die Aufnahme beeinflussen.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen hatten gezeigt, dass die isRNA, die mit Protamin oder Poly-l-Arginin komplexiert und 20 min inkubiert wurde, sowohl von Monozyten als auch von PDC aufgenommen wird (Abbildung 3.4). Das zeigt, dass die Aufnahme möglich ist, doch wurden für diese fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen isolierte PDC und Monozyten stimuliert. Dadurch konnte die

Internalisierung der Partikel nicht durch andere Zellen beeinflusst werden. Für vorherige Stimulationsversuche wurde die 10-fache Menge der PBMC ( $4 \times 10^5$ /Vertiefung) ausgesät, verglichen mit der Zelldichte der PDC ( $4 \times 10^4$ /Vertiefung) während der Stimulation für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Da PBMC nur etwa einen Anteil von 0,5 % PDC besitzen, lag bei den isolierten PDC pro Zelle eine deutlich größere Menge Nukleinsäurepartikel zur Aufnahme vor, wodurch diese begünstigt werden könnte. Es wäre denkbar, dass anderen stark phagozytierende Zelltypen wie z.B. Makrophagen, DCs oder NK-Zellen in der Mischpopulation der PBMC bevorzugt oder schneller die größeren Partikel aufnehmen (20 min Inkubation) und daraufhin diese den PDC nicht mehr zur Aufnahme zur Verfügung stehen. Das würde die Produktion der sehr geringen Mengen IFN- $\alpha$  durch Protamin komplexierte isRNA erklären.

#### 4.1.2 Beeinflussung des Zytokinmusters durch Sequenzmotive der isRNA

Um zu untersuchen, ob zusätzlich zur Partikelgröße bzw. Beschaffenheit der Partikel die Sequenz der isRNA in Kombination mit Poly-l-Arginin oder Protamin einen Einfluss auf eine TLR7- oder TLR8-spezifische Erkennung hat, wurde die immunstimulatorische Aktivität verschiedener isRNAs untersucht (Tabelle 3.1). Während lange ssRNA mit unterschiedlichen Sequenzen TLR7 und TLR8 stimulieren kann [47], wird beim Einsatz kurzer isRNAs eine sequenzspezifische Erkennung von TLR7 oder TLR8 offensichtlicher. So wurde 2005 beschrieben, dass isRNA (19 nt) sequenzspezifisch über TLR7 erkannt wird [48]. In diesen Untersuchungen wurden Sequenzen gefunden, die nach TLR7-Stimulation viel IFN- $\alpha$  in PDC induzierten, andere dagegen waren deutlich schwächere TLR7-Stimuli [48]. Eine Stimulation von TLR8 durch isRNA wurde in diesen Studien nicht untersucht. Lange Zeit war eine selektive Stimulation von TLR7 und TLR8 nur durch synthetische Moleküle möglich [42] bis 2008 ein selektiver, auf RNA basierender TLR8-Ligand identifiziert wurde [51]. Bisher wurde jedoch noch kein auf RNA basierender Ligand gefunden, der TLR7 stimuliert ohne in humanen PBMC TLR8-abhängige Zytokine zu induzieren.

In einer Studie, bei der die stimulatorische Aktivität von ORNs (Oligoribonukleinsäuren) mit allen möglichen 4 nt langen Sequenzmotiven in nicht stimulatorischer Umgebung (Polyadenosin) untersucht wurden, zeigte sich, dass unterschiedliche Motive spezifische Zytokinmuster induzierten (Hornung et al., unpublizierte Daten). Während einige isRNA-Motive in PBMC überwiegend die Produktion von IFN- $\alpha$  induzierten, produzierten humane PBMC, die mit anderen RNA-Motiven stimuliert wurden, tendenziell mehr IL-12p70 (Hornung et al.,



unpublizierte Daten). Bekannt ist, dass nach Stimulation von TLR7 in PDC IFN- $\alpha$  produziert wird, nach TLR8-Stimulation in Monozyten dagegen IL12-p70 [47, 51]. Daher wurde angenommen, dass es einige isRNA-Sequenzen gibt, die besser von TLR7 erkannt werden, andere dagegen stimulieren bevorzugt TLR8.

In dieser Arbeit wurde mit ausgewählten isRNAs, die 4 nt-lange immunstimulatorische Motive enthielten (Hornung et al., unpublizierte Daten), humane PBMC stimuliert. Dabei wurde die sequenzabhängige Zytokininduktion und zusätzlich der Einfluss des für die Komplexierung verwendeten kationischen Peptids auf das induzierte Zytokinmuster untersucht.

Als Modell-isRNAs wurden Motive ausgewählt, die entweder als überwiegend TLR7-stimulierend (7186.1; 7186.2) oder TLR8-stimulierend (7681.1; 7682.1) beschrieben worden waren (Hornung et al., unpublizierte Daten). Zusätzlich wurde die stimulatorische Aktivität einer isRNA untersucht, die Motive zur Stimulation von TLR7 und TLR8 (7181.1) besaß (Tabelle 3.1). Die RNA 7989.1 war eine Polyadenosin-RNA, die in Bezug auf die induzierten Zytokine inert war und daher als Negativkontrolle verwendet wurde. Alle hier verwendeten ORNs hatten eine Länge von 19 nt.

Die Stimulation von humanen PBMC mit den oben genannten isRNA-Sequenzen, komplexiert mit Protamin oder Poly-l-Arginin (unterschiedliche Inkubationszeiten des Stimulationsansatzes), zeigten, wie schon bei der isRNA 9.2s beobachtet, dass Poly-l-Arginin komplexierte isRNA wesentlich effektiver IFN- $\alpha$  induzierte als die mit Protamin komplexierte isRNA (Abbildung 3.7). Es wurde deutlich, dass nicht alleine die Sequenz ausschlaggebend für das induzierte Zytokinmuster war, sondern dass zusätzlich das kationische Peptid sowie die Inkubationszeit mit der isRNA, die Produktion der unterschiedlichen Zytokine beeinflusste. Während die als TLR7-spezifisch beschriebene isRNA 7186.1 auch die TLR8-abhängigen Zytokine IL-12p70 und TNF- $\alpha$  induzierte, schien die isRNA 7186.2 hauptsächlich über TLR7 erkannt zu werden, da sie hauptsächlich IFN- $\alpha$  induzierte (Abbildung 3.7 B-C; Abbildung 3.8 B-C). Diese isRNA induzierte nur sehr geringe Mengen IL-12p70, TNF- $\alpha$  und IL-10.

Die Stimulation mit den als TLR8-spezifisch beschriebenen isRNAs 7681.1 und 7682.1 zeigte erneut, dass die Motiv-abhängige Stimulation der isRNA keine absolut spezifische Stimulation von TLR8 versprach. Jedoch wurde beobachtet, dass die Komplexierung dieser isRNAs, die als TLR8-stimulierend beschrieben worden waren (Hornung et al., unpublizierte Daten), mit Protamin und einer 20-minütigen Inkubationszeit des Stimulationsansatzes zur Komplexbildung die selektive Induktion von TLR8-spezifischen Zytokinen zur Folge hatte (Abbildung 3.7 D-E; Abbildung 3.8 D-E).

Die isRNA 7181.1, die zwei stimulatorische Motive enthielt, eines zur Stimulation von TLR7 und eines zur Stimulation von TLR8, induzierte ein ähnliches Zytokinmuster wie es die isRNA 9.2s mit der komplexen Sequenz induziert hatte (Abbildung 3.7 A; Abbildung 3.8 A). Dagegen war die isRNA 7989.1, die kein stimulatorisches Motiv enthielt, inert und induzierte keine Zytokine (Abbildung 3.7 F; Abbildung 3.8 F). Das verdeutlicht, wie schon zuvor gezeigt (Hornung et al., unpublizierte Daten), dass die Sequenz ausschlaggebend für die Induktion von Zytokinen ist. Jedoch ist eine selektive Stimulation von entweder TLR7 oder TLR8, aufgrund der gewählten Sequenz, mit den hier getesteten 4 nt-Sequenzmotiven kaum möglich. Es zeigte sich jedoch, dass zusätzlich zur Sequenz der isRNA, das Präparat, das zur Komplexierung genutzt wird sowie die Inkubationszeit entscheidend das induzierte Zytokinmuster beeinflusst.

Die hier verwendeten isRNA-Sequenzen enthalten alle Uridin-, Guanotin- und auch Adenosinnukleotide. Vergleicht man diese Sequenzen mit der zuvor identifizierten ssRNA zur selektiven Stimulation von TLR8, ist auffällig, dass diese Sequenz ausschließlich aus Adenosin- und Uridinnukleotiden besteht [51]. Eine bevorzugte Aufnahme der TLR8-stimulierenden AU-reichen RNA durch Monozyten ist unwahrscheinlich, da alle in diesen Studien getesteten ssRNAs mit Dotap komplexiert wurden und dadurch eine gleiche und sequenzunabhängige Aufnahme gewährleistet sein sollte.

Da IL-10 ein immunregulierendes Zytokin ist [164-166], wurde ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Zytokinproduktion (IFN- $\alpha$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$ ) und IL-10 vermutet. In dieser Arbeit konnte jedoch kein direkter Bezug zwischen der IL-10- und der IFN- $\alpha$ -Produktion beobachtet werden (Abbildung 3.7; Abbildung 3.8). Jedoch schien die durch isRNA induzierte Menge IL-10 mit der Produktion der TLR8-abhängigen, proinflammatorischen Zytokine zu korrelieren. Das deutet darauf hin, dass entweder eine direkte TLR8-abhängige IL-10-Produktion durch z.B. Monozyten stattfand oder dass andere Zytokine (TLR8-abhängige Zytokine) wie IL-12p70 und TNF- $\alpha$  die Produktion von IL-10 induzierten. Da die Experimente mit humanen PBMC durchgeführt wurden, könnten indirekte Effekte durch Zytokinproduktion auf einen großen Anzahl verschiedener Zelltypen wirken. Z.B. ist IL-12p70 ein Zytokin das Th1-Antworten induziert [160], IL-10 dagegen wirkt entgegen einer Th1-Antwort [163] und wird vermehrt von Th2 Zellen produziert. Durch das Zusammenspiel dieser Zytokine könnte die Th1-Antwort gesteuert und reguliert werden. Jedoch kann aufgrund der durchgeführten Zytokinmessungen keine letztendliche Aussage über den Einfluss des induzierten Zytokinmusters in Bezug auf die adaptive Immunantwort gemacht werden, da dazu ein viel breiteres Spektrum an Zytokinen untersucht werden müsste.

Erst durch Experimente mit selektierten Zellen bzw. durch Depletion bestimmter Zelltypen könnten genauere Aussagen über das induzierte Zytokinmuster und die dafür verantwortliche Zellen gemacht werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die 4 nt lange Motive in einer ansonsten inerten Umgebung zwar Tendenzen zur Induktion von TLR7- oder TLR8-spezifischen Zytokinen haben, doch dass alleine aufgrund der Sequenz von einzelsträngiger isRNA keine selektive Stimulation von TLR7 und TLR8 erfolgen kann. Ein Zusammenspiel von kationischem Peptid, der isRNA-Sequenz und der Inkubationszeit, lässt erst eine Aussage zur selektiven Induktion spezifischer Zytokine zu. Je nach Anforderung könnte jedoch durch Kombination von geeigneter isRNA-Sequenz, kationischem Peptid und Inkubationszeit des Stimulationsansatzes ein gewünschtes Zytokinmuster induziert werden, bei dem das Verhältnis von TLR7- und TLR8-spezifischen Zytokinen beeinflusst und die folgende Immunantwort modelliert werden kann.

#### **4.1.3 Stimulation mit isRNA komplexiert mit Protamin Valeant**

Bisher wurde zur Etablierung der Stimulation von humanen PBMC die isRNA mit der Chemikalie Protamin von Sigma durchgeführt. Der Einsatz von Protamin komplexierter RNA sollte zusätzlich mit dem Medikament Protamin Valeant etabliert werden. Eine Möglichkeit für einen therapeutischen Einsatz von isRNA wäre eine *ex vivo*-Applikation von isRNA, und ein anschließender adoptiver Transfer der stimulierten Zellen. Vorteile dieser Applikationsform wären, dass die komplexierte isRNA *in vitro* nur auf die gewünschten Zellen trifft, und dass ausgewählte autologe, nun stimulierte Zellen dem Patienten zurückgegeben werden können.

Dieses System sollte durch Stimulation humaner PBMC gesunder Probanden etabliert werden. Um eine effiziente Stimulation zu gewährleisten und die Zellen zur Sekretion großer Mengen von Zytokinen zu stimulieren, wurde sowohl die Endkonzentration von der isRNA als auch die des Protamins erhöht. In den vorherigen Experimenten betrug die Endkonzentration der isRNA für die Stimulation der Zellen 1  $\mu\text{g/ml}$ , nun wurde die Konzentration auf 10  $\mu\text{g/ml}$  erhöht.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Induktion von IFN- $\alpha$  und IL-12p70 durch isRNA 9.2s, komplexiert mit Protamin Valeant, möglich war (Abbildung 3.9). Die durch Protamin Valeant komplexierte isRNA 9.2s induzierte Menge der Zytokine war erhöht, verglichen mit der Menge der Zytokine die durch Protamin (Sigma) komplexierte isRNA induziert wurden.

Überraschenderweise induzierte in diesen Konzentrationen die mit Protamin

komplexierte isRNA 9.2s, zusätzlich zu IL-12p70, IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.9). Das lässt vermuten, dass tatsächlich die Aufnahme der mit Protamin komplexierten isRNA 9.2s durch PDC in Abhängigkeit der verfügbaren Partikel variiert.

Hohe Konzentrationen der komplexierten isRNA verhindern eine Limitation der Aufnahme und könnten daher zu größeren Mengen IFN- $\alpha$  in der Mischpopulation der PBMC führen. Genauere Partikeleigenschaften der mit Protamin Valeant komplexierten isRNA wurden nicht untersucht, doch könnten Größe, Form, Zugänglichkeit der isRNA für die TLRs, Oberflächenbeschaffenheit und Ladung auch hier einen Einfluss auf die Aufnahme und das induzierte Zytokinprofil haben. Die Zusammensetzung des Medikaments Protamin Valeant (Protaminhydrochlorid, Methyl-4-hydroxybenzoat, Propyl-4-hydroxybenzoat, Salzsäure 25% zur pH-Wert-Einstellung) ist für einen therapeutischen Einsatz optimiert. Zusätzliche Komponenten, die in diesem Medikament enthalten sind, könnten ebenfalls die Komplexbildung, Aufnahme und Stimulation beeinflussen. Eine selektive Stimulation von TLR7 und TLR8 durch isRNA und Protamin ist also abhängig von vielen Faktoren. Obwohl nicht auszuschließen ist, dass das Zytokinmuster entscheidend durch Sequenz, Inkubationszeit und Konzentration beeinflusst werden kann, würde eine Aufreinigung von bestimmten Zelltypen aus PBMC und deren Stimulation, eine gezielte therapeutische Anwendung vereinfachen. Um also selektiv TLR7 oder TLR8 zu stimulieren, könnten für eine *ex vivo*-Stimulation und einen anschließenden adoptiven Transfer entsprechende Zellen (PDC für TLR7 und Monozyten für TLR8) aus PBMC isoliert und stimuliert werden.

#### 4.2 Die Erkennung von G:U-Basenpaaren in RNA-Sekundärstruktur

Vergangene Untersuchungen haben gezeigt, dass kleinmolekulare Imiquimod-Derivate selektiv TLR7 oder TLR8 stimulieren können [42, 45]. Daher ist naheliegend, dass es zusätzlich zu der Sequenz ein unterschiedliches Erkennungsmuster von TLR7 und TLR8 gibt, das vollkommen unabhängig von den „Transfer“-Bedingungen spezifisch erkannt wird. Lineare Sequenzmotive in ORNs werden von TLR7 und TLR8 erkannt [24, 47, 177]. Natürliche RNA – einschließlich viraler RNA – formt jedoch spontan Sekundärstrukturen. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Sekundärstrukturen auf die Erkennung durch endosomale Rezeptoren genauer untersucht. Vorherige Studien hatten gezeigt, dass TLR7 dsRNA in Form von siRNA erkennen kann, doch häufig war der Doppelstrang weniger aktiv verglichen mit einem Einzelstrang der siRNA [48, 178-180].

Da lange virale ssRNA nicht einzelsträngig vorliegt, sondern Sekundärstrukturen formt bei denen doppelsträngige Bereiche sowie einzelsträngige Schleifen gebildet werden, wurde die endosomale Erkennung von dsRNA untersucht. Neben den Watson-Crick-Basenpaaren können sich in der Sekundärstruktur von ssRNA G:U-Basenpaare ausbilden. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu pU alleine die IFN- $\alpha$ -Produktion nach der Erkennung von einem pG:U-Doppelstrang in PBMC und auch in PDC deutlich anstieg (Abbildung 3.10). Da eine Stimulation der gleichen Zelltypen mit pA:U dagegen kaum IFN- $\alpha$  induzierte, wurde aus diese Ergebnissen geschlossen, dass die große Aktivität der dsRNA pG:U nicht auf die höhere Stabilität zurückzuführen war. Weitere Untersuchungen verdeutlichten, dass überraschenderweise auch einzelne G:U-Basenpaare in doppelsträngigen Bereichen IFN- $\alpha$  in humanen PBMC induzierten (Abbildung 3.11; Abbildung 3.12). Bisherige Studien hatten gefunden, dass lange virale dsRNA sowohl TLR3 [21] als auch die zytosolische Helikase MDA-5 stimulierte [6, 7]. Für diese Studien wurde pl:C als Surrogat für dsRNA verwendet, jedoch wurde nicht die stimulatorische Aktivität anderer dsRNAs untersucht. Dennoch galten sowohl TLR3 als auch MDA-5 zusammen mit PKR bisher als Rezeptoren, die dsRNA erkennen.

Da in den hier durchgeführten Stimulationsexperimenten die dsRNA mit Poly-l-Arginin komplexiert wurde, war eine Erkennung der G:U-Basenpaare im Endosom der Zelle naheliegend. Durch Experimente mit Chloroquin – das die Ansäuerung von Endosomen und dadurch die Erkennung von Nukleinsäuren über endosomale Rezeptoren verhindert [44] – konnte diese Annahme bestätigt werden (Abbildung 3.14 A). Chloroquin inhibierte die Induktion von IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit dsRNA, die G:U-Basenpaare enthielt.

Da die Rezeptoren, die zur Nukleinsäurerkennung in den Endosomen vorkommen, sich auf TLR3, TLR7/8 und TLR9 beschränken, wurde angenommen, dass einer dieser Rezeptoren zuständig für die Erkennung der G:U-Basenpaare sei. Neben den PBMC produzierten auch mit G:U-Basenpaaren stimulierte PDC IFN- $\alpha$ . Da PDC ausschließlich TLR7 und TLR9 als endosomale Nukleinsäure-erkennende TLRs exprimieren [26, 28], musste einer dieser TLRs für die Erkennung zuständig sein. TLR9 erkennt CpG-DNA [168], daher war die Erkennung von G:U-Basenpaaren in einer dsRNA über TLR9 unwahrscheinlich. Bisher wurde TLR7 als Sensor für ssRNA beschrieben [47] und ebenso wurde gezeigt, dass doppelsträngige siRNA sequenzspezifisch TLR7-abhängig IFN- $\alpha$  in PDC induziert [36, 178-180]. Das deutet darauf hin, dass die Erkennung der G:U-Basenpaare in einer dsRNA TLR7-abhängig sein könnte. Diese Annahme wurde durch Experimente mit TLR7-defizienten Maus-Flt3-L-PDC bestätigt (Abbildung 3.14 B).

#### 4.2.1 TLR7 und TLR8 in Mensch und Maus und die Erkennung von RNA-Motiven

Zusätzlich zu den bisher bekannten TLR7/8-Liganden wurde in dieser Arbeit eine RNA-Struktur identifiziert, die TLR7-abhängig Maus-Flt3-L-PDC zur Produktion von IFN- $\alpha$  stimulierte. Im humanen System – anders als in der Maus – ist neben dem TLR7 auch der TLR8 aktiv [47]. Beide TLRs wurden bisher als Rezeptoren für virale ssRNA beschrieben [46, 47]. Das Expressionsprofil von TLR7 in der Maus ist in den verschiedenen Immunzellen viel breiter verteilt als im Menschen. Die Expression von TLR7 im Menschen beschränkt sich auf PDC und B-Zellen, TLR8 kompensiert im humanen System das Fehlen von TLR7 in Zellen wie Monozyten, Makrophagen und DCs. Nach Stimulation des humanen TLR7 oder TLR8 werden unterschiedliche Zytokinmuster induziert [42, 47, 51] (Abbildung 3.2), was auf funktionelle Unterschiede zwischen TLR7 und TLR8 hinweist. Nach Stimulation von TLR7 wird in Maus-PDC ein sehr viel größeres Spektrum an Zytokinen produziert als durch Erkennung von TLR7-Liganden durch humane Zellen. Nach Stimulation des humanen TLR7 in PDC wird überwiegend Typ I IFN produziert [42, 51, 181]. Dagegen führt eine Stimulation von TLR8 in humanen Monozyten zur Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12p70 [42, 51] (Abbildung 3.2), die in der Maus auch durch TLR7-Stimulation induziert werden. Diese Unterschiede von TLR7 und TLR8 in Maus und Mensch erschweren die Suche nach selektiven Stimuli, da keine funktionellen Experimente mit TLR8-defizienten Mäusen durchgeführt werden können. So wurde eine selektive Stimulation von TLR7 bisher nur durch die Identifikation verschiedener synthetischer Moleküle beschrieben [42].

Bei der Untersuchung der induzierten Zytokinprofile durch verschiedene isRNA-Sequenzen wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass die sequenzabhängige Zytokinproduktion zwischen TLR7- und TLR8-spezifischen Zytokinen variiert, doch waren die meisten Sequenzen nicht zur selektiven Stimulation von TLR7 oder TLR8 geeignet (Abbildung 3.7; Abbildung 3.8). Eine selektive Stimulation von TLR7 und TLR8 mit unterschiedlichen Motiven einer isRNA konnte erst durch Kombination der isRNA-Sequenz mit verschiedenen kationischen Peptiden (Poly-l-Arginin und Protamin) sowie durch variierende Inkubationszeiten des Stimulationsansatzes erzielt werden. 2008 wurde ein einzelsträngiges AU-reiches ORN identifiziert, das selektiv TLR8-spezifische Zytokine in humanen PBMC induzierte und keine TLR7-stimulierende Aktivität zeigte [51]. Dieses ORN besaß in der Sequenz weder Cytosin noch Guanodin. GU-reiche ORNs dagegen induzierten verstärkt TLR7-abhängige Zytokine, doch war diese Stimulation nicht selektiv, sondern führte zusätzlich zur

Aktivierung von TLR8 [51]. Da die Erkennung von G:U-Basenpaaren in Flt3-L-Maus-PDC abhängig von TLR7 war (Abbildung 3.14 B), sollten Untersuchungen in humanen TLR7-exprimierenden PDC und TLR8-exprimierenden Monozyten durchgeführt werden, um zwischen einer TLR7- und TLR8-Stimulation im humanen System unterscheiden zu können.

#### 4.2.2 Ein selektiver Ligand für TLR7

Die stimulatorische Aktivität der G:U-Basenpaare wurde durch Stimulation von PDC oder Monozyten mit einer langen RNA (entweder pU oder pG; ca. 5000 bp), an die kurze ORNs hybridisiert wurden, und sich so einzelne G:U-Basenpaare ausbildeten (pU+R1602 oder pG+R805), untersucht (Abbildung 3.11; Abbildung 3.12 A). Uridinreiche RNA wurde zuvor als TLR7-Ligand beschrieben [50], doch induzierte pU ebenso TLR8-spezifische Zytokine in humanen Monozyten; pG dagegen war inert und induzierte weder IFN- $\alpha$  noch IL-12p70 (Abbildung 3.16).

Um die TLR7- und TLR8-spezifische stimulatorische Aktivität im humanen System zu unterscheiden, wurden TLR7-exprimierende PDC und TLR8-exprimierende Monozyten [26, 28] stimuliert und entweder IFN- $\alpha$  (PDC) oder IL-12p70 (Monozyten) gemessen. Interessanterweise induzierten beide Liganden IFN- $\alpha$  in PDC, jedoch nur pU+R1602 induzierte IL-12p70 in den Monozyten, was auf eine TLR8-Stimulation schließen lässt (Abbildung 3.16). Verglichen mit der Menge IL-12p70, die durch pU induziert wurde, war die Menge IL-12p70, induziert durch pU+R1602, deutlich geringer. Da die Hybridisierung der Adenosin-reichen ORNs mit der pU-RNA nicht zu einem vollständigen Doppelstrang führen muss, könnten einzelsträngige Bereiche im pU-Strang eine TLR8-Stimulation begründen. Doppelsträngige Bereiche dagegen scheinen nicht über TLR8 erkannt zu werden. Einzig die G:U-Basenpaare in einem ansonsten nicht stimulatorischen Kontext (z.B. pG+R805) – wie durch Stimulation mit pG+R805 gezeigt – induzierten kein IL-12p70 und wurden daher nicht über TLR8 erkannt. Bekannte RNA-Liganden, die zuvor als TLR7-stimulierend beschrieben worden waren (R1917, U<sub>21</sub>, isRNA 9.2s [48-50]), induzierten sowohl IFN- $\alpha$  als auch IL-12p70 und waren daher TLR7/8-Liganden (Abbildung 3.16). Durch die TLR7-abhängige Erkennung der G:U-Basenpaare in einer nicht stimulatorischen Umgebung wurde neben den synthetischen Molekülen [42] erstmals ein selektiver, auf RNA-basierender TLR7-Ligand identifiziert.

Die IFN- $\alpha$  Induktion des hier identifizierten TLR7-Ligandens (pG+R805) wurde auch *in vivo* in der Maus bestätigt (Abbildung 3.15). Intravenös injiziertes pG+R805 zeigte eine ähnliche zeitabhängige IFN- $\alpha$ -Induktion wie die Applikation gleicher Mengen isRNA 9.2s.

Die physiologische Bedeutung für eine Unterscheidung zwischen TLR7- und TLR8-Erkennung im humanen System ist noch nicht eindeutig geklärt. Das Genom von ssRNA-Viren bildet Sekundärstrukturen, in denen doppelsträngige Bereiche wie auch einzelsträngige Schleifen („Loops“) vorkommen können. Die „Loops“ bestehen aus einzelsträngigen Bereichen, die möglicherweise über TLR8 erkannt werden könnten. In den doppelsträngigen Bereichen entstehen neben den Watson-Crick-Basenpaaren (G:C; A:U) vereinzelt G:U-Basenpaare, die nach Erkennung durch TLR7 IFN- $\alpha$  induzieren. Es ist unklar, weshalb die Erkennung viraler ssRNA und deren Sekundärstrukturen in endosomalen Kompartimenten beim Menschen über zwei verschiedene TLRs läuft. Sekundärstrukturen von viraler RNA mit vielen G:U-Basenpaaren würden vermehrt TLR7 stimulieren, während lineare Strukturen vermutlich vermehrt TLR8-abhängige Zytokine induzieren würden. Da die Sekundärstruktur von viraler ssRNA jedoch weder einen vollständigen Doppelstrang bildet noch vollkommen linear vorliegt, sollte im physiologischen Zustand nach Erkennung viraler RNA über TLRs ein Gleichgewicht zwischen TLR7- und TLR8-spezifischen Zytokinen gewährleistet sein.

Ebenso stellt sich die Frage, weshalb zusätzlich zu G:U-Basenpaaren in RNA-Sekundärstrukturen ssRNA sequenzabhängig erkannt wird [48, 180] und auch Uridinreiche RNA [50] TLR7 stimuliert. Die Voraussetzung für TLR7-stimulierende ssRNA wurde zuerst durch GU-reiche ssRNA beschrieben [47]. Diese RNAs waren lange virale ssRNAs, die in ihren Sekundärstrukturen G:U-Basenpaarungen ausbilden könnten. Auch kurze GU-reiche isRNAs könnten durch Zusammenlagerung G:U-Basenpaare ausbilden, die dann zur Stimulation von TLR7 führen könnten. Dennoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nicht alleine die Anwesenheit von Uridin und Guanosen ausreichend für die Induktion von IFN- $\alpha$  nach Erkennung über TLR7 war, sondern dass ein G:U-Basenpaar in einem – wenn auch kurzen – doppelsträngigen Bereich ausgebildet werden muss, um IFN- $\alpha$  zu induzieren (Abbildung 3.20). Das würde auch die von Forsbach und Kollegen beobachteten Ergebnisse erklären, die durch das Fehlen von Guanosen in einer AU-reichen Sequenz zeigten, dass diese ssRNA TLR8-spezifisch erkannt wird [51]. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass ssRNA, die alleine aus Uridinnukleotiden besteht, ausreicht, TLR7 zu stimulieren [46]. In einer Sekundärstruktur viraler RNA ist unwahrscheinlich, dass lange Uridinsequenzen einzelsträngig vorliegen, denn Uridin paart präferentiell mit Adenosin oder Guanosen. Durch Bindung von Guanosinnukleotiden an Uridinreiche Sequenzen würden G:U-Basenpaare entstehen und die stimulatorische Aktivität dadurch verstärkt werden, dagegen würde die Hybridisierung Adenosinreicher Sequenzen die stimulatorische Aktivität von Uridinreicher RNA deutlich verringern. Da RNA-Liganden bei einer Stimulation in einer wesentlich höheren Konzentration in



die Zelle gelangen als bei einer viralen Infektion, sollte durch ein Titrationsexperiment untersucht werden, ob G:U-Basenpaare in einer geringen Frequenz, wie sie in der Sekundärstruktur viraler RNA vorkommen könnten, ausreichen, TLR7-abhängig IFN- $\alpha$  zu induzieren. Das Verhältnis von pG+R805 wurde variiert, wobei R805 in sinkenden Mengen zu pG gegeben wurde. Diese Untersuchungen zeigten, dass schon die Anwesenheit von einem G:U-Basenpaar in etwa jeder 160. Base sehr viel IFN- $\alpha$  induzierte (Abbildung 3.12 B). Das verdeutlicht, dass wenige G:U-Basenpaare in einer Sekundärstruktur viraler RNA eine potente Stimulation von TLR7 zur Folge haben. Dadurch wird die Hypothese bestärkt, dass G:U-Basenpaare für eine Erkennung viraler RNA durch TLR7 möglicherweise ausschlaggebend sind.

Stimulationversuche mit ORNs, die aufgrund der Sequenz „Hairpin“-Strukturen formen und dabei in doppelsträngigen Bereichen G:U-Basenpaare ausbilden (Abbildung 3.18), zeigten, dass die Anwesenheit von G:U-Basenpaaren in einem kurzen doppelsträngigen Bereich die minimale Anforderung an eine TLR7-Aktivierung ist (Abbildung 3.19). In vorherigen Studien wurde beschrieben, dass GU-reiche RNA TLR7 und TLR8 stimuliert [47]. Die in dieser Arbeit verwendeten „Hairpin“-formenden ORNs enthielten jeweils nur ein Uridinnukleotid und mehrere Guanosinnukleotide (Abbildung 3.18). Es stellte sich heraus, dass die Ausbildung von G:U-Basenpaaren entscheidend für eine TLR7-Stimulation war, wenn es sich nicht um eine Uridin-reiche Sequenz handelte. Alleine die Anwesenheit von Guanosin und einem Uridinnukleotid, die aufgrund der benachbarten Sequenz keine G:U-Basenpaare ausbilden konnten, reichte nicht aus IFN- $\alpha$  zu induzieren (Abbildung 3.20). So scheint es, dass zur TLR8-Aktivierung eine größere Anzahl Uridinnukleotide in der Sequenz der RNA enthalten sein muss, doch dass eine selektive TLR7-Stimulation schon durch einzelne G:U-Basenpaare gewährleistet werden kann. Auch wenn bisher die Funktionalität der Unterscheidung von TLR7 und TLR8 im Menschen noch nicht vollständig verstanden ist, eröffnet die selektive Stimulation dieser TLRs jedoch neue Möglichkeiten für eine potentielle Immuntherapie. Ein Einsatz eines spezifischen TLR7-Stimulus führt zur Produktion von IFN- $\alpha$  in PDC, ohne durch Zytokine wie IL-12p70 eine Th1-Antwort zu induzieren.

### 4.3 Stimulation von TLR7 mit „nackter“ RNA

Die Stimulation von TLR7 und TLR8 mit ssRNA ist abhängig von der Verwendung von Transfektionsreagenzien oder kationischen Peptiden zur Komplexierung [47, 48], die eine effektive Aufnahme gewährleisten und die Degradierung der RNA

verhindern. CpG-DNA im Vergleich zu RNA, kann auch ohne Komplexierung von Zellen aufgenommen werden und diese stimulieren. Das liegt vermutlich daran, dass DNA eine wesentlich höhere Stabilität aufweist als RNA, und dass RNA von den überall vorkommenden RNAsen sehr schnell degradiert wird. Ebenso sind CpG-ODNs häufig mit PTO-Bindungen modifiziert, wodurch deren Stabilität zusätzlich erhöht wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der hier identifizierte selektive TLR7-Ligand (pG+R805), der ein Phosphodiesterückgrat besitzt, ohne Komplexierung effektiv PDC stimulieren kann und IFN- $\alpha$  induziert. Die Aufnahme der Phosphodiester-RNA pG+R805 wurde fluoreszenzmikroskopisch bestätigt, R805 alleine oder zusammen mit pA konnte dagegen nicht aufgenommen werden (Abbildung 3.21). Das ließ vermuten, dass durch pG die Aufnahme des hier identifizierten Agonsiten ermöglicht wird. Da Guanosin bekannt für die Ausbildung von Tetradenstrukturen (antiparallele Quadruplexe) ist [182], könnten ähnliche Strukturen einerseits die Stabilität der RNA (pg+R805) vergrößern und andererseits partikelartige Formationen ausbilden, die die Aufnahme begünstigen. Das Phänomen der G-Tetradenbildung wird auch u. a. beim Prototyp eines CpG-As - dem CpG 2216 - beobachtet, dass am 5'- und am 3'-Ende Guanosin-reiche Sequenzen besitzt, die auch dort zur Bildung von G-Tetraden führen. Dadurch bilden sich partikelartiger Komplexe, die die Aufnahme begünstigen und in PDC große Mengen IFN- $\alpha$  induzieren.

Verglichen mit pG+R805 induzierte kürzere pG-RNA (42 nt, 21 nt, 8 nt) zusammen mit R805 (U<sub>42</sub>+R805, U<sub>21</sub>+R805, U<sub>8</sub>+R805) deutlich weniger IFN- $\alpha$ , wenn sie nicht-komplexiert in den Zellkulturüberstand gegeben wurde (Abbildung 3.22). Dies könnte durch eine weniger effektive Tetradenbildung, daraus folgend eine verminderte Aufnahme, und eine geringere Stabilität der Stimuli begründet sein. Dennoch ist die Stimulation von PDC mit pG+R805 ohne vorherige Komplexierung ein wichtiger Schritt zur TLR7-Stimulation. Eine Stimulation ohne die Verwendung eines zusätzlichen Präparats zur Komplexierung oder zur Transfektion würde einen therapeutischen Einsatz des hier identifizierten TLR7-Ligandens und dessen Applikation vereinfachen.

#### 4.4 Erkennung von langer dsRNA im Zytosol

Neben der endosomalen Erkennung von Nukleinsäuren über die TLRs werden Nukleinsäuren viralen Ursprungs zusätzlich im Zytosol von Zellen erkannt. Im gesunden Zustand einer Zelle sollte im Endosom weder DNA noch RNA vorliegen. Im Zytosol der Zelle dagegen kommt „Selbst“-RNA z.B. in Form von mRNA, tRNA

und rRNA vor, dagegen ist DNA nur im Zellkern zu finden. Die Strategie der Wirtszelle, pathogene Nukleinsäuremuster zu detektieren, beruht auf der Erkennung von Strukturen, die in viraler RNA vorkommen, in zytosolischer „Selbst“-RNA jedoch nicht zu finden sind. Daher ist die Erkennung viraler RNA im Zytosol vermutlich von bestimmten, virusspezifischen Mustern abhängig, die in „Selbst“-RNA, die den Zellkern verlässt, nicht vorkommt. Auch kann die Unterscheidung von „Selbst“-RNA und „Fremd“-RNA durch posttranskriptionale Modifizierungen und Prozessierung der „Selbst“-RNA vor Verlassen des Nukleus unterstützt werden.

Ein Erkennungsmuster, das die Detektion von viraler RNA im Zytosol über RIG-I ermöglicht, wurde 2006 identifiziert [36, 37]. Hierbei handelt es sich um das 5'-Triphosphat, das in der genomischen RNA vieler Negativ-Strang-Viren enthalten ist. Auch „Selbst“-RNA besitzt nach der Synthese ein 5'-Triphosphatende, doch wird dieses z.B. bei mRNA vor Verlassen des Nukleus mit einem 7-Methyl-Guanosin-Cap modifiziert, wodurch eine Aktivierung von RIG-I durch „Selbst“-mRNA ausgeschlossen wird.

Für die zytosolische Helikase MDA-5 wurde bisher noch kein bestimmtes Muster identifiziert, das zu deren Aktivierung notwendig ist. Bisher gilt neben der Erkennung von Nukleinsäuren, die bei einer Picornavirusinfektion in die Zelle gelangen, pl:C als MDA-5-Ligand [6, 7]. pl:C wird oft als Surrogat langer viraler dsRNA verwendet [5, 21], wobei häufig dsRNA als MDA-5-Ligand beschrieben wurde. In dieser Arbeit zeigte sich jedoch bei der Untersuchung der stimulierenden Aktivität verschiedener dsRNAs, dass pl:C die einzige dsRNA war, die große Mengen IFN- $\alpha$  induzierte (Abbildung 3.23). Die Transfektion von pA:U in das Zytosol von PBMC und Monozyten induzierte nur geringe Mengen IFN- $\alpha$ . Obwohl pG:U, komplexiert mit Poly-l-Arginin, im Endosom von PDC erkannt wurde und nach Erkennung IFN- $\alpha$  induzierte (Abbildung 3.10 B), führte die Transfektion (mit Virus LT-1) von pG:U in das Zytosol Zellen nicht zur Produktion von IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.23). Das zeigt, dass die Lokalisation von „Fremd“-RNA ausschlaggebend für eine Erkennung über die verschiedenen Rezeptoren ist. Während pG:U endosomal über den TLR7 erkannt wird, stimuliert pl:C den zytosolischen Rezeptor MDA-5.

Neben der zytosolischen Erkennung von pl:C war die genomische RNA des Plus-Strang-Virus EMCV aus der Picornavirusfamilie — transfiziert in das Zytosol — ausreichend, MDA-5-abhängig IFN- $\alpha$  zu induzieren (Abbildung 3.24 A). Da die genomische RNA von Picornaviren als besonderes Merkmal ein 5'-VpG-Cap (virales Protein g) trägt [77, 183], wurde untersucht, ob dieses für eine Erkennung über MDA-5 ausschlaggebend ist. Untersuchungen, bei denen das Vpg-Cap mit Proteinase K verdaut wurde, zeigten, dass Vpg für eine Erkennung über MDA-5 nicht notwendig war (Abbildung 3.24 B).

Um weitere Charakteristika für einen potentiellen MDA-5-Liganden zu identifizieren, wurden mögliche Gemeinsamkeiten von RNA aus Picornaviren und pl:C untersucht. Picornaviren, die zu den Plus-Strang-Viren gehören, bilden dsRNA bei deren Replikation [33]. Obwohl die genaue Struktur von pl:C nicht bekannt ist, ist sicher, dass es sich auch hierbei um eine dsRNA handelt. Vorstellbar ist, dass sich bestimmte Sekundärstrukturen formen, die für eine MDA-5-abhängige Erkennung ausschlaggebend sein könnten. So könnten neben doppelsträngigen Bereichen einzelsträngige Schleifen gebildet werden. Da es sich sowohl bei pl:C (etwa 5000 bp) als auch bei EMCV-RNA (etwa 7000 bp) um lange RNA handelt, wurde die längenabhängige IFN- $\alpha$ -Produktion genauer untersucht. Wurde pl:C sonifiziert, induzierten kürzere Fragmente (< 300 bp) deutlich weniger IFN- $\alpha$  in humanen PBMC (Abbildung 3.26). Kato und Kollegen berichteten zuvor, dass unbehandeltes pl:C (etwa 7000 bp lang) MDA-5-abhängig erkannt wurde, kürzere Fragmente (etwa 400 bp lang) dagegen induzierte RIG-I-abhängig IFN- $\alpha$  [75]. Obwohl nach Erkennung von RNA über RIG-I ebenfalls IFN- $\alpha$  induziert wird [7, 36, 37], konnte in der vorliegenden Arbeit eine effiziente IFN- $\alpha$ -Induktion nach zytosolischer Erkennung der kurzen pl:C-Fragmente (50-300 bp) in Monozyten nicht beobachtet werden (Abbildung 3.26 B). Je kürzer die Fragmente waren, desto weniger IFN- $\alpha$  wurde in humanen Monozyten induziert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in diesem System kürzere pl:C-Fragmente weder über MDA-5 noch über RIG-I erkannt wurden. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die hier verwendeten pl:C-Fragmente kürzer (< 300 bp) waren als die in der zuvor publizierten Arbeit (300 – 1000 bp) [75]. Außerdem wurden die Experimente in verschiedenen Zellsystemen durchgeführt, was ebenfalls die beobachteten Unterschiede erklären könnte.

#### 4.4.1 Inosin bei der zytosolischen Erkennung von dsRNA

Um weitere charakteristische Eigenschaften von pl:C zu identifizieren, die eine zytosolische Erkennung ausmachen, wurde die Rolle der Base Hypoxanthin in einer dsRNA und deren Erkennung untersucht. Hypoxanthin bildet in Form eines Nukleotids Inosin. Da pl:C aus einer pl-RNA und einer pC-RNA besteht (Länge etwa 5000 bp), könnte Inosin bzw. die Basenpaarung I:C bei der Erkennung eine entscheidende Rolle spielen. Auch in viraler RNA könnte Inosin nach deren Modifikation durch die infizierte Zelle auftreten. Inosin entsteht in der Zelle durch Desaminierung von Adenosin durch das dsRNA-spezifische Enzym ADAR [80, 184]. Neben der im Nukleus exprimierten Form von ADAR wird eine zytosolische Form dieses Enzyms durch IFN induziert [81] und könnte daher für einen Erkennungsmechanismus viraler RNA im Zytosol entscheidend sein. Nach der

Desaminierung von Adenosin zu Inosin in einer dsRNA paart Inosin zunächst mit Uridin [184] und bildet somit eine Wobble-Basenpaarung [185]. Nach der Transkription wird gegenüber von Inosin Cytidin eingebaut, sodass wieder eine Watson-Crick-Basenpaarung (I:C) entsteht. Daher könnten in viraler RNA, die während der Replikation dsRNA bildet, sowohl die Basenpaarungen I:U als auch I:C nach Editierung durch ADAR vorkommen und für eine Erkennung über MDA-5 verantwortlich sein. Da dsRNA bei der Replikation von Plus-Strang-Viren entsteht [33], könnte eine Modifizierung dieser RNA durch ADAR zu dem Erkennungsmechanismus einer MDA-5-abhängigen Detektion beitragen. Daher wurde die stimulatorische Aktivität von ORNs untersucht (Tabelle 3.2), die aufgrund ihrer Sequenz durch Konkatemisierung lange dsRNA imitieren und I:U wie auch I:C Basenpaarungen ausbilden. Monozyten, die mit diesen ORNs transfiziert wurden, produzierten kein IFN- $\alpha$  (Abbildung 3.25 A). Auch eine RNA, die durch Hybridisierung kurzer Cytidin-ORNs (8 nt oder 21 nt) an eine lange pI-RNA (etwa 5000 bp) generiert wurde, aktivierte die Zellen nicht (Abbildung 3.25 B). Da diese dsRNAs aus kurzen ORNs generiert wurden und dadurch eine lange dsRNA imitieren sollten, konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die fehlenden Phosphatbindungen zwischen den ORNs die Stimulation verhinderten, oder ob möglicherweise die erforderliche Struktur, die zu einer Erkennung über MDA-5 beitragen könnte, nicht gebildet wurde.

Um eine lange dsRNA zu generieren, die Inosinnukleotide enthielt, wurde ssRNA aus Guanosen und Inosin durch Polynukleotidsynthetase hergestellt und an pC-RNA hybridisiert. Das Verhältnis von Guanosen und Inosin während der Synthese variierte, sodass vermutlich RNA mit unterschiedlichen Mengen Inosin synthetisiert wurde (pG-I). Die generierte dsRNA aus pI-G und pC enthielt G:C- und I:C-Basenpaare. Diese dsRNA (pI-G+pC) induzierte IFN- $\alpha$  in Monozyten (Abbildung 3.27 A). Eine dsRNA, die ähnlich generiert wurde (pC-U+pI) und neben I:C-Basenpaaren I:U-Basenpaare bildete, war dagegen inert (Abbildung 3.27 B). Das lässt vermuten, dass nicht alleine Inosin erkannt wird, sondern dass I:C-Basenpaare für eine zytosolische Erkennung von dsRNA erforderlich sind. Auch könnten die I:U-Basenpaare inhibierend auf eine MDA-5-Aktivierung wirken und daher auch die Erkennung der konkatemierten Inosin-haltigen ORNs beeinflussen. Hinweise dazu geben Studien, in denen beschrieben wurde, dass pI:C TLR3-unabhängig erkannt wird – also über MDA-5 – jedoch pI:C<sub>12</sub>U MDA-5 nicht aktivierte [186]. pI:C<sub>12</sub>U ist ähnlich wie pI:C aufgebaut, doch ist jedes zwölfte Cytidin in der pC-RNA durch ein Uridin ersetzt. Diese Veränderung hat zur Folge, dass pI:C<sub>12</sub>U spezifisch über TLR3 erkannt wird und eine MDA-5-abhängige Stimulation nicht mehr erfolgt [186].

I:U-Basenpaare bilden weniger stabile Bindungen als A:U-Basenpaare [185, 187], dagegen bilden I:C-Basenpaare – genau wie A:U-Basenpaare – Watson-Crick-

Bindungen mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus [188]. Das könnte bedeuten, dass I:U-Basenpaare eine strukturelle Änderung der dsRNA hervorrufen und ein instabiler Doppelstrang entsteht. Erst nach einer Transkription entstehen dann I:C-Basenpaare, die wieder einen stabileren Doppelstrang bilden und somit die Erkennung beeinflussen könnten. Ebenfalls wäre möglich, dass die lange pC-RNA bestimmte Sekundärstrukturen bildet, die eine Erkennung positiv beeinflussen könnten.

Zwar konnten in dieser Arbeit keine genaueren Eigenschaften von Sekundärstrukturen identifiziert werden, die eine zytosolische Erkennung ermöglichen, doch wurden wichtige Charakteristika für einen potentiellen MDA-5-Liganden identifiziert. Einerseits wurde gezeigt, dass die IFN- $\alpha$ -Induktion abhängig von der Länge der dsRNA ist und dass andererseits die Anwesenheit von I:C-Basenpaaren erforderlich ist. D.h.: nach einer Infektion von Zellen durch Picornaviren wäre zunächst eine Replikation bei der dsRNA entsteht, und eine Modifizierung durch ADAR notwendig, um eine MDA-5-abhängige Erkennung von viraler RNA zu ermöglichen.

#### **4.5 Zytosolische Erkennung von DNA**

Neben den RNA-Viren gibt es eine große Gruppe von DNA-Viren, die in Vertebraten über Mechanismen der angeborenen Immunität erkannt und abgewehrt werden. Ebenso wird durch die Erkennung bakterieller DNA eine Immunantwort hervorgerufen, die den Körper vor der Ausbreitung einer Infektion schützt. Schon lange ist bekannt, dass unmethylierte CpG-Motive in bakterieller und viraler RNA über TLR9 erkannt werden [168]. Nach Erkennung von bestimmter CpG-DNA werden einerseits große Mengen IFN- $\alpha$  [169] in PDC induziert, andererseits führt die Erkennung der CpG-Motive in B-Zellen zu deren Aktivierung [189]. Die Expression von TLR9, der in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten der Zelle vorkommt [14], ist sehr restringiert in den humanen Immunzellen zu finden. Eine zusätzliche Erkennung viraler und bakterieller DNA findet im Zytosol verschiedenster Zelltypen statt [8]. Um welchen Rezeptor es sich bei der Detektion genau handelt, ist bisher noch nicht bekannt. Neben viraler und bakterieller RNA wurde gezeigt, dass lange dsDNA in Form von enzymatisch hergestelltem pdAdT große Mengen Typ I IFN in verschiedenen Zellen induziert [8]. Es wurde jedoch noch kein minimales DNA-Motiv identifiziert, das eine zytosolische Erkennung ausmacht. In dieser Arbeit wurden daher synthetisch hergestellte, kurze und gut definierte ODNs gesucht, die über eine zytosolische DNA-Erkennung IFN- $\alpha$  in Monozyten induzieren können. Es zeigte sich,

dass durch Konkatemerisierung bipalindromischer ODNs (bpcODNs) scheinbar eine lange dsDNA imitiert wird, die IFN- $\alpha$  in Monozyten nach zytosolischer Erkennung induziert (Abbildung 3.29). Die bpcODNs bestanden aus einer GC-reichen Ankerregion (8 nt) und einer AT-reichen alternierenden Sequenz (Abbildung 3.28 C-E). Die bpcODNs mussten mindestens 24 nt lang sein, um effektiv die Zellen zu stimulieren. Als optimale Länge zur Stimulation wurde eine Länge von 32 nt festgestellt.

pdAdT besitzt eine aus Adenosin und Thymidin bestehende, alternierende Sequenz. Die Konkatemerisierung der bpcODNs war zwingend erforderlich, um eine Erkennung zu gewährleisten (Abbildung 3.30 A), die Länge und Position der Ankerregion spielte jedoch eine unwesentliche Rolle (Abbildung 3.30 B). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Sequenz nicht ausschlaggebend für eine zytosolische Erkennung von DNA ist. Auch Zufallssequenzen von bpcODNs induzierten IFN- $\alpha$  in Monozyten (Abbildung 3.32 B). Obwohl gezeigt wurde, dass die Erkennung von dsDNA im Zytosol sequenzunspezifisch ist, ist vermutlich ein gewisser Anteil an Adenosin und Thymidin notwendig für eine Stimulation. Da DNA in gesunden Zellen nicht im Zytosol vorkommt, ist nicht überraschend, dass das Erkennungsmuster von DNA nicht sehr spezifisch zu sein scheint. Alleine die Anwesenheit der DNA im Zytosol sollte der Zelle ein Signal geben, dass eine Infektion vorliegt. Vermutlich gibt es viele verschiedene DNA-Liganden, die eine Zelle zur Sekretion von IFN- $\alpha$  stimulieren. Unklar ist, ob ein einziger Rezeptor für die Erkennung von zytosolischer DNA und das dadurch induzierte IFN- $\alpha$  zuständig ist. Es wäre denkbar, dass es mehrere zytosolische DNA-Rezeptoren gibt, die unterschiedliche DNA-Muster erkennen und auch in verschiedenen Zelltypen exprimiert sein könnten. Ein weiterer Hinweis zu dieser Hypothese ist, dass 2007 ein DNA-Rezeptor Namens DAI (ZBP1) identifiziert wurde, der für die IFN- $\alpha$ -Produktion zuständig zu sein schien [87]. Später zeigte sich jedoch, dass DAI-defiziente Mäuse nicht den erwünschten Phänotyp hatten und dass die Erkennung von pdAdT nicht von DAI abhängig war [88]. Eine zelltypspezifische Expression verschiedener DNA-Rezeptoren könnte eine Möglichkeit sein, die die Erkennung unterschiedlicher DNA in verschiedenen Zelltypen zulässt. Zusätzlich zu der zytosolischen Erkennung, die IFN- $\alpha$  in Zellen induziert, wurde ein Rezeptor identifiziert, der nach zytosolischer Erkennung von DNA das Inflammasom aktiviert (Hornung et al., unpublizierte Daten). Auch das weist daraufhin, dass es verschiedenen Mechanismen zur Erkennung von DNA im Zytosol der Zelle gibt und dass nach Erkennung verschiedene Signalwege aktiviert werden können.

#### 4.5.1 3'-Monophosphat steigert die IFN- $\alpha$ -Induktion durch bpcODNs im Zytosol

Obwohl die Erkennung von viraler und bakterieller DNA scheinbar nicht von einem minimalen Motiv abhängig ist, wurden gut definierte und leicht herzustellende ODNs identifiziert, die eine zytosolische Erkennung und dadurch die Produktion von IFN- $\alpha$  zulassen. Um die Aktivität der bpcODNs zu steigern wurden modifizierte bpcODNs auf ihre Fähigkeit hin, IFN- $\alpha$  in Monozyten zu induzieren, untersucht. Obwohl bestimmte CpG-ODNs (CpG-C; M362) mit einem vollständigen PTO-Rückgrat aktiv sind [40], waren vollständig PTO-modifizierte bpcODNs inert. PTO-Modifizierungen am 5'- und am 3'-Ende (entsprechend zu CpG-ODN 2216 [169]) dagegen steigerten die Aktivität des bpcODNs (Abbildung 3.31 A). Das weist darauf hin, dass das PTO-Rückgrat eine entscheidende Rolle bei der zytosolischen Erkennung von DNA spielt. Trotzdem kann die IFN- $\alpha$ -Induktion durch PTO-Modifikationen an den Enden der bpcODNs zur höheren IFN- $\alpha$ -Produktion führen. Nahe liegend wäre, dass aufgrund höherer Stabilität eine effizientere Stimulation und IFN- $\alpha$ -Produktion induziert wird.

Da die konkatemerisierenden bpcODNs ein unvollständiges Rückgrat einer langen dsDNA darstellen, wurde durch Einführen von Monophosphaten an den Enden der ODNs die fehlenden Phosphatbindungen imitiert. Obwohl 3'-Monophosphat-Modifizierungen die IFN- $\alpha$ -Produktion – induziert durch bpcODNs sequenzunabhängig verstärkten – verbesserten 5'-Monophosphate die Stimulation nicht (Abbildung 3.31 B; Abbildung 3.32 B). Das zeigt, dass nicht die Imitation eines vollständigen Doppelstrangs durch „Verschließen“ der fehlenden Monophosphat-Bindungen die stärkere IFN- $\alpha$ -Produktion begründet, sondern dass das 3'-Monophosphat entweder spezifisch erkannt wird oder die Stabilität der bpcODNs steigert. Gegen eine spezifische Erkennung des 3'-Monophosphats spricht, dass ODNs mit 3'-Monophosphat ohne Ankerregion nur minimale Aktivität zeigten (Abbildung 3.32 A). Eine genaue Aufklärung zur Rolle des 3'-Monophosphates ist bisher noch nicht möglich, da der für die Erkennung zuständige zytosolische DNA-Rezeptor noch nicht identifiziert wurde. Wäre der Rezeptor bekannt, könnte möglicherweise durch Bindungsstudien gezeigt werden, ob ein 3'-Monophosphat zu einer besseren Bindung der bpcODNs an den zuständigen Rezeptor führt oder ob alleine eine höhere Stabilität von 3'-Monophosphat modifizierten bpcODNs entscheidend für die bessere Stimulation ist.

In dieser Arbeit wurden also Nukleinsäuremotive identifiziert, die über Rezeptoren der angeborenen Immunität spezifisch erkannt werden. Die Komplexierung von isRNA mit dem bereits zugelassenen, jedoch anderweitig eingesetzten Medikament



Protamin wurde etabliert. Eine Formulierung von isRNA, komplexiert mit Protamin, könnte für eine therapeutische Entwicklung und einen Einsatz im Menschen ein vielversprechender Ansatz sein.

Obwohl isRNA sequenzspezifisch erkannt wird [48], war eine selektive Stimulation von TLR7 oder TLR8 mit isRNA nur in Kombination mit einer geeigneten Komplexierung möglich. In dieser Arbeit wurde jedoch durch die Untersuchung der endosomalen Erkennung von dsRNA ein selektiver TLR7-Ligand gefunden, der keine TLR8-spezifischen Zytokine induziert. Zusätzlich wird dieser Ligand spontan – ohne vorherige Komplexierung – aufgenommen. Das eröffnet zum ersten Mal die Möglichkeit, Phosphodiester-RNA therapeutisch einzusetzen und selektiv TLR7 zu stimulieren, ohne ein zusätzliches Präparat zur Komplexierung zu verwenden.

Während die Expression von TLR7 auf Immunzellen beschränkt ist, kann über zytosolische Rezeptoren für virale Nukleinsäuren ein breiteres Spektrum an Zellen stimuliert werden. Neben somatischen Zellen könnten so auch Krebszellen zur Zytokinproduktion angeregt bzw. in die Apoptose getrieben werden. Es wurden wichtige Charakteristika identifiziert, die zur Entwicklung spezifischer Liganden für die zytosolische Helikase MDA-5 essentiell sind. Ebenso wurden für die Erkennung zytosolischer DNA chemisch definierte Agonisten in Form von synthetischen ODNs ermittelt. Am Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn wird angestrebt, immunstimulatorische Nukleinsäuren, wie sie in dieser Arbeit identifiziert wurden, für die therapeutische Anwendung weiter zu entwickeln. Ebenfalls tragen Erkenntnisse zu einer geeigneten Formulierung von isRNA zu dieser Entwicklung bei.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Hozumi, N. and S. Tonegawa, *Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(10): p. 3628-32.
2. Hodges, E., et al., *Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes*. J Clin Pathol, 2003. **56**(1): p. 1-11.
3. Jacobs, B.L. and J.O. Langland, *When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA*. Virology, 1996. **219**(2): p. 339-49.
4. Yang, Y.L., et al., *Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase*. EMBO J, 1995. **14**(24): p. 6095-106.
5. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
6. Gitlin, L., et al., *Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8459-64.
7. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
8. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 40-8.
9. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
10. Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product*. Cell, 1985. **42**(3): p. 791-8.
11. Anderson, K.V., G. Jurgens, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product*. Cell, 1985. **42**(3): p. 779-89.
12. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
13. Funami, K., et al., *The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1143-54.
14. Latz, E., et al., *TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 190-8.
15. Nishiya, T., et al., *TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 37107-17.
16. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
17. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-25.
18. Chow, J.C., et al., *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10689-92.
19. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.

20. Plattner, F., et al., *Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(2): p. 77-87.
21. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
22. Krug, A., et al., *Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1433-7.
23. Lund, J., et al., *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 513-20.
24. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
25. Krieg, A.M., et al., *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 546-9.
26. Krug, A., et al., *Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3026-37.
27. Jurk, M., et al., *Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 499.
28. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
29. Barchet, W., et al., *Assessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 389-95.
30. Lien, E., et al., *Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33419-25.
31. Aliprantis, A.O., et al., *Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2*. Science, 1999. **285**(5428): p. 736-9.
32. Takeuchi, O., et al., *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. Immunity, 1999. **11**(4): p. 443-51.
33. Weber, F., et al., *Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 5059-64.
34. Kleinman, M.E., et al., *Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 591-7.
35. Edelmann, K.H., et al., *Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?* Virology, 2004. **322**(2): p. 231-8.
36. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
37. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
38. Krieg, A.M., et al., *The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines*. Trends Microbiol, 1998. **6**(1): p. 23-7.
39. Krieg, A.M., *An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA*. J Lab Clin Med, 1996. **128**(2): p. 128-33.

40. Hartmann, G., et al., *Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(6): p. 1633-41.
41. Poeck, H., et al., *Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help*. Blood, 2004. **103**(8): p. 3058-64.
42. Gordon, K.B., et al., *Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1259-68.
43. Heil, F., et al., *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 2987-97.
44. Lee, J., et al., *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6646-51.
45. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 196-200.
46. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
47. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
48. Hornung, V., et al., *Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 263-70.
49. Barchet, W., et al., *Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways*. Eur J Immunol, 2005. **35**(1): p. 236-42.
50. Diebold, S.S., et al., *Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides*. Eur J Immunol, 2006. **36**(12): p. 3256-67.
51. Forsbach, A., et al., *Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3729-38.
52. Mathews, D.H. and D.H. Turner, *Prediction of RNA secondary structure by free energy minimization*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(3): p. 270-8.
53. Eberle, F., et al., *Modifications in small interfering RNA that separate immunostimulation from RNA interference*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3229-37.
54. Wesche, H., et al., *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 837-47.
55. Medzhitov, R., et al., *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 253-8.
56. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
57. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
58. Takeuchi, O., et al., *Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades*. Int Immunol, 2000. **12**(1): p. 113-7.

59. Yamamoto, M., et al., *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 6668-72.
60. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
61. Swantek, J.L., et al., *IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4301-6.
62. Janssens, S. and R. Beyaert, *Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 293-302.
63. Gohda, J., T. Matsumura, and J. Inoue, *Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2913-7.
64. Kawai, T., et al., *Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1061-8.
65. Deng, L., et al., *Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. Cell, 2000. **103**(2): p. 351-61.
66. Kang, D.C., et al., *Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene*. Oncogene, 2004. **23**(9): p. 1789-800.
67. Diebold, S.S., et al., *Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 324-8.
68. Kang, D.C., et al., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 637-42.
69. Andrejeva, J., et al., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
70. Kumar, H., et al., *Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1795-803.
71. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
72. Rothenfusser, S., et al., *The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5260-8.
73. Sumpter, R., Jr., et al., *Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2689-99.
74. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
75. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
76. Malathi, K., et al., *Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 816-9.

77. Lee, Y.F., et al., *A protein covalently linked to poliovirus genome RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(1): p. 59-63.
78. Jang, S.K., et al., *A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2636-43.
79. Pelletier, J. and N. Sonenberg, *Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts*. J Virol, 1989. **63**(1): p. 441-4.
80. Bass, B.L. and H. Weintraub, *An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate*. Cell, 1988. **55**(6): p. 1089-98.
81. Patterson, J.B. and C.E. Samuel, *Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5376-88.
82. Suzuki, K., et al., *Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2285-90.
83. Ishii, K.J., et al., *Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2602-7.
84. Yasuda, K., et al., *Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6129-36.
85. Li, S., et al., *Induction of IFN-regulated factors and antitumoral surveillance by transfected placebo plasmid DNA*. Mol Ther, 2005. **11**(1): p. 112-9.
86. Hochrein, H., et al., *Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11416-21.
87. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
88. Ishii, K.J., et al., *TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines*. Nature, 2008. **451**(7179): p. 725-9.
89. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 981-8.
90. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. Cell, 2005. **122**(5): p. 669-82.
91. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.
92. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 727-40.
93. Saha, S.K., et al., *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3257-63.
94. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.
95. Takahashi, K., et al., *Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4520-4.
96. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 93-103.
97. Leadbetter, E.A., et al., *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 603-7.

98. Lau, C.M., et al., *RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement*. J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1171-7.
99. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 709-60.
100. Rozenski, J., P.F. Crain, and J.A. McCloskey, *The RNA Modification Database: 1999 update*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(1): p. 196-7.
101. Kariko, K., et al., *Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 165-75.
102. Robbins, M., et al., *2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists*. Mol Ther, 2007. **15**(9): p. 1663-9.
103. Sioud, M., G. Furset, and L. Cekaite, *Suppression of immunostimulatory siRNA-driven innate immune activation by 2'-modified RNAs*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **361**(1): p. 122-6.
104. Shatkin, A.J. and J.L. Manley, *The ends of the affair: capping and polyadenylation*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(10): p. 838-42.
105. Huang, F.P., et al., *A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 435-44.
106. Sauter, B., et al., *Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 423-34.
107. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 4-9.
108. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
109. Muzio, M., et al., *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5998-6004.
110. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
111. Cella, M., et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.
112. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
113. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1823-34.
114. Fitzgerald-Bocarsly, P., *Human natural interferon-alpha producing cells*. Pharmacol Ther, 1993. **60**(1): p. 39-62.
115. Yamaguchi, T., et al., *Target cells for interferon production in human leukocytes stimulated by sendai virus*. J Immunol, 1977. **118**(6): p. 1931-5.

116. Peter, H.H., et al., *Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, Herpes simplex virus and Corynebacterium parvum*. Eur J Immunol, 1980. **10**(7): p. 547-55.
117. Trinchieri, G., et al., *Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation*. J Exp Med, 1978. **147**(5): p. 1299-1313.
118. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
119. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
120. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
121. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
122. Asselin-Paturel, C., et al., *Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1144-50.
123. Nakano, H., M. Yanagita, and M.D. Gunn, *CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1171-8.
124. Blom, B., et al., *Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1785-96.
125. Chen, W., et al., *Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2547-53.
126. Gilliet, M., et al., *The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 2002. **195**(7): p. 953-8.
127. Pulendran, B., et al., *Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 566-72.
128. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
129. Colonna, M., A. Krug, and M. Cella, *Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 373-9.
130. Gibson, S.J., et al., *Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod*. Cell Immunol, 2002. **218**(1-2): p. 74-86.
131. Fonteneau, J.F., et al., *Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3520-6.
132. Bekeredjian-Ding, I., et al., *T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7438-46.



133. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.
134. Chapuis, F., et al., *Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro*. Eur J Immunol, 1997. **27**(2): p. 431-41.
135. Zhou, L.J. and T.F. Tedder, *CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2588-92.
136. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
137. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
138. Nagano, Y. and Y. Kojima, *[Inhibition of vaccinia infection by a liquid factor in tissues infected by homologous virus.]*. C R Seances Soc Biol Fil, 1958. **152**(11): p. 1627-9.
139. Farrar, M.A. and R.D. Schreiber, *The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 571-611.
140. Pestka, S., *The human interferon alpha species and receptors*. Biopolymers, 2000. **55**(4): p. 254-87.
141. Henco, K., et al., *Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes*. J Mol Biol, 1985. **185**(2): p. 227-60.
142. Trent, J.M., S. Olson, and R.M. Lawn, *Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7809-13.
143. Silvennoinen, O., et al., *Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases*. Nature, 1993. **366**(6455): p. 583-5.
144. Barbieri, G., et al., *Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon alpha/beta*. Eur J Biochem, 1994. **223**(2): p. 427-35.
145. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
146. Staeheli, P., M.A. Horisberger, and O. Haller, *Mx-dependent resistance to influenza viruses is induced by mouse interferons alpha and beta but not gamma*. Virology, 1984. **132**(2): p. 456-61.
147. Balachandran, S., et al., *Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection*. Immunity, 2000. **13**(1): p. 129-41.
148. Player, M.R. and P.F. Torrence, *The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation*. Pharmacol Ther, 1998. **78**(2): p. 55-113.
149. Paquette, R.L., et al., *Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(3): p. 358-67.
150. Santini, S.M., et al., *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice*. J Exp Med, 2000. **191**(10): p. 1777-88.
151. Zhang, X., et al., *Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15*. Immunity, 1998. **8**(5): p. 591-9.
152. Sampson, L.L., J. Heuser, and E.J. Brown, *Cytokine regulation of complement receptor-mediated ingestion by mouse peritoneal macrophages. M-CSF and*

- IL-4 activate phagocytosis by a common mechanism requiring autostimulation by IFN-beta.* J Immunol, 1991. **146**(3): p. 1005-13.
153. Ortaldo, J.R., et al., *Augmentation of human natural killer cell activity by interferon: conditions required for boosting and characteristics of the effector cells.* J Interferon Res, 1981. **1**(2): p. 253-62.
154. Le Bon, A., et al., *Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo.* Immunity, 2001. **14**(4): p. 461-70.
155. Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell, *Type I interferons keep activated T cells alive.* J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 521-30.
156. Taylor, J.L. and S.E. Grossberg, *The effects of interferon-alpha on the production and action of other cytokines.* Semin Oncol, 1998. **25**(1 Suppl 1): p. 23-9.
157. Miettinen, M., et al., *IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections.* Genes Immun, 2001. **2**(6): p. 349-55.
158. Schultze, J.L., et al., *Human non-germinal center B cell interleukin (IL)-12 production is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: role of B cells in the maintenance of T cell responses.* J Exp Med, 1999. **189**(1): p. 1-12.
159. Chan, S.H., et al., *Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers.* J Exp Med, 1991. **173**(4): p. 869-79.
160. Manetti, R., et al., *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.* J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1199-204.
161. Jelinek, D.F. and J.K. Braaten, *Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation.* J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1606-13.
162. Snijders, A., et al., *Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit.* J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1207-12.
163. Joss, A., et al., *IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway.* Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1683-90.
164. D'Andrea, A., et al., *Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells.* J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1387-98.
165. Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan, *Macrophage deactivation by interleukin 10.* J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1549-55.
166. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.* J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
167. Maldonado-Lopez, R., et al., *Cytokines regulate the capacity of CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo.* J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4345-50.
168. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.* Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
169. Krug, A., et al., *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells.* Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2154-63.

170. Kerkmann, M., et al., *Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles*. *Oligonucleotides*, 2006. **16**(4): p. 313-22.
171. Scheel, B., et al., *Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(2): p. 537-47.
172. Scheel, B., et al., *Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(5): p. 1557-66.
173. Junghans, M., J. Kreuter, and A. Zimmer, *Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(10): p. E45.
174. Sorgi, F.L., S. Bhattacharya, and L. Huang, *Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer*. *Gene Ther*, 1997. **4**(9): p. 961-8.
175. Aste-Amezaga, M., et al., *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10*. *J Immunol*, 1998. **160**(12): p. 5936-44.
176. Gonzalez Ferreiro, M., et al., *Characterization of complexes of an antisense oligonucleotide with protamine and poly-L-lysine salts*. *J Control Release*, 2001. **73**(2-3): p. 381-90.
177. Melchjorsen, J., et al., *Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner*. *J Virol*, 2005. **79**(20): p. 12944-51.
178. Sioud, M., *Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(5): p. 1222-30.
179. Sioud, M., *Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization*. *J Mol Biol*, 2005. **348**(5): p. 1079-90.
180. Judge, A.D., et al., *Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(4): p. 457-62.
181. Ito, T., et al., *Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets*. *J Exp Med*, 2002. **195**(11): p. 1507-12.
182. Sundquist, W.I. and A. Klug, *Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops*. *Nature*, 1989. **342**(6251): p. 825-9.
183. Pettersson, R.F., et al., *5'-Terminal nucleotide sequences of polio virus polyribosomal RNA and virion RNA are identical*. *Nature*, 1977. **268**(5617): p. 270-2.
184. Wagner, R.W., et al., *A double-stranded RNA unwinding activity introduces structural alterations by means of adenosine to inosine conversions in mammalian cells and *Xenopus* eggs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(8): p. 2647-51.
185. Strobel, S.A., et al., *The 2,6-diaminopurine riboside.5-methylisocytidine wobble base pair: an isoenergetic substitution for the study of G.U pairs in RNA*. *Biochemistry*, 1994. **33**(46): p. 13824-35.
186. Gowen, B.B., et al., *TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules*. *J Immunol*, 2007. **178**(8): p. 5200-8.
187. Wright, D.J., et al., *Nearest neighbor parameters for inosine x uridine pairs in RNA duplexes*. *Biochemistry*, 2007. **46**(15): p. 4625-34.

188. Suspene, R., et al., *Inversing the natural hydrogen bonding rule to selectively amplify GC-rich ADAR-edited RNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(12): p. e72.
189. Hartmann, G. and A.M. Krieg, *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 944-53.



CpG-ODN	DNA Sequenzen
CpG 2216	G*G*GGGACGATCGTCG*G*G*G*G*G
CpG 2336	G*G*G*G*ACGACGTCGTGGG*G*G*G*G

**Tabelle 6.2: Sequenzen der verwendeten CpG-ODNs.**

bpcODN	DNA Sequenzen
D1601	ATATATATGCCGCGGC
D2001	ATATATATATATGCCGCGGC
D2401	ATATATATATATATATGCCGCGGC
D2801	ATATATATATATATATATGCCGCGGC
D3201	ATATATATATATATATATATGCCGCGGC
D3609	ATATATATATATATATATATATATGCCGCGGC
D3207	ATATATATATATATATATATATGGCCCCGG
D3203	GCCGCGGCATATATATATATATATATATATAT
D3608	ATATATATATATATATATATATATATATATCGCG
D3803	ATATATATATATATATATATATATATATATCCGCGG
D4001	ATATATATATATATATATATATATATATATGCCGCGGC
D3202	A*T*ATATATATATATATATATATGCC*G*C*G*G*C
D3232	A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*A*T*G*C*C*G*C*G*G*C
D3201 3P	ATATATATATATATATATATATATGCCGCGGC-p
D3201 5P	p-ATATATATATATATATATATATGCCGCGGC
D3201 3,5P	p-ATATATATATATATATATATATGCCGCGGC-p
D3242	ATATATATATATATATATATATATATATAT-p
D3250	AGCATAGGCCTATGCTGTGATGTATACATCAC
D3250 3P	AGCATAGGCCTATGCTGTGATGTATACATCAC-p

**Tabelle 6.3: Sequenzen der verwendeten bpcODNs.**

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

2'-5'-A	5'-Phosphodiester-verbundenes Oligoadenylat
3-P-RNA	5'-Triphosphat RNA
A	Absorption
A:U	Adenosin-Uridin
ADAR	Adenosine-deaminase acting on RNA
AK	Antikörper
AP-1	activating protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BDCA	Blood dendritic cell antigen
bpcODN	bipalindromic concatemerizing oligodeoxynucleotide
bzw.	beziehungsweise
CARD	caspase recruitment domain
Cardif	CARD-adaptor inducing IFN- $\beta$
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CpG	Cytosin verbunden mit Guanin über eine Phosphatbindung
CpG-ODN	CpG-Motive enthaltende Oligodesoxynukleotide
CTL	zytotoxische Lymphozyten
CXCR	Chemokinrezeptor
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DC	dendritische Zelle
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2	eucaryotic initiation factor 2
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FADD	Fas-associated death domain
FALS	forward angle light scatter
FCS	Fötale Kälber Serum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FSC	forward scatter
g	Erdbeschleunigung
G:U	Guanosin-Uridin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HRP	Horseradish Peroxidase
i.v.	intravenös
I:C	Inosin-Cytidin
I:U	Inosin-Uridin
IDP	Inosindiphosphat
IFN	Interferon

IFNAR	Typ I Interferonrezeptor
Ig	Immunoglobulin
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IPC	Interferon-produzierende Zelle
IPS-1	IFN- $\beta$ promotor stimulator
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
ISRE	IFN-stimulated response element
isRNA	immunstimulatorische Ribonukleinsäure
IVT2	<i>in vitro</i> -Transkription 2
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LGP2	laboratory of genetics and physiology 2
Lin	lineage
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MACS	magnetic activated cell sorting
MAP	Mytogen-aktivierte Protein Kinase
MAVS	mitochondrial antiviral signalling
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MDA-5	melanoma differentiatin antigene 5
MDA-5 <sup>-/-</sup>	melanoma differentiation antigen 5-defizient
mDC	myeloide dendritische Zelle
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
MyD88	myeloid differentiation factor 88
n	Anzahl
N	normal
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modulator
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NOD	nucleotide oligomerization domain
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotide
ORN	Oligoribonukleotide
pA	Polyriboadenosin
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat
pC	polyribocytidin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pdAdT	polydeoxyadenylic-polydeoxicytidylic acid sodium salt
PDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin



---

PerCP	Peridinin Chlorophyll-A-Protein
pg	Picogramm
pG	Polyriboguanosin
pI	Polyriboinosin
pI:C	polyriboinosinic:polyribocytidylic acid
PKR	proteine kinase activated by RNA
PNPase	Polynukleotidphosphorylase
PRR	pattern recognition receptor
PTO	Phosphothioat
pU	polyribouridin
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RLR	RIG-I-like receptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park memorial institute
rRNA	ribosomale ribonucleic acid
SEM	standard error of mean
siRNA	small interfering ribonucleic acid
snoRNA	small nuclear ribonucleic acid
snRNA	small nucleolar ribonucleic acid
SSC	sideward scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAB	TAK-Bindungsprotein
TAK	tumor growth factor $\beta$ -aktivated kinase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBK1	TANK-binding protein 1
TCR	T-Zellrezeptor
TGF $\beta$	tumor growth factor $\beta$
Th	T-Helfer
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR7 <sup>-/-</sup>	Toll-like Rezeptor 7 defizient
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$
tRNA	transfer ribonucleic acid
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UDP	Uridindiphosphat
VISA	Virus-induced signaling adapter
WALS	wide angle light scatter
z.B.	zum Beispiel
ZBP1	Z-DNA binding protein
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Expression und Funktionalität von TLR3, 7/8 und 9 im Menschen und in der Maus.....	8
Abbildung 1.2: Signalweg nach der Erkennung von Nukleinsäuren über TLR7/8 und TLR9.....	14
Abbildung 1.3: Signalweg nach Erkennung viraler RNA und viraler DNA im Zytosol.....	20
Abbildung 2.1: Templat für die T7-Polymerase Reaktion zur Herstellung von 3-P-RNA.....	44
Abbildung 2.2: Prinzip des Durchflusszytometers (Modifizierte Abb. aus Janssen, 2004). ....	53
Abbildung 3.1: Bestimmung der Reinheit humaner Monozyten und humaner PDC nach der MACS-Separation. ....	57
Abbildung 3.2: Induktion von IFN- $\alpha$ und IL-12p70 in humanen PBMC, Monozyten und PDC durch Stimulation endosomaler TLRs oder zytosolischer Rezeptoren.....	60
Abbildung 3.3: In Abhängigkeit der Inkubationszeit induziert mit Poly-I-Arginin komplexierte isRNA 9.2s verstärkt IFN- $\alpha$ oder IL-12p70.....	62
Abbildung 3.4: IsRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-I-Arginin oder Protamin, wird von Monozyten und PDC aufgenommen. ....	64
Abbildung 3.5: Mit Protamin komplexierte isRNA 9.2s induziert in PBMC die Produktion TLR8-spezifischer Zytokine. ....	66
Abbildung 3.6: Bestimmung der Partikelgröße von isRNA 9.2s, komplexiert mit Poly-I-Arginin oder Protamin. ....	67
Abbildung 3.7: Die isRNA-Sequenz und die Inkubationszeit von isRNA und dem kationischen Peptid beeinflussen die TLR7- und TLR8-Stimulation. ....	71
Abbildung 3.8: Sequenzabhängige Induktion von IL-10 und TNF- $\alpha$ durch isRNA komplexiert mit Poly-I-Arginin oder Protamin.....	73
Abbildung 3.9: Induktion von IFN- $\alpha$ und IL-12p70 nach Stimulation mit isRNA 9.2s, komplexiert mit Protamin Valeant. ....	75
Abbildung 3.10: Die Produktion von IFN- $\alpha$ in humanen PBMC und PDC, induziert durch Stimulation mit pU, wird durch Hybridisierung von pG an pU verstärkt.....	78
Abbildung 3.11: Einzelne G:U-Basenpaare verstärken die Produktion von IFN- $\alpha$ induziert durch pU..	80
Abbildung 3.12: G:U-Basenpaare induzieren IFN- $\alpha$ in einer nicht stimulierenden Umgebung.....	82
Abbildung 3.14: Die Erkennung von G:U-Basenpaaren in einer RNA „Stem“-Struktur ist abhängig von TLR7. ....	85
Abbildung 3.15: <i>In vivo</i> -Erkennung von G:U-Basenpaaren. ....	86
Abbildung 3.16: G:U-Basenpaare aktivieren selektiv TLR7.....	88
Abbildung 3.17: G:U-Basenpaare in doppelsträngigen ORNs induzieren IFN- $\alpha$ in PDC. ....	89
Abbildung 3.18: „Hairpin“-Strukturen kurzer ORNs. ....	91
Abbildung 3.19: G:U-Basenpaare in „Hairpin“-Strukturen kurzer ORNs induzieren selektiv IFN- $\alpha$ .....	92
Abbildung 3.20: Die Anwesenheit von Guanosin und Uridin ist nicht ausreichend zur Stimulation von TLR7. ....	93
Abbildung 3.21: Der „nackte“ TLR7-Ligand pG+R805 wird von humanen PDC ohne Komplexbildung mit kationischem Peptid phagozytiert und induziert IFN- $\alpha$ . ....	95
Abbildung 3.23: Induktion von IFN- $\alpha$ durch Transfektion mit langer dsRNA.....	98
Abbildung 3.24: pI:C und EMCV-RNA stimulieren MDA-5-abhängig murine mDC und induzieren in humanen Monozyten unabhängig vom VpG-Cap IFN- $\alpha$ .....	100
Abbildung 3.25: Erkennung von Inosin in ORNs oder in dsRNA.....	102

Abbildung 3.26: Die stimulierende Aktivität von pl:C ist längenabhängig.....	103
Abbildung 3.27: pl-G+pC induziert vergleichbare Mengen pl:C in Monozyten wie pl:C.....	105
Abbildung 3.28: Monozyten produzieren IFN- $\alpha$ nach Stimulation mit pdAdT.....	107
Abbildung 3.29: Bipalindromische konkaterisierende ODNs (bpcODN) induzieren längenabhängig IFN- $\alpha$ in Monozyten. ....	108
Abbildung 3.30: Zur Induktion von IFN- $\alpha$ in Monozyten müssen kurze ODNs bipalindromisch sein; Länge und Lokalisation der Ankerregion sind variabel. ....	110
Abbildung 3.31: Die stimulatorische Aktivität der bpcODNs wird durch partiell PTO-stabilisierte ODN- Rückgrate und 3'-Monophosphate verbessert.....	112
Abbildung 3.32: 3'-Monophosphate verstärken die stimulatorische Aktivität von bpcODNs in Monozyten unabhängig von der Sequenz.....	114
Abbildung 3.33: bpcODNs induzieren kein IFN- $\alpha$ in PDC.....	116

## 6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Liganden für TLR1-11 und die zugehörigen Pathogene. ....	10
Tabelle 1.2: Modifikationen von Nukleinsäuren können die Erkennung durch das Immunsystem verhindern.....	22
Tabelle 3.1: isRNA-Sequenzen zur Stimulation von TLR7 und TLR8.....	69
Tabelle 3.2: Sequenzen der Inosin-haltigen ORNs. ....	101
Tabelle 6.1: Sequenzen der verwendeten ORNs. ....	151
Tabelle 6.2: Sequenzen der verwendeten CpG-ODNs. ....	152
Tabelle 6.3: Sequenzen der verwendeten bpcODNs.....	152

---

## 6.5 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Personen, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen und mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. Gunther Hartmann für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Bereitstellung der Labore bedanken. Professor Dr. Hartmann hat meine Begeisterung für das Gebiet der immunstimulatorischen Nukleinsäuren geweckt. Ich bedanke mich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, mich vertieft mit diesem Thema auseinander zu setzen, und dass ich in einer motivierenden und wissenschaftlich orientierten Umgebung meine Promotion durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt auch dem Arbeitsgruppenleiter Dr. Winfried Barchet, der meine Projekte betreut und mit vielen guten und hilfreichen Ideen maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat. Bei technischen und wissenschaftlichen Fragen war er immer zu einem Gespräch bereit und hat mir jederzeit weitergeholfen. Ich möchte mich auch ganz herzlich dafür bedanken, dass er mir das Vertrauen geschenkt und die Möglichkeit gegeben hat, neben meiner eigenen Arbeit Praktikanten und eine Medizindoktorandin zu betreuen.

Den „Post-Docs“ Dr. Martin Schlee und Dr. Markus Janke gilt großer Dank. Sie haben mir bei methodischen Problemen gerne ausgeholfen und mir immer mit guten Ratschlägen und Ideen zur Seite gestanden. Bei dem technischen Assistenten Malte Stasch und der Medizindoktorandin Alina Henn möchte ich mich insbesondere für die Zeit während der Endphase meiner Doktorarbeit bedanken, in der mir beide im Labor einen Teil der Arbeit abgenommen haben.

Genauso möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern der „KlinPharm“ bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und das Voranschreiten meiner Arbeit unterstützt haben. Neben der Labortätigkeit hatte Christiane Ahrlmeyer immer ein offenes Ohr für organisatorische und persönliche Fragen und hat mir mit ihrer herzlichen und freundlichen Art oft weitergeholfen – dafür möchte ich mich bedanken. Für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanke ich mich bei Jörg Bedorf aus dem Institut für Pathologie in Bonn.

---

Großer Dank gilt auch Professor Dr. Percy Knolle für die Bereitstellung der Laborräume und Geräte im IMMEI insbesondere während der Anfangszeit meiner Promotion. Er und die Mitarbeiter des IMMEIs haben mir einen schnellen Einstieg in die Arbeit für meine Promotion ermöglicht, und mir bei Fragestellungen zu meinen Projekten während den Seminaren sowie bei methodischen Fragen weitergeholfen. Auch nach dem Umzug in unsere „neuen“ Laborräume wurde ich von meinen Kollegen der klinischen Chemie und Pharmakologie freundlich empfangen und möchte mich dafür bedanken.

Nicht zuletzt gilt Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer wieder Motivation und Durchhaltevermögen gegeben haben. Dabei möchte ich insbesondere meine Eltern Rita Wimmenauer und Dr. Dirk Wimmenauer sowie David Hoven hervorheben, die mich immer wieder in meinem Vorhaben bestärkt und unterstützt haben.

Auch die finanzielle und ideelle Förderung durch die bischöfliche Studienstiftung „Cusanuswerk“ während meines Studiums und der Promotion war eine große Unterstützung. Daher möchte ich mich bedanken für die Förderung meiner gesamten weiterführenden und wissenschaftlichen Ausbildung.