

# **Evaluation der MDA-5 abhängigen Immunstimulation durch virale Replikons und enzymatisch hergestellte Polynukleotide**

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

Alina Henn  
aus Aachen

2013

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Gunther Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Eicke Latz

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.04.2013

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie  
Universitätsklinikum Bonn  
Direktor: Prof. Dr. Gunther Hartmann

## **Meinen Eltern**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1 Das humane Immunsystem.....	12
1.1.1 Toll-like-Rezeptoren .....	13
1.1.2 NOD-like Rezeptoren .....	15
1.1.3 Retino acid-inducible-gene I-like Helikasen.....	15
1.2 MDA-5 eine RIG-I like Helikase.....	16
1.2.1 Vom Liganden zum Effekt .....	17
1.3 Adenosindesaminase (ADAR).....	24
1.4 Zellen des Immunsystems.....	25
1.4.1 Dendritische Zellen .....	26
1.4.2 Monozyten.....	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	28
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
2.1 Herstellen der Stimuli .....	30
2.1.1 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren am Photometer.....	30
2.1.2 Produktion langer Einzelstrang-RNA mit der PNPase.....	30
2.1.3 Aufreinigung der RNA mit Phenol-Chloroform-Extraktion .....	31
2.1.4 Aufreinigung der RNA mit mini Quick Spin Columns.....	32
2.1.5 Sonifizieren von RNA .....	32
2.1.6 Isolierung von EMCV-RNA.....	32
2.1.7 Virale Replikons: Transformation von Plasmiden in Bakterien .....	33
2.1.8 Maxipräp .....	34
2.1.9 Minipräp .....	35
2.1.10 Linearisierung von DNA .....	36
2.1.11 <i>In vitro</i> -Transkription .....	36
2.2 Stimulation von murinen mDC und humanen Monozyten .....	37
2.3 Zellkultur.....	38
2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	38
2.3.2 Zellzahlbestimmung .....	38

2.4	Isolierung von humanen Monozyten .....	39
2.5	Gewinnung von murinen Knochenmarkszellen und Differenzierung zu mDC .....	41
2.6	Gelelektrophorese .....	42
2.6.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	42
2.6.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	43
2.7	Zytokinmessung .....	43
2.7.1	Allgemeines.....	43
2.7.2	Humanes Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) .....	44
2.7.3	Murines IFN- $\alpha$ .....	45
2.8	Statistisches Verfahren .....	46
2.9	Material .....	47
2.9.1	Geräte und Laborausstattung.....	47
2.9.2	Kleingeräte .....	47
2.9.3	Chemikalien .....	48
2.9.4	Isolation von Monozyten.....	49
2.9.5	ELISA .....	50
2.9.6	Gelelektrophorese .....	50
2.9.7	Stimuli-Produktion .....	50
2.9.8	Zellen und Zellkultur.....	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
3.1	Modifikationen von pl:C.....	52
3.1.1	Sonifizieren von pl:C .....	52
3.1.2	Sequenzvariation von pl:C .....	55
3.1.3	Verdünnungsreihe .....	62
3.2	Statistische Analyse .....	64
3.3	Untersuchung des viralen Liganden.....	68
3.3.1	EMCV-RNA Kinetiken .....	68
3.3.2	Virale Replikons .....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
4.1	Interpretation der Ergebnisse.....	73
4.2	Klinische Bedeutung .....	80
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>

<b>Anhang</b> .....	<b>83</b>
Abbildungsverzeichnis .....	83
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>84</b>
<b>7. Danksagung</b> .....	<b>94</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A:C	Adenosin-Cytidin
ADAR	Adenosin deaminase acting on double stranded RNA
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
C20	Ersten 20 Codons des Capsid-Proteins
CARD	Caspase recruitment Domäne
Cardif	CARD adaptor inducing IFN- $\beta$
CD	Cluster of differentiation
cDC	Conventional dendritic cell
CSF	Colony stimulating factor
CTD	C-terminal domain
DC	Dendritic cell
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dsRNA	Double stranded ribonucleic acid
E22	Letzte 22 Codons des Envelope-Proteins
EDTA	Ethylenediaminetetraacetat
eIF2	Eucaryotic initiation factor 2
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
FADD	Fas-associated death domain
FFP	Fresh frozen plasma
FMDV2A	Foot-and-mouth disease virus 2A coding sequence für eine Autoprotease
G:A	Guanosin-Adenosin
G:C	Guanosin-Cytidin
G:U	Guanosin-Uracil
GDD	Glycine- aspartate-aspartate

GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
I:A	Inosin-Adenosin
I:C	Inosin-Cytidin
I:U	Inosin-Uracil
IFN	Interferon
IFNAR	Typ I Interferon receptor complex
IL	Interleukin
IPS-1	IFN- $\beta$ promotor stimulator-1
IRES	Internal ribosome entry side
ISGF	IFN-stimulated gen factor
ISRE	IFN-stimulated response element
IVT	<i>In vitro</i> -Transkription
JAK	Janus Kinase
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2
LRR	Leucine-rich repeat
luc	Luciferase
MACS	magnetic cell sorting
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDA-5	Melanoma-differentiation associated gene 5
mDC	Myeloid dendritic cell
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger RNA
Mx-Protein	Myxovirusresistenz-Protein
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NAK	NF- $\kappa$ B-activating kinase
NAP	NAK-associated protein
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NIPC	Natural interferon producing cells
NLR	Nucleotide-oligomerization domain-like Rezeptoren

NLRC4	NLR family, CARD domain containing 4
NLRP	NOD-like Rezeptor
NOD	Nucleotide-oligomerization domain
NS	Nicht-Strukturprotein
NTR	Nontranslated region
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
pC-U	polyCytidinUracil (in einem Strang)
pdAdT	Polydeoxyadenylic-polydeoxycytidylic acid sodium salt
pDC	Plasmacytoid dendritic cells
pG	Polyriboguanosin
pl	Polyriboinosin
pl:C	Polyriboinosinic:polyribocytidylic acid
pl-G	polyInosinGuanosin (in einem Strang)
PKR	Proteine kinase activated by RNA
PNPase	Polyribonukleotidphosphorylase
PRR	Pattern recognition receptors
RIG-I	Retino acid-inducible-gene I
RLH	Retino acid-inducible-gene I –like helicases
RNA	Ribonucleicacid
SEM	Standard error of the mean
Sind	Sindbisvirus
SINTBAD	Similar to NAP1 TBK1 adaptor
ssRNA	Single stranded ribonucleid acid
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TANK	TRAF family member-associated NF-κB activator
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBK	TANK-binding kinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TICAM1	TIR-domain-containing molecule
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRIF	TIR-domain-containing adapter inducing IFN-beta
TYK	Tyrosin-Kinase
VISA	Virus-induced signaling adaptor
VpG	Viral protein g
VSV	Vesicular stomatitis virus
YF	Yellow fever

# 1. Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Die Evolution hat im Laufe von Jahrmillionen immer komplexere Lebensformen hervorgebracht. Die Entwicklung vom Einzeller zum Säugetier war nur dadurch möglich, dass die unterschiedlichen Spezies gelernt haben, sich gegen Feinde zu wehren. Dabei geht es nicht nur um „externe“ Fressfeinde, sondern vor allem um „interne“ Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, die den Organismus schädigen und somit für alle Lebewesen eine große Bedrohung darstellen. Eindringene Krankheitserreger müssen vom Körper als „fremd“ erkannt und bekämpft werden. Für diese wichtige Aufgabe ist das Immunsystem verantwortlich.

Voraussetzung für die Bekämpfung von Krankheitserregern ist die Abgrenzung zu körpereigenen Strukturen. Die Immunantwort muss die Waage halten zwischen Elimination des fremden Eindringlings und Schutz der eigenen Zellen. Sollte dieses Gleichgewicht gestört sein, kann es auf der einen Seite zu fehlender und auf der anderen Seite zu überschießender Reaktion bzw. Autoimmunreaktionen kommen. Die Immunantwort auf ein als fremd erkanntes Pathogen sollte möglichst spezifisch erfolgen, um eine gezielte Bekämpfung zu garantieren. Ebenso ist eine schnelle Reaktion des Immunsystems wichtig, um eine weitere Verbreitung des Pathogens zu verhindern.

Um den Anforderungen einer schnellen und spezifischen Reaktion gerecht zu werden gibt es bei den Säugetieren ein sogenanntes angeborenes (innates) und ein erworbenes (adaptives) Immunsystem. Diese formelle Einteilung darf allerdings keinesfalls als absolut gesehen werden, da die Mechanismen der beiden Komponenten ineinander greifen und aufeinander aufbauen. So kann das angeborene Immunsystem durch Interferonproduktion und Aktivierung antigenpräsentierender Zellen die spätere spezifische Immunantwort induzieren (Medzhitov und Janeway, 1997).

Das adaptive Immunsystem ist für eine spezifisch gegen den jeweiligen Erreger gerichtete Antwort zuständig. Es erkennt dabei Antigene der eingedrungenen Krankheitserreger über spezielle Rezeptoren auf B- und T-Lymphozyten. Diese Rezeptoren sind jeweils gegen eine bestimmte pathogene Struktur gerichtet. Dabei ist das Spektrum, das erkannt wird, nicht bei Geburt festgelegt, sondern im Laufe des Lebens erworben und abhängig davon, mit welchen Pathogenen der Organismus in Kontakt

kommt. Die Variabilität wird durch somatische Rekombination der Gene erreicht (Hozumi und Tonegawa, 1976). Der genetische Umlagerungsprozess sorgt dafür, dass die unterschiedlichen DNA–Abschnitte der Gene für die Antigen-Rezeptoren zufällig miteinander kombiniert werden. Als Translationsprodukt ergibt dies eine Fülle an Rezeptoren. So kann garantiert werden, dass eine große Anzahl an unterschiedlichen Antigenen erkannt wird und der Organismus vor dem Großteil der Pathogene geschützt wird. Das angeborene Immunsystem bedient sich im Gegensatz zu der genetischen Variabilität der B- und T-Zellen anderer Erkennungsmechanismen. Hier existieren spezialisierte und genetisch festgelegte Rezeptoren, die sogenannten Pattern recognition receptors (PRR). Diese erkennen in der Evolution hochkonservierte Strukturen (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) und haben Moleküle von Parasiten, Bakterien, Pilzen und Viren als Liganden. Einige PRRs sind speziesübergreifend vorhanden und nicht auf Immunzellen beschränkt. So ist eine Abwehr von Krankheitserregern auch bei Befall somatischer Zellen garantiert (Janeway und Medzhitov, 2002). Die speziesübergreifende Präsenz spricht für eine frühe evolutionäre Entwicklung der PRRs.

Die Pattern recognition receptors kann man in unterschiedliche Gruppen einteilen

1. Die Toll-like Rezeptoren (TLR)
2. Die Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLR)
3. Die Retinoic acid-inducible-gene I –(RIG-I)like Helikasen

### **1.1.1 Toll-like-Rezeptoren**

Die TLRs sind eine Gruppe von transmembranären Rezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und ihrer Abwehr einnehmen. Sie können auf der Zelloberfläche, aber auch im endosomalen Kompartiment lokalisiert sein. Seit 1985, als erstmals eine Beschreibung der Rolle des Toll-Gens bei der Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* durch die Arbeitsgruppe um Christiane Nüsslein-Volhardt erfolgte (Anderson et al., 1985a; Anderson et al., 1985b), wurden eine Vielzahl an unterschiedlichen TLRs und ihre zugehörigen Liganden identifiziert.

Nachdem bekannt wurde, dass Toll-defiziente *Drosophila* ein deutlich geringeres Überleben bei Pilzinfektionen zeigten, wurde 1998 LPS als der Ligand für TLR4 entdeckt

(Lemaitre et al., 1996; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). In den folgenden Jahren wurden immer mehr Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden identifiziert. Generell kann man solche mit Lipidliganden (TLR1, 2, 4 und 6), solche mit Proteinliganden (TLR5 und 11) und solche, die Nukleinsäuren erkennen (TLR3, 7, 8 und 9), unterscheiden. Dabei sind die unterschiedlichen Rezeptoren auch an unterschiedlichen Stellen der Zelle lokalisiert. Der Großteil der Toll-like Rezeptoren, der vor allem für die Erkennung von Parasiten-, Bakterien- und Pilz-Molekülen verantwortlich ist, befindet sich auf der Zelloberfläche. Die Rezeptoren, die für die Erkennung von DNA und RNA verantwortlich sind, sind dagegen im endosomalen bzw. lysosomalen Kompartiment lokalisiert. Diese Lokalisation scheint ein wichtiges Unterscheidungskriterium der Rezeptoren von zelleigener und fremder Nukleinsäuren zu sein. Zwar kommen in der Zelle auch ssRNA und dsDNA vor, diese befinden sich allerdings nicht im Endosom oder Lysosom, sondern im Zytoplasma bzw. im Zellkern (Takeda und Akira, 2005). Nukleinsäure-erkennende Toll-like Rezeptoren sind wichtig, um nach viraler oder bakterieller Infektion schnell fremde DNA, oder RNA zu identifizieren und eine sofortige Reaktion des Immunsystems zu garantieren.

Den TLRs ist gemeinsam, dass sie eine extrazelluläre bzw. intraendosomale Komponente haben, die für die Erkennung des Pathogens zuständig ist. Des Weiteren besitzen sie einen transmembranären Teil, an den sich eine intrazelluläre Domäne anschließt, die für die Signalweiterleitung zuständig ist. Sie werden nicht in sämtlichen Zellen, sondern vorwiegend in Immunzellen exprimiert. Die Expression variiert zell- und spezieabhängig. So kommt z.B der dsRNA erkennende TLR3 nicht in humanen Monozyten, aber in humanen cDC (conventional dendritic cells) vor (Muzio et al., 2000).

Die unterschiedlichen Toll-like Rezeptoren besitzen unterschiedliche Signalkaskaden. Man unterscheidet einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Weg. MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) ist ein Adaptor-Protein, das eine zentrale Rolle in den meisten TLR- und im Interleukin-1-Signalweg spielt (Burns et al., 1998; Dunne et al., 2003; Muzio et al., 1997; O'Neill et al., 2003). Dies führt unter anderem zur Freisetzung von NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), einem Transkriptionsfaktor, der nachdem er in den Zellkern gelangt ist, zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen führt und somit eine Entzündungsreaktion in Gang setzt.

Die Aktivierung von TLR 3 und TLR 4 bewirkt die Signalweiterleitung über den

MyD88-unabhängigen Weg (bei TLR 4 zusätzlich zum MyD88-abhängigen). Hier ist das Protein TRIF (Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adapter inducing IFN-beta) auch bekannt unter TICAM-1 (TIR-domain-containing molecule-1) wesentliches an der Signalweiterleitung beteiligt (Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Am Ende der Kaskade steht die Translokation des Transkriptionsfaktors IRF 3 in den Zellkern. Dort induziert dieser die Produktion von IFN- $\beta$ .

Zusätzlich führt der MyD88-unabhängige Weg mit einer verspäteten Kinetik zu einer Freisetzung von NF- $\kappa$ B (Kawai et al., 2001).

### **1.1.2 NOD-like Rezeptoren**

Die NLR verfügen in ihrer Architektur gemeinsam über eine so genannte nucleotid oligomerization domain und eine C-terminale leucine-rich repeat (LRR) domain. Anhand einer dritten variablen Domäne, die N-terminale Domäne, lassen sich noch vier Subfamilien unterscheiden.

Die Nod-like Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Abwehr von Bakterien. Dabei können unterschiedliche Mitglieder der NLR-Familie multimolekulare Komplexe bilden, das sogenannte Inflammasom (Martinon et al., 2002). Die Benennung des Inflammasomes erfolgt nach dem zugrunde liegenden NOD-like Rezeptor (NLRP1, NLRP3, NLRC4). Es führt zur Aktivierung von Caspase-1, die über Spalten von pro-IL-1 (Interleukin-1) und pro-IL-18 in deren aktive Teile zur Entzündungsreaktion führt (Williams et al., 2010). Kürzlich wurde zusätzlich bekannt, dass Nod2 eine Rolle bei der zytosolischen Erkennung von ssRNA hat (Sabbah et al., 2009).

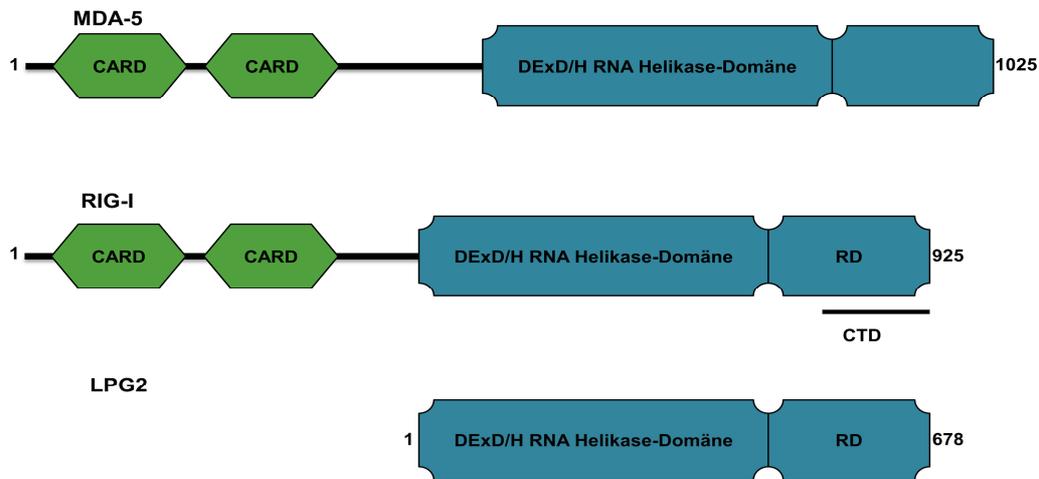
### **1.1.3 Retino acid-inducible-gene I-like Helikasen**

RIG-I-like Helikasen sind eine Familie von Rezeptoren, die im Zytosol vorliegen und für die Erkennung von viraler RNA verantwortlich sind. Man unterscheidet RIG-I (retino acid-inducible-gene I), MDA-5 (melanoma differentiation gene 5) und LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2).

Sie kommen nicht ausschließlich in Immunzellen vor, sondern auch in somatischen Zellen (Kang et al., 2004). Dies ist wichtig, da häufig somatische Zelltypen selektiv von Viren infiziert werden und hierauf eine schnelle Reaktion des Immunsystems erfolgen muss. Die Tatsache, dass diese Rezeptoren ubiquitär vorkommen, macht diese Rezeptoren auch für die Forschung interessant, da durch eine Stimulation nicht nur eine spezifische Klasse, sondern ein Großteil der Zellen des Organismus erreicht werden können und so ein potentiell großer therapeutischer Effekt besteht. Eine weitere Besonderheit dieser Rezeptoren ist, dass sie im Gegensatz zu Toll-like Rezeptoren zytoplasmatisch vorliegen.

## **1.2 MDA-5 eine RIG-I like Helikase**

Der Aufbau der Rezeptoren RIG-I und MDA-5 ist ähnlich. Beide enthalten ATPase aktive DExD/H-Box-Helikase Domänen. An ihrem Amino-Terminus besitzen sie zwei CARD (Caspase recruitment Domänen), die essentiell für die Signalübermittlung sind, wenn ein Ligand gebunden wurde (Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004). RIG-I besitzt zusätzlich eine Repressor-Domäne, die das RIG-I vermittelte Signal blockieren kann. Desweiteren befindet sich am Carboxyl-Ende ein mit der Repressor-Domäne überlappender Bereich, der RNA binden kann, die CTD (C-terminal domain). Der zytosolische Rezeptor LGP2 bindet ebenfalls dsRNA mit hoher Affinität (Yoneyama et al., 2005). Er hat wie RIG-I eine Repressor-Domäne am C-Terminus und eine Helikase-Domäne. Im Gegensatz zu den beiden anderen RIG-I-like Helikasen besitzt er allerdings keine für die Interaktion mit IPS1 notwendige CARD-Domäne. LGP2 gilt als Regulator der Immunantwort auf Aktivierung von MDA-5 bzw. RIG-I. Während LGP2 defiziente Zellen auf pl:C und VSV (Vesicular stomatitis virus) ein verringertes Interferon-Level aufweisen, zeigen sie auf EMCV (Encephalomyocarditisvirus)-Infektion einen vermehrten Typ1 Interferonanstieg (Venkataraman et al., 2007). So scheint LGP2 eine positiv- oder negativ- regulatorische Funktion zu besitzen, abhängig von dem jeweiligen Virus bzw. Rezeptor (Rothenfusser et al., 2005; Takeuchi und Akira, 2008).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der RIG-I-like Helikasen (nach Barral et al., 2009)**

Sowohl RIG-I, als auch MDA-5, als auch LPG2 besitzen die charakteristische RNA-Helikase Domäne. Die CARD-Domänen (caspase activating recruitment domain) von MDA-5 und RIG-I sind essentiell für die Weiterleitung eines immunstimulatorischen Signals nach Bindung eines Ligandens. LPG2 und RIG-I besitzen beide eine Repressor-Domäne (RD), die der Unterdrückung des Signals dient. Bei RIG-I überschneidet sich die RD mit der C-terminalen Domäne.

## 1.2.1 Vom Liganden zum Effekt

### 1.2.1.1 Liganden für MDA-5

Ursprünglich galten MDA-5 und RIG-I beide als aktivierbar durch dsRNA, die bei der Infektion bzw. bei der Replikation unterschiedlicher Viren entsteht (Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004). Im Verlauf weiterer Forschung stellte sich aber heraus, dass sich die Liganden beider Helikasen unterscheiden. Für beide sind mittlerweile „natürliche“, virale aber auch synthetisch hergestellte Liganden bekannt.

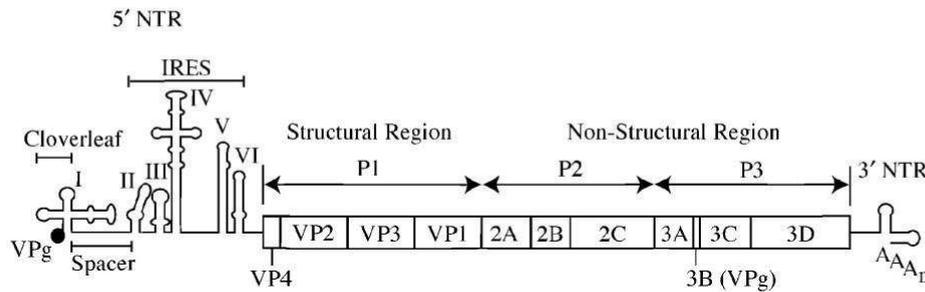
Durch Einsatz von Knockout-Mäusen wurde RIG-I zum Beispiel als Rezeptor für die RNA von Paramyxoviren, Orthomyxoviren, Influenzaviren, Vesicular stomatitis virus (VSV) und Japanese encephalitis virus (JEV) identifiziert (Kato et al., 2006). 2006 zeigten Arbeitsgruppen um Hornung und Pichlmair, dass sowohl bei *in vitro* transkribierter RNA, als auch bei Virus-RNA 5'Triphosphat-Enden für die Erkennung durch RIG-I verantwortlich sind (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Da zelleigene RNA vor Verlassen des Zellkerns durch Capping und Basenmodifikation verändert wird, ist das

Triphosphat-Ende ein geeignetes Unterscheidungskriterium um Fremd-RNA zu identifizieren. Drei Jahre später zeigten Schlee und Kollegen durch Synthese verschiedener synthetischer Oligonukleotide, dass außerdem noch die Bedingung eines mindestens 19 Nukleotid langen Doppelstrangendes erfüllt sein muss (Schlee et al., 2009).

Von MDA-5 ist die genaue Struktur, die als Ligand dient, noch nicht bekannt. Man weiß durch Experimente an MDA-5 defizienten Mäusen, dass das Polynukleotid pI:C (polyinosininc-polycytidiliy acid) selektiv von MDA-5 erkannt wird (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). pI:C ist ein langes dsRNA-Analogon, das ausschließlich Inosin-Cytidin-Basenpaarungen aufweist. Weiterhin ist bekannt, dass eine Infektion der Zelle mit Picornaviren von MDA-5 erkannt wird (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). Der Name dieser Viren-Familie stammt von Pico-RNA, da sie zu den kleinsten RNA-Viren zählen. Sie sind unbehüllt und besitzen als Genom eine lineare einzelsträngige RNA von positiver Polarität. Betrachtet man das Genom genauer, so zeigen sich am 3'-und am 5'-Ende nicht kodierende Bereiche (not-translated region, NTR). Dazwischen liegt der ORF (open reading frame). Dieser kodiert ein Vorläufer-Polyprotein, das noch während der Translation in einzelne Proteine gespalten wird.

Das 5'-Ende ist kovalent an ein Peptid-Cap gekoppelt (viral protein g-cap, Vpg-cap) (Lee et al., 1977). Dies besteht aus 22 Aminosäuren und erklärt, warum Picornaviren nicht über RIG-I erkannt werden können. Das 3'-Ende zeigt einen für positiv-Strang-Viren typischen poly-A-Schwanz. In der 5'-NTR befindet sich eine Sequenz, die zu einer komplexen Sekundärstruktur gefaltet ist. Sie wird IRES (internal ribosome entry side) genannt und dient als Startpunkt der Translation (Jang et al., 1988).

Schon alleine die RNA der Viren ist infektiös und kann zur Replikation innerhalb der Zelle führen. Dies liegt daran, dass durch die positive Polarität des Genoms für die Zelle eine funktionelle mRNA vorliegt und eine sofortige Translation stattfinden kann, so dass für die Replikation notwendige Proteine produziert werden. Inwiefern die Sequenz der RNA oder die Sekundärstruktur des Genoms eine Rolle bei der Detektion der Virusinfektion durch MDA-5 spielt, ist noch nicht geklärt.



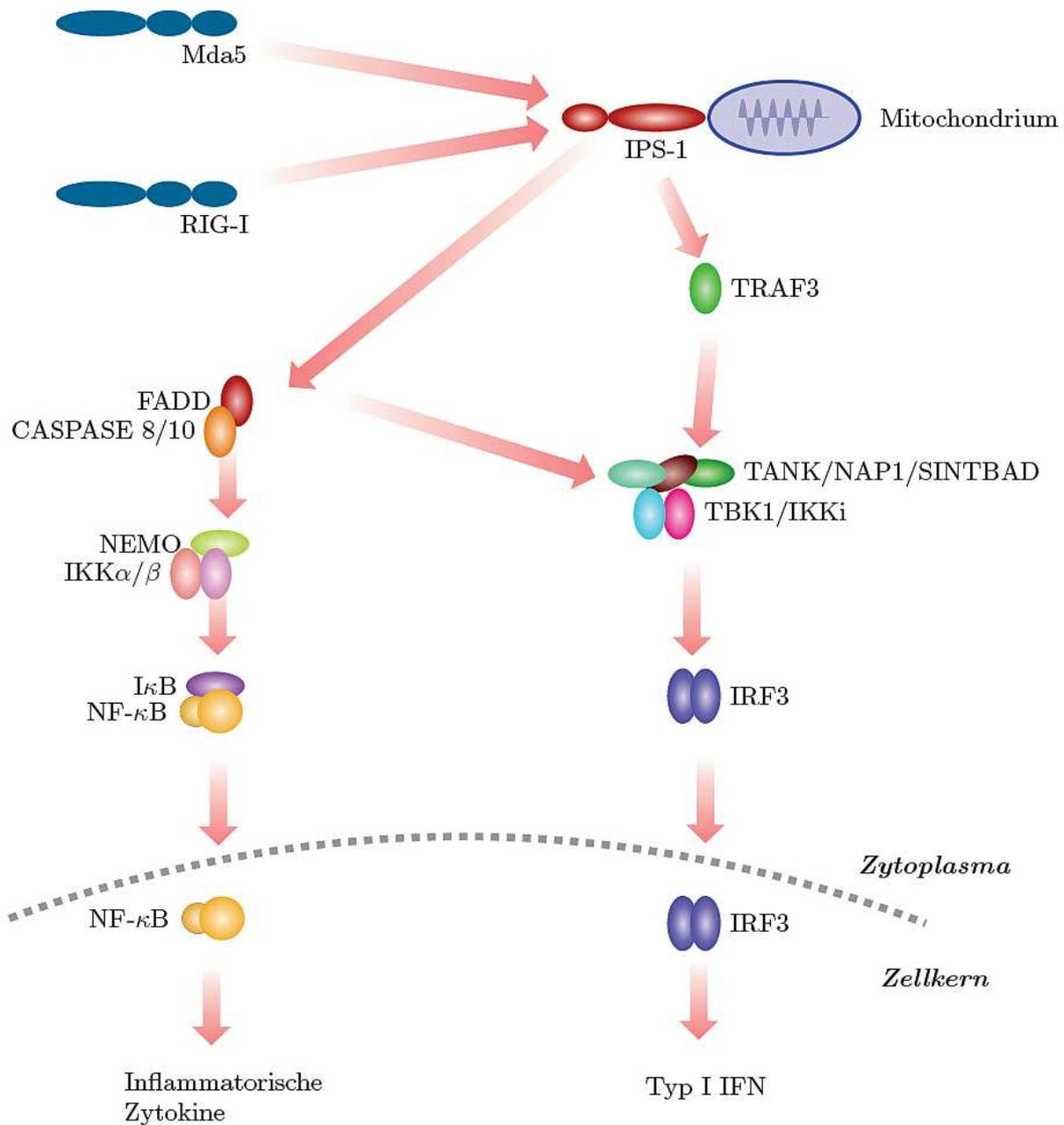
**Abb. 2: Aufbau des Genoms eines Poliovirus vom Typ 1 (nach De Jesus, 2007)**

### 1.2.1.2 Signalweg der RIG-I-like Helikasen

Wie erwähnt sind die CARD-Domänen bei RIG-I und MDA-5 essentiell für die Signalübertragung. Diese interagiert nach Aktivierung mit dem Adaptermolekül IPS-1 (Interferon- $\beta$  promotor stimulator 1). Da das Protein ungefähr zeitgleich von unterschiedlichen Gruppen entdeckt wurde, ist IPS-1 auch unter den Namen VISA (virus-induced signaling adaptor), Cardif (CARD adaptor inducing IFN- $\beta$ ) oder MAVS (mitochondrial antiviral signaling) bekannt (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Es besitzt ebenfalls eine CARD-Domäne und ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. IPS-1 bindet an TRAF3 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3), einer Ubiquitin-Ligase (Oganesyan et al., 2006; Saha et al., 2006). TRAF3 bildet daraufhin einen Komplex mit zwei Kinasen: TBK1 (TANK-binding kinase 1) und Ikki (inducible I $\kappa$ B kinase). TBK1 und Ikki interagieren mit den Molekülen TANK (TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator), NAP1 (NAK-associated protein 1) und SINTBAD (similar to NAP1 TBK1 adaptor) (Guo und Cheng, 2007; Ryzhakov und Randow, 2007; Sasai et al., 2006). Dadurch sind sie nun in der Lage die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 zu phosphorylieren. Phosphorylierung dieser Proteine führt zur Bildung von Homo- und/oder Heterodimeren, die in den Zellkern translozieren können. Im Zellkern werden nun unterschiedliche Gene für Synthese der Typ I Interferone abgelesen (Fitzgerald et al., 2003).

Neben dem Signalweg, der zur Aktivierung von IRF3 und IRF7 führt, kann IPS-1 über einen Signalweg zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Hier interagiert IPS-1 mit FADD (Fas-associated death domain protein), Caspase8 und Caspase10. Dieser Komplex aktiviert einen IKK-Komplex, der wiederum für die Freisetzung des Transkriptionsfaktors

NF- $\kappa$ B sorgt. Dieser ist verantwortlich für die Ableitung verschiedener Gene, die zur Produktion von Interferonen führt (Kawai und Akira, 2008).



**Abb. 3: Signalweg der RIG-I like Helikasen (nach Kawai und Akira, 2008)**

RIG-I und MDA-5 interagieren mit dem in der Mitochondrienmembran vorhandenen Adaptormolekül IPS-1. Über unterschiedliche Signalkaskaden werden anschließend Transkriptionsfaktoren aktiviert. Dadurch werden Gene für inflammatorische Zytokine bzw. Typ I Interferon abgelesen.

### 1.2.1.3 Die Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um Glykoproteine, die Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen haben. Man kann sie in mehrere Untergruppen einteilen.

1. Interferone (IFN)
2. Interleukine (IL)
3. Chemokine
4. Kolonie stimulierende Faktoren (colony stimulating factors, CSF)
5. Tumornekrosefaktoren (TNF)

Zytokine spielen bei der Immunabwehr eine entscheidende Rolle. So sind beispielsweise Chemokine für die Leukozyten- und Monozytenimmigration ins Gewebe verantwortlich. Die Immunzellen bewegen sich entlang des Chemokin-Gradienten zum Entzündungsfokus.

Der Tumornekrosefaktor (TNF) ist ein Zytokin mit zahlreichen Funktionen. Er wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und hat neben der Funktion Fieber auszulösen auch noch die Aufgabe Makrophagen zur Phagozytose anzuregen und neutrophile Granulozyten und NK-Zellen zu aktivieren.

Für diese Arbeit sind die Interleukine und besonders die Interferone von besonderer Bedeutung. Interleukine spielen eine wichtige Rolle bei der Verbindung zwischen der unspezifischen angeborenen Immunantwort und dem adaptiven Immunsystem. Für die Regulation der verschiedenen Immunzellen sind sie unerlässlich. Als Botenstoffe, die das Wachstum, die Maturation oder Teilung verschiedener Immunzellen beeinflussen, sind sie keine homogene Gruppe sondern in mehrere Untergruppen unterteilt. Sie können sowohl immunstimulatorisch, als auch immuninhibierend wirken. Besonders erwähnt seien IL-12, das eine entscheidende Rolle in der Regulation der erworbenen Immunantwort spielt und IL-10, das immuninhibitorische Funktionen besitzt.

Nach Stimulation mit einem TLR8 Liganden produzieren humane Monozyten IL-12 (Bekeredjian-Ding et al., 2006). Dies führt unter anderem bei Kostimulation mit IL-2 zur Proliferation und Differenzierung von B-Zellen (Jelinek und Braaten, 1995). Aber auch die T-Zell-Antwort wird zu Gunsten einer Th1-Antwort beeinflusst und die Produktion unterschiedlicher Zytokine in T-Zellen angeregt, oder inhibiert. IL-10 kann im Gegensatz dazu die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen und die Entzündungsreaktion anderer Immunzellen inhibieren (Fiorentino et al., 1991; Joss et al., 2000).

Als eine weitere große Gruppe der Zytokine stellen sich die Interferone dar. Hierbei unterscheidet man heutzutage die Interferone von Typ I und Typ II. Die Gruppe der TypII Interferone enthält ausschließlich das IFN- $\gamma$ . Dieses Zytokin wird zwar nicht unmittelbar auf eine virale Infektion ausgeschüttet, weil es jedoch von unterschiedlichen T-Zellen und NK-Zellen produziert wird, hat es somit eine entscheidende Funktion bei der adaptiven Immunantwort (Farrar und Schreiber, 1993).

Zur Klasse der TypI Interferone zählen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$ . IFN- $\tau$  ist beim Menschen nicht bekannt. Im Gegensatz zu IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$ , bei denen jeweils nur eine Isoform bekannt ist, existieren von IFN- $\alpha$  mehrere Isoformen, die im humanen System alle auf dem Chromosom 9 codiert werden (Pestka, 2000).

Die TypI Interferone sind entscheidend bei der antiviralen Reaktion des innatensystems beteiligt. Sie vermitteln eine Sofortreaktion nach Erkennung von viraler Nukleinsäure durch die Zellen. Hierbei spielen vor allem IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  eine große Rolle. Sie werden ebenso in geringen Mengen kontinuierlich ohne Vorhandensein einer Infektion exprimiert (Taniguchi und Takaoka, 2001).

TypI Interferone binden an den Rezeptorkomplex IFNAR (Typ I Interferon receptor complex). Dieser ist transmembranär auf der Zelloberfläche exprimiert und besteht aus zwei Untereinheiten, der IFNAR-1 und der IFNAR-2. Diese gehören zur Klasse-II-Zytokinrezeptoren (Uze et al., 1995). Obwohl die TypI Interferone an denselben Rezeptor binden, kann dieser zwischen den unterschiedlichen Subtypen unterscheiden. So kann z.B. IFN- $\beta$  durch Bildung eines Komplexes der Rezeptor-Untereinheiten, der nicht bei IFN- $\alpha$  entsteht, andere Effekte in der Zelle hervorrufen (Platanias et al., 1996). Nach Bindung von TypI IFN an den Rezeptor aktiviert dieser mit seiner intrazellulären Domäne an die Tyrosin-Kinase TYK-2 und die Janus-Kinase JAK-1 (Silvennoinen et al., 1993).

Nach Phosphorylierung der IFNAR-1 und IFNAR-2 Einheiten durch die Kinasen, werden STAT (signal transducer and activator of transcription)-1 und STAT-2 rekrutiert. Diese bilden ein Heterodimer und bilden mit p48, einem DNA-bindenden Protein, einen Komplex, den ISGF3 (IFN-stimulated gen factor-3). Der Komplex transloziert in den Nukleus, wo er an die ISRE (IFN-stimulated response element) binden kann. ISRE liegt in der Promotorregion der Gene, die durch TypI IFN induziert werden können. Durch Binden des ISGF3 an ISRE wird die Transkription dieser Gene initialisiert (Bekisz et al., 2004).

Typl Interferone können sowohl eine direkte unspezifische Immunreaktion hervorrufen, als auch die adaptive Immunantwort beeinflussen. Generell kann man sagen, dass sie die Zielzelle in einen antiviralen Zustand versetzen. Dazu gehört die direkte Reaktion mit Synthese und Modifikation von antiviralen Proteinen. Somit soll eine Vermehrung und Freisetzung der Viren und eine dadurch einhergehende Ausbreitung der Infektion verhindert werden.

Eines dieser Proteine ist die Proteinkinase PKR. Sie ist durch IFN induzierbar und wird durch dsRNA ausgelöste Autophosphorylierung aktiviert. Nach Aktivierung kann die PKR verschiedene zelluläre Proteine phosphorylieren unter anderem eIF2 (eukaryotic initiation factor 2) (Samuel, 1979). Dieser Schritt führt zu einer Inhibierung der Translation und somit auch zu einer verminderten eigenen und viralen Proteinsynthese (Balachandran et al., 2000).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus um die Replikation von Viren zu unterdrücken ist das 2'-5'-Oligoadenylatsynthetasesystem. Die Oligoadenylatsynthetase kommt in humanen Zellen in drei verschiedenen Isoformen vor, die alle auf Chromosom 12 kodiert und durch Interferon induzierbar sind (Rebouillat und Hovanessian, 1999). Sie katalysiert die Synthese von ATP zu Oligoadenylaten, die 5'-Triphosphoryliert und 2'-5'-Phosphodiester-verbunden sind (2'-5'-A). Bei der Anwesenheit von 2'-5'-A kann dieses an die RNaseL binden, die dadurch aus der inaktiven monomeren Form in die aktive dimere Form übergeht. Die aktivierte RNaseL degradiert nun sowohl virale, als auch zelluläre RNA (Player und Torrence, 1998). Zusätzlich kann die RNAaseL durch ihre entstehenden Abbauprodukte erneut Typl Interferone induzieren. Dieser positive Feedback-Mechanismus ist als RIG-I-, MDA-5- und IPS-1-abhängig beschrieben (Malathi et al., 2007).

Eine weitere Klasse von Proteinen, die rein Typl IFN abhängig produziert werden, sind die Mx(Myxovirusresistenz)-Proteine. Diese Enzyme besitzen eine GTPase-Aktivität, die wichtig für die virale Abwehr ist. Sie interagieren mit dem Virus-Nukleokapsid und verhindern, dass virale Partikel in den Zellkern gelangen (Kochs und Haller, 1999a, b). Dadurch wird das Virus am Einschleusen von fremdem Genmaterial und der Replikation gehindert.

Ein für diese Arbeit wichtiges Enzym, dessen Produktion auch durch die Typl Interferone induziert wird, ist ADAR (adenosinedesaminase acting on double stranded RNA). Wie

der Name sagt, nimmt ADAR Modifikationen an dsRNA vor, indem es Adenosin desaminiert. Eine weitere Beschreibung dieses Enzyms erfolgt weiter unten.

Neben den direkten Effekten in der Zelle haben die Typ1 Interferone auch auf andere Immunzellen eine Wirkung. Sie beeinflussen die Differenzierung von pDC (plasmacytoid dendritic cells) und mDC (myeloid dendritic cells), wobei DCs im Sinne eines autokrinen Mechanismus auch Interferone produzieren (Montoya et al., 2002). IFN kann Kreuzpräsentation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen unabhängig von CD4<sup>+</sup> Zellen initiieren (Le Bon et al., 2003). Des Weiteren steigert es die Erzeugung der IgG-Antikörper und induziert die Produktion von langlebigen Antikörpern, also die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (Le Bon et al., 2001). Die Zytotoxizität von NK-Zellen (natural killer cells) wird verstärkt, die Phagozytoseaktivität von Makrophagen wird verbessert, und die Lebensdauer aktivierter T-Zellen verlängert (Marrack et al., 1999; Ortaldo et al., 1981; Sampson et al., 1991).

### 1.3 Adenosindesaminase (ADAR)

In eukaryotischen Zellen finden nach der Transkription von RNA im Zytosol Modifikationen statt. Dabei werden neben dem Spleißen der RNA auch Umformungen an einzelnen Basen vorgenommen (RNA-Editing) und so die in der RNA enthaltene Information gezielt verändert.

Ein Enzym, das gezielte Modifikationen an der Base Adenosin durchführen kann, ist das Enzym ADAR (Adenosin deaminase acting on double stranded RNA). Es ist in Säugetierzellen in drei verschiedenen Varianten bekannt, die alle auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert werden. Neben einer Form, die nur im Gehirn exprimiert wird, gibt es eine nur im Nukleus anderer Gewebe vorkommende ADAR (Nishikura, 2010). Zusätzlich existiert noch eine zytosolische Form, die ADAR1, die durch Interferon induzierbar ist (Patterson und Samuel, 1995). ADAR1 desaminiert Adenosin zu Inosin, bestehend aus der Purinbase Hypoxanthin und Ribose. Dafür wird dsRNA lokal entwunden und einige Adenosine (bis zu 50 % der RNA) im Strang konvertiert (Bass und Weintraub, 1988; Wagner et al., 1989). Hierbei stehen sich zunächst Inosin und Uridin gegenüber. Allerdings sind die Bindungen zwischen Inosin und Uracil schwächer als die normalen Basenpaarungen (Serra et al., 2004). Inosin ist dem Guanosin strukturell sehr



kann eine gezielt gerichtete Reaktion gegen den das jeweilige Antigen tragende Krankheitserreger erfolgen.

#### **1.4.1 Dendritische Zellen**

1973 wurden zum ersten mal DCs (Dendritische Zellen) mit ihrer Funktion in Mäusen beschrieben (Steinman und Cohn, 1973). Sie haben die Aufgabe, unterschiedliche Pathogene zu phagozytieren, im Zellinneren zu prozessieren und über MHC-Komplexe an ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dabei ist zu bemerken, dass DCs überall im Gewebe vorhanden sind und somit eine Schutzfunktion für den gesamten Körper haben. Wenn eine Dendritische Zelle einen Erreger aufgenommen hat, seien es einzelne Proteine, ganze Bakterien oder auch Viren, dann migriert sie von ihrem Stammgewebe in den nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie auf B- und T-Zellen trifft. Die sich dort befindlichen T-Zellen bekommen nun das Protein im MHC-Kontext von der maturierten DC präsentiert. Um die T-Zelle zu aktivieren muss das präsentierte Antigen dem eigenen entsprechen und zusätzlich noch ein kostimulatorisches Signal von Oberflächenproteinen der DCs vorliegen. Fehlt dieses, so führt das zu Toleranz der T-Zelle gegenüber dem Antigen. So führt die Phagozytose von apoptotischem Zellmaterial des Organismus nicht zur Reifung der DC und das Fehlen des Kostimulus hat Anergie der T-Zelle dem Antigen gegenüber zur Folge (Dhodapkar et al., 2001; Huang et al., 2000; Sauter et al., 2000). Werden allerdings Reste von nekrotischen Zellen phagozytiert und präsentiert, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle (Gallucci et al., 1999). Hierdurch wird Autoimmunität vermieden, aber z.B. virusinfizierte Zellen führen über Kostimulation zu einer adäquaten Immunantwort.

Durch Sekretion unterschiedlicher Zytokine und weiterer kostimulatorischer Signale können DCs die Differenzierung von T-Zellen in T1-, T2- und regulatorische T-Zellen mitbestimmen (de Jong et al., 2005). Diese sorgen mittels positiven Feedback wiederum für weitere Stimulation der DCs.

Dendritische Zellen darf man keinesfalls als homogene Gruppe auffassen. Allein im peripheren Blut des Menschen sind mindestens fünf verschiedene Arten von DCs bekannt, die sich in der Expression ihrer Oberflächenmoleküle unterscheiden (MacDonald et al., 2002). Hauptsächlich wird zwischen plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) und

myeloiden dendritischen Zellen (mDC) unterschieden. Eine Unterscheidung kann man anhand des Oberflächenmarkers CD11c treffen, wobei mDC CD11c exprimieren und pDC nicht (Robinson et al., 1999).

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen können nach Aufnahme eines Pathogens große Mengen von Interferon Typ1 produzieren. Die Detektion erfolgt dabei über die pattern recognition receptors. Schon in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde erstmals beschrieben, dass es eine Zellart geben muss, die hauptverantwortlich für die Produktion von Interferon ist (Yamaguchi et al., 1977). Allerdings dauerte es noch etliche Jahre, bis bewiesen werden konnte, dass es sich bei den NIPC (natural interferon producing cells) um die plasmazytoiden dendritischen Zellen handelte (Cella et al., 1999; Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Siegal et al., 1999).

Die myeloiden DCs können nicht solch große Mengen an Interferon produzieren, wie die pDC. Allerdings sind auch sie professionell Antigen präsentierende Zellen. Dadurch, dass sie *in vitro* leicht aus Monozyten durch Zugabe von GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und Il-4 zu generieren sind, werden sie in vielen experimentellen Studien verwendet (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Nach Stimulation mit einem CD40-Ligand maturieren sie (Cella et al., 1996). mDC lassen sich auch aus CD11c<sup>+</sup> Vorläuferzellen oder CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen durch Zugabe unterschiedlicher Zytokine bzw. Stimuli differenzieren (Caux et al., 1997; Romani et al., 1996).

### 1.4.2 Monozyten

Monozyten gehen wie Granulozyten durch Differenzierung aus myeloischen Progenitorzellen hervor. Die Differenzierung wird durch GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und MCSF (macrophage colony-stimulating factor) gesteuert. Sie sind eine phänotypisch heterogene Gruppe von im Blut zirkulierenden Zellen, die zu Phagozytose in der Lage sind. Beim Menschen machen sie 10 % und bei der Maus 4 % der Leukozyten aus. Neben dem Blut kommen sie auch im Knochenmark und der Milz vor und sind Vorläuferzellen von Makrophagen und bestimmten Subgruppen Dendritischer Zellen. Beim Menschen sind unterschiedliche Subpopulationen bekannt.

Sie werden über die Expression von CD14 und CD16 definiert. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> machen normalerweise bis zu 95 % der Monozyten im peripheren Blut aus.

Bei einer Inflammation wird durch Chemo- und Zytokine am Entzündungsort die Migration ins Gewebe vermittelt. Bei Anwesenheit von GM-CSF und MCSF differenzieren sich Monozyten in Makrophagen (Chapuis et al., 1997). Diese Makrophagen beteiligen sich dann als phagozytierende Zellen an der Bekämpfung der Infektion. Für diesen Zweck besitzen sie neben den PPR unterschiedliche Chemokin- und Adhäsionsrezeptoren. Neben der inflammatorisch vermittelten Diapedese können sich Monozyten auch zu gewebsspezifischen Makrophagen z.B. Alveolarmakrophagen, Kupfersche Sternzellen etc. differenzieren und jahrelang im entsprechenden Gewebe bleiben. Dort sind sie für Phagozytose, Antigenpräsentation und Sezernierung unterschiedlicher Zytokine zur Aktivierung der weiteren Immunantwort zuständig.

Die Differenzierung in Dendritische Zellen findet bei Stimulation der Makrophagen mit GM-CSF und IL-4 statt (Chapuis et al., 1997; Zhou und Tedder, 1996). Diese findet vor allem in inflammatorischen Situationen statt. Allerdings haben Monozyten auch im nicht-endifferenzierten Stadium immunstimulatorische Aufgaben. So produzieren sie nach Erkennung eines RNA-Pathogenes über TLR8 das Interleukin IL-12 und nach Aktivierung der RIG-I-like Helikasen durch ein zytosolisch vorliegendes Pathogen IFN- $\alpha$  (Bekeredjian-Ding et al., 2006; Kato et al., 2006).

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist, dass humane Monozyten kein TLR3 exprimieren (Muzio et al., 2000). Deswegen kann man davon ausgehen, dass bei Stimulation von Monozyten mit dsRNA die Interferonantwort ausschließlich durch MDA-5 verursacht wird.

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Das angeborene Immunsystem ist essentiell für die schnelle und effektive Abwehr von Krankheitserregern. Dabei sind unterschiedliche Rezeptoren im Endosom und im Zytosol beteiligt. Die zytosolische Helikase MDA-5 ist dafür bekannt, virale Doppelstrang-RNA als Pathogen-assoziiertes Erkennungsmuster zu detektieren und als Folge eine Interferonantwort einzuleiten, welche infizierte Zellen und umgebende Zellen in einen anti-viralen Zustand versetzt.

Obwohl die genaue Struktur, die als aktivierter Ligand erkannt wird, für viele Toll-like-Rezeptoren und auch die zytosolische Helikase RIG-I bekannt ist, ist dies bis heute für MDA-5 noch nicht gelungen.

In dieser Arbeit sollten wichtige Eigenschaften von MDA-5-Liganden identifiziert werden. Ein Ziel war dabei notwendige Charakteristika des synthetischen dsRNA-Liganden pl:C zu bestimmen. Ebenso sollte der Einfluss von Strukturelementen, die in der genomischen RNA von Viren auftreten, auf die MDA-5 abhängige Interferonantwort untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Herstellen der Stimuli**

#### **2.1.1 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren am Photometer**

Für die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der gewonnenen RNA wurde das Spektralphotometer Nanodrop genutzt. Hierbei wurde 1 µl der RNA-Lösung laut Herstellerangaben auf den Lichtwellenleiter pipettiert und ein zweiter Lichtwellenleiter von oben mit dem Tropfen in Kontakt gebracht. Danach erfolgte die Messung der photometrischen Absorption bei 260 nm und bei 280 nm. Als Referenz diente 1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Da Nukleinsäuren Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren, konnte so auf ihre Konzentration geschlossen werden.

Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 280 nm. Um eine Verunreinigung der Nukleinsäuren durch Proteine auszuschließen wurde der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt. Ein Wert von 1,8 bis 2,0 sprach für eine hohe Reinheit.

#### **2.1.2 Produktion langer Einzelstrang-RNA mit der PNPase**

Mit Hilfe des Enzyms Polyribonukleotidphosphorylase (PNPase) kann lange Einzelstrang-RNA aus Ribonukleotid-Diphosphaten hergestellt werden. Dafür wurden zu Beginn „Stock Reaktion Cocktails“ der einzelnen Nukleotide vorbereitet. Diese bestanden aus 187,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 312,5 µl Tris-HCL, 312,5 µl 62,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 312,5 µl EDTA-Lösung und 500 µl 125 mM der gewünschten Ribonukleotid-Diphosphaten. Das Verhältnis der einzelnen Ribonukleotid-Diphosphate (GDP, IDP, CDP, UDP, ADP) konnte verändert werden, um die Sequenz der entstehenden RNA zu variieren. So entstand eine Zufallssequenz entsprechend des in dem „Stock-Reaction-Cocktail“ enthaltendem Nukleotid-Verhältnis. 250 µl dieses Agens wurde mit 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 50 µl 0,2 % BSA-Lösung zusammengegeben. Für die Reaktion wurden 80 µl der verdünnten Stock-Lösung mit 20 µl Enzym-Lösung gemischt und bei 37° C über Nacht inkubiert.

Die Aufreinigung erfolgte über Mini Quick Spin Columns der Firma Roche.

Um dsRNA zu erhalten wurde die lange ssRNA im Verhältnis 1:1 mit dem komplementären Strang zusammengegeben und durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Hierbei lagerten sich die komplementären Stränge aneinander. Diese konnten nun zur Stimulation verwendet, oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### **2.1.3 Aufreinigung der RNA mit Phenol-Chloroform-Extraktion**

Um überschüssige Salze und Proteinverunreinigung aus der RNA-Lösung zu entfernen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Bei dieser Form der Extraktion kann die RNA von den Proteinen auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit getrennt werden. Hierbei wurden zu der in Puffer gelösten RNA Phenol und Chloroform im Verhältnis 1:1 dazugegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und 12000 g. Danach wurde die obere wässrige Phase der in der Zentrifuge entstandenen Phasen vorsichtig entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese enthielt nun die RNA, wohingegen sich die Proteine an der Grenze zur unteren organischen Phase befanden. Hierbei war besonders darauf zu achten, die in der Interphase angereicherten Proteine nicht mit in das neue Reaktionsgefäß zu überführen. Als nächster Schritt wurde das gleiche Volumen wie das der RNA-Lösung an Chloroform dazugegeben. Nach erneutem Schwenken, Inkubation (2 min, Raumtemperatur) und Zentrifugation (5 min, Raumtemperatur, 12000 g) wurde wiederum die obere entstandene wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun erfolgte das Ausfällen der Nukleinsäuren mit Ethanol. Hierfür gab man zu der RNA-Lösung das Doppelte an Volumen an 98 % Ethanol, inkubierte die Mischung mindestens 30 min auf Eis und zentrifugierte sie für 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000 g. Die RNA sammelte sich dabei als schwach sichtbares Pellet auf dem Boden des Reaktionsgefäßes. Das Ethanol wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet, bis alle Ethanol-Reste vollständig verdunstet waren. Hiernach wurde das RNA-Pellet in 25  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und die Konzentration und Reinheit am Photometer bestimmt.

#### **2.1.4 Aufreinigung der RNA mit mini Quick Spin Columns**

Zur Vorbereitung der Säulen werden diese 2 min bei 1000 g und 4° C ohne Bremse zentrifugiert um die überschüssige Flüssigkeit aus der Säule zu entfernen. Nachdem die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß platziert wurde, wurde sie mit 50 µl RNA-Lösung beladen. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4 min 1000 g, 4° C). Hierbei konnte die reine RNA im Reaktionsgefäß gewonnen werden. Salze und Proteine blieben in der Säule zurück. Die Reinheit konnte durch Photometrie bestimmt werden.

#### **2.1.5 Sonifizieren von RNA**

Lange dsRNA wurde mit einem Ultraschallgerät (Bioruptor®) mechanisch in kürzere Fragmente zerteilt. Dafür legte man RNA-Lösung mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml in einem Endvolumen von 100 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße vor. Anschließend wurde die dsRNA unterschiedlich lange (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 40 min, 60 min) bei 200 w und einem Intervall von 30 sec sonifiziert. Dabei erfolgte die ständige Kühlung im Eiswasser um Denaturierung der RNA durch zu große Hitzeentwicklung zu verhindern. Zur Analyse der Länge wurde die RNA anschließend auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

#### **2.1.6 Isolierung von EMCV-RNA**

Das EMCV-Virus (Encephalomyocarditis-Virus) gehört zu der Familie der Picornaviren. Für einige Experimente wurde EMCV-RNA isoliert. Die Gewinnung von EMCV-RNA gliederte sich in drei Schritte:

1. Heranzüchten von EMCV-Viren in A549 Zellen
2. Isolieren von Viren
3. Isolieren der RNA aus den Viren

Für die Anzüchtung der Viren wurden A549-Zellen in T-125-Flaschen ausgesät und kultiviert, bis sie zu ca. 80 % konfluent waren. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Vollmedium (RPMI mit 10 % FCS, Glutamin, Pennicillin/Streptomycin) durch 20 ml

RPMI-Medium mit 2 % FCS ersetzt. Danach wurden die Viren in etwas RPMI-Medium gelöst und die Zellen mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,01 infiziert. Die Flaschen wurden bei 37° C so lange inkubiert, bis sich der Großteil der Zellen gelöst hatten (ca. 48 h).

Um die Viren zu isolieren wurde der Überstand der T-125-Flaschen mit einer 25 ml Pipette entnommen und in 25 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 7 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Viren befanden sich nun im Überstand und konnten ausgefällt werden. Dazu wurde 0,04 %  $\text{CaCl}_2$  und 33 % Methanol zu 20 ml Virusüberstand gegeben und 10 min bei 4° C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (3000 rpm, 4° C, 10 min) befanden sich die Viren als Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens. Dieses wurde in 1 ml Trizol-Reagenz aufgenommen und bei -80° C eingefroren.

Um die RNA zu isolieren wurde das Gemisch wieder aufgetaut und 200  $\mu\text{l}$  Chlorophorm dazu gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mindestens 15 sec geschwenkt und anschließend 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde das Reagenz für 15 min bei 4° C und 12000 g zentrifugiert, so dass sich zwei Phasen bildeten. Während des Zentrifugationsschrittes wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol vorgelegt, zu der die wässrige, obere Phase überführt wurde. Bei 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die EMCV-RNA ausgefällt und durch erneutes Zentrifugieren (12000 g, 4° C, 10 min) als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1,4 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7500 g, 4° C, 5 min). Hiernach konnte der Überstand verworfen werden und das Pellet in 20  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst werden. Die Reinheit und Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

### **2.1.7 Virale Replikons: Transformation von Plasmiden in Bakterien**

Zur Herstellung der viralen Replikons war es nötig, die auf Plasmid-DNA gespeicherte Information in RNA zu transkribieren. Dafür wurden die Plasmide in Bakterien transformiert und von diesen eine Kultur angelegt um größere Mengen Plasmide zu gewinnen. Nach Isolierung der Plasmide konnte man die DNA linearisieren und in RNA transkribieren. Das so gewonnene Replikon konnte als Stimuli verwendet werden.

Die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien (*E.coli*) erfolgte mit der Hitzeschock-Methode. Die Bakterien werden mit Hilfe von Calciumchlorid vorbereitet. Hiernach spricht man von kompetenten Zellen. Anschließend wird die Zellmembran durch kurzes Erhitzen permeabel gemacht, so dass die DNA ins Zytoplasma gelangen kann.

Für die Transformation wurden 50 µl Bakterien-Suspension mit 450 µl kalter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt. Je 100 µl des Gemisches wurden mit 0,3-0,5 µl Plasmid-DNA zusammengegeben und weitere 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß im Wasserbad 45 sec auf 43,5° C erhitzt und 200 µl LB-Medium ohne Ampicillin zugefügt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37° C wurden ca. 100 µl pro Transformation auf einer Ampicillin-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37° C kultiviert.

### **2.1.8 Maxipräp**

Bei der Maxipräp werden aus einer großen Menge an Bakterien-Kultur Plasmid-DNA gewonnen. Hierfür wurde von einer zuvor erstellten Vorkultur (siehe Transformation von Plasmiden) eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in 500 ml LB-Medium und Antibiotikazusatz (1:1000 Ampicilin) über Nacht bei 37° C unter ständigem Schütteln kultiviert. Die gewachsenen Bakterien wurden bei 4000 g und Raumtemperatur für 15 min abzentrifugiert, so dass sie ein Pellet bildeten. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM BDMA) vorsichtig resuspendiert. Zu dem Gemisch wurden 10 ml Lyse-Puffer P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) gegeben, vorsichtig geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei war zu beachten, dass die Inkubationszeit 5 min nicht überstieg, da ansonsten die DNA degradiert werden könnte.

Zur Neutralisation und Ausfällen der DNA wurde anschließend 10 ml Puffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) dazugegeben und wiederum vorsichtig 4-6mal invertiert, bis ein homogenes Gemisch entstand. Nach 15 minütiger Inkubation bei 4° C wurden die Zellreste bei 4° C und 8000 g für 30 min abzentrifugiert. Hierbei blieb die DNA im Überstand. Dieser wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 20 ml Isopropanol die DNA ausgefällt. Hiernach wurde erneut für 30 min bei 8000 g und 4° C zentrifugiert. In dem entstandenem Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens befand

sich nun die DNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ca. 10 min getrocknet. Nachdem kein Isopropanol mehr vorhanden war wurde das Pellet in P1 aufgenommen und 4,5 ml 7,5 M KOAc zugefügt. Das Gemisch wurde bei  $-80^{\circ}$  für mindestens 20 min eingefroren. Dies erhöhte die Ausbeute der DNA. Das Zentrifugenröhrchen samt Inhalt wurde im Wasserbad bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und 30 min bei 6000 g und  $4^{\circ}$  C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, die DNA mit 30 ml 98 % Ethanol gefällt und die DNA abzentrifugiert ( $4^{\circ}$  C, 8000 g, 40 min). Das hierbei entstandene Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes ca. 15 min getrocknet, in 700  $\mu$ l P1 aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt. Hierzu wurde 1  $\mu$ l RNase A (100mg/ml) zugefügt und 1 h bei  $37^{\circ}$  C inkubiert, um eventuelle RNA-Reste zu entfernen. Die DNA wurde nun durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen (siehe oben) und zum Schluss in 100-500  $\mu$ l  $H_2O$  aufgenommen.

### **2.1.9 Minipräp**

Bei der Minipräp wird aus einer geringeren Menge an Bakterienkultur Plasmide isoliert. Hierfür wurde aus einer einzelnen Kolonie einer Vorkultur eine 4 ml LB-Medium Kultur mit Ampicilin-Zusatz (1:1000) angesetzt und über Nacht bei  $37^{\circ}$  C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 1 min bei 11000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 300  $\mu$ l kaltem Puffer P1 aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die darauffolgende alkalische Lyse erfolgte mit 300  $\mu$ l Lyse-Puffer P2 und 5-6maligem invertieren. Zur Neutralisation und Ausfällung der DNA wurde 300  $\mu$ l Puffer P3 dazugegeben und wiederum vorsichtig gemischt. Bei 12000 g und  $4^{\circ}$  C wurde für 10 min die Zellreste als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Der Überstand, der die DNA enthielt wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 600  $\mu$ l Isopropanol hinzugefügt. Bei 15 minütiger Zentrifugation (12000 g,  $4^{\circ}$  C) fiel die DNA aus und sammelte sich als Pellet. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 500  $\mu$ l 70 %igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 5 min,  $4^{\circ}$  C, 12000 g). Anschließend wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet Luftgetrocknet und in 30-50  $\mu$ l  $H_2O$  gelöst.

### 2.1.10 Linearisierung von DNA

Die Linearisierung von zirkulärer Plasmid-DNA erfolgt mit sogenannten Restriktionsenzymen. Diese „schneiden“ die DNA an einer für jedes Enzym spezifischen palindromischen Sequenz. So kann jeweils das passende Enzym für ein bestimmtes Plasmid gewählt werden. Für die beiden Yellow Fever-Replikons und Sindbis-Replikon wurde das Enzym XhoI und für das Poliovirus-Replikon das Enzym NotI gewählt.

Der Verdau der Enzyme fand in einem Gesamtvolumen von 50µl statt. Davon waren 25 µl DNA-Sample (5 µg/µl), 18,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 5 µl NEB-Puffer, 4,1 µl entsprechendes Enzym, 0,5 µl BSA und 5 µl des vom Hersteller empfohlenen Puffers. Nach 3 Stunden bei 37°C bzw. 55°C wurde die Reaktion abgestoppt, indem das Gemisch für 20 min auf 65°C erhitzt wurde. Die Konzentration der linearisierten DNA konnte am Nanodrop bestimmt werden.

### 2.1.11 *In vitro*-Transkription

Bei der *In vitro*-Transkription wird von einer DNA-Matrize ein komplementärer RNA-Strang angefertigt. Das Enzym „SP6-RNA-Polymerase“ baut hierbei aus Nukleosidtriphosphaten einen RNA-Einzelstrang, bei dem der DNA-Strang als Vorlage dient. Die Transkription findet vom 5'- zum 3'-Ende statt, ausgehend von einem doppelsträngigem SP6-Promotor. Dieser Promotor, der in der DNA-Sequenz enthalten ist, dient als Startsignal für die SP6-Polymerase.

Für die Reaktion wurde das mMESSAGING mMACHINE<sup>®</sup> SP6 Kit von Ambion genutzt. Entsprechend den Herstellerangaben wurde linearisiertes DNA-Template, DEPC-H<sub>2</sub>O, Nukleotide (teilweise gecapped), Puffer und SP6-Polymerase zusammengegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die gecappten GTP minimierten eine Erkennung des 3'Triphosphatendes bei der Stimulation.

Nachdem ein RNA-Strang synthetisiert wurde, musste die DNA aus dem Reagenz entfernt werden. Hierfür wurde zu der Lösung 1 µl RNase-freie DNase hinzugegeben und wiederum 15 min bei 37°C inkubiert. Um überschüssige Salze und Proteine aus der Lösung zu entfernen erfolgte als abschließender Schritt die Aufreinigung der RNA über

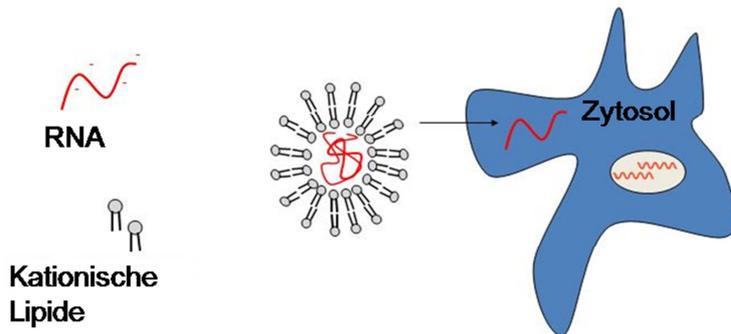
die mini Quick Spin Columns oder Phenol-Chloroform-Extraktion. Hiernach konnte die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt werden.

## **2.2 Stimulation von murinen mDC und humanen Monozyten**

Bei der Stimulation von murinen oder humanen Zellen wird durch Transfektion RNA in die Zelle eingebracht. Das Transfektionsreagenz LT1 enthält kationische Lipide, die sich um die RNA lagern und es ihr so erlauben durch die lipophile Membran zu dringen.

Für die Stimulation wurden die Zellen in einer 96-Loch-Platte mit  $4 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l RPMI-Medium je Vertiefung ausplattiert und vorübergehend in den Brutschrank gestellt. Die Transfektion wurde für acht Stimuli (Dreifachbestimmung) gleichzeitig vorbereitet. In einer weiteren 96-Loch-Platte wurden je Vertiefung 34  $\mu$ l serumfreies Medium vorgelegt und pro Stimulation 400 ng RNA hinzugefügt. Ebenfalls pro Stimulation wurden 1,33  $\mu$ l Transfektionsreagenz mit 66  $\mu$ l serumfreien Medium in einem Reaktionsröhrchen als Masteransatz gemischt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde auf die bereits in der 96-Loch-Platte vorgelegte RNA je 66  $\mu$ l LT1-Ansatz hinzugefügt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die Komplexe aus RNA und kationischen Lipiden bilden. Nach 20 min wurde das Gemisch auf die zu stimulierenden Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 18-24 h in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und sofort für die Zytokinmessung verwendet, oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.



### Abb. 5: Funktion des Transfektionsreagens LT1

Die in dem Transfektionsreagenz enthaltenen kationischen Lipide bilden eine Hülle um die negativ geladene RNA. Dadurch kann die Nukleinsäure durch die lipophile Membran ins Zytosol dringen

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Arbeit mit sämtlichen Zellen erfolgte unter Zellkultursterilbänken, um eine Kontamination zu vermeiden. Dabei wurden Einmalhandschuhe und sterile Endotoxin-freie Materialien benutzt.

Primäre Zellen und Zellkulturlinien wurden bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert

### 2.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Vitalitätsbestimmung wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Da die Färbung durch die Zellwand von toten Zellen dringen kann, kann man so zwischen lebenden und leblosen Zellen unterscheiden. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden 50 µl Zellsuspension zusammen mit 50 µl 0,04 %iger Trypanblaulösung gemischt und einige µl davon in die Zählkammer gegeben. Bei zu hoher Zelldichte wurde die Zellsuspension-Trypanblau-Lösung weiter verdünnt.

In der Zählkammer wurden zwei Großquadrate bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt und die Zellzahl aus dem Mittelwert berechnet.

Hierfür diene folgende Formel:

$$Z = N \times f \times 10^4 \text{ (Zellen/ml)}$$

Z=Zellzahl

N=Mittelwert Anzahl lebender Zellen im Großquadrat

f=Verdünnungsfaktor

## 2.4 Isolierung von humanen Monozyten

Zur Isolierung von Humanen Monozyten wurden Buffy Coats aus dem Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn verwendet. Der Buffy Coat ist ein Nebenprodukt, das bei der Weiterverarbeitung einer Vollblutspende zu Erythrozytenkonzentraten und FFP (fresh frozen plasma) entsteht. Er enthält hauptsächlich Thrombozyten und Leukozyten.

Um Monozyten aus den Buffy Coats zu gewinnen wurden erst PBMC (peripheral blood mononuclear cells) mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Anschließend wurden aus dieser inhomogenen Zellgruppe die Monozyten mittels magnetischer Zellseparation (MACS=magnetic cell sorting) isoliert.

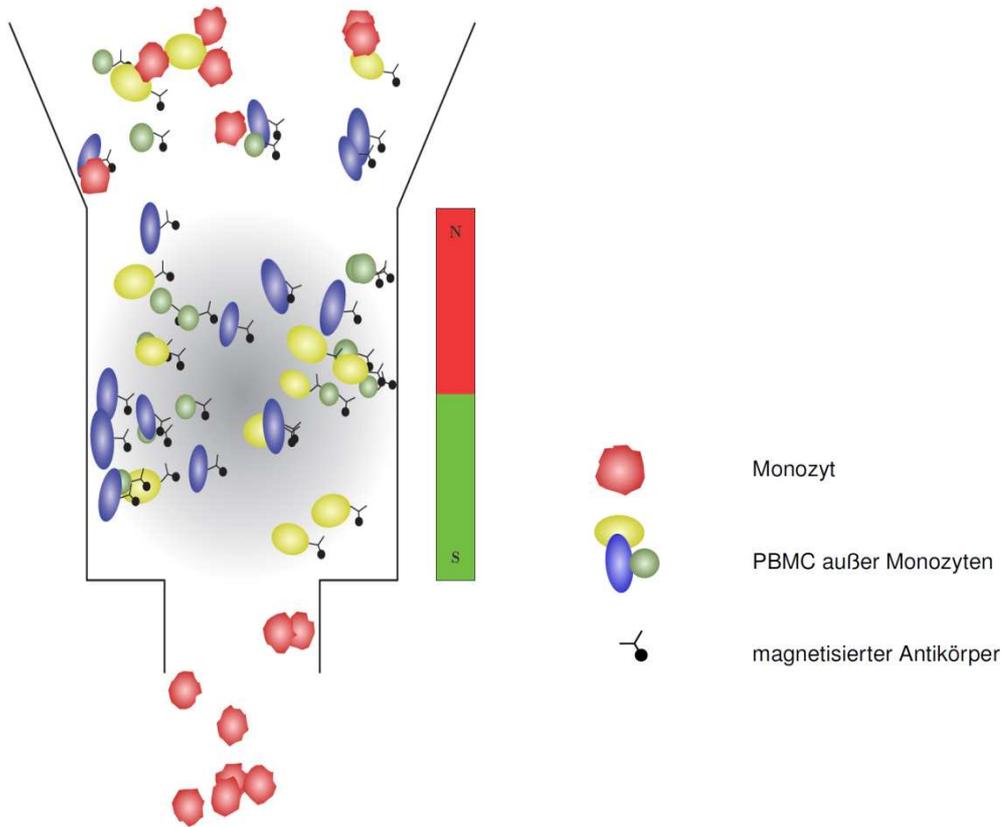
Zur Gewinnung der PBMC wurden die Buffy Coats im Verhältnis 1:3 mit NaCl verdünnt. In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 12 ml Lymphozytenseparationsmedium (Biocoll) vorgelegt und vorsichtig 25 ml des verdünnten Blutes aufgeschichtet. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 2500 rpm und Raumtemperatur für 18 min ohne Bremse, um ein Vermischen der Gradienten zu vermeiden. Es entstanden unterschiedliche Gradienten: Die obere Plasmaphase mit Thrombozyten, die Interphase mit den PBMCs, die untere Schicht mit den Granulozyten und ein Pellet mit Erythrozyten und toten Zellen.

Nun wurde die Interphase mit einer 10 ml Pipette gesammelt und in einem Zentrifugenröhrchen überführt. Dies wurde mit NaCl wieder auf 50 ml aufgefüllt und bei 4° C und 1500 rpm 10 min zentrifugiert. Die PBMC befanden sich nun in einem Pellet am Röhrchenboden. Um weitere Reste des zelltoxischen Biocolls zu entfernen, wurde das Pellet ein weiteres Mal mit 50 ml 0,9 % NaCl gewaschen und erneut bei 4° C und 1500 rpm 10 min zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 5 ml Erylyse-Lösung gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Reste von Erythrozyten zu entfernen. Die Erylyse sorgt dafür, dass die Zellmembran der Erythrozyten zerstört wird. Nach Verdünnen mit 30 ml NaCl und erneuter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen wurde das PBMC-Pellet in 50 ml 0,9 % NaCl Lösung aufgenommen und in einer Zählkammer die Zellzahl bestimmt (siehe oben).

Aus den so isolierten PBMC konnte man nun die humanen Monozyten gewinnen. Dies geschah mit Hilfe eines indirekten magnetischen Markierungssystems, dem Monocyte Isolationskit II von Miltenyi. Alle folgenden Schritte erfolgen nach beiliegender Anleitung des Kits.

Bei der magnetischen Zellseparation von Monozyten markiert man sämtliche Zellen, außer den Monozyten mit magnetischen Antikörpern. Gibt man hiernach die gelösten Zellen auf eine Säule, die in einem Magneten eingespannt ist, verbleiben die markierten Zellen in der Säule und in der Zellsuspension, die die Säule verlässt, befinden sich ausschließlich Monozyten. Die in dem Isolationskit enthaltenen Biotin-konjugierten Antikörper richteten sich gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glykophorin A. Nach Herstellerangaben wurden die PBMC in 50 µl MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen aufgenommen und der Biotin-Antikörper-Cocktail dazugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 4° C wurden Anti-Biotin MicroBeads dazugegeben und erneut 15 min Inkubation bei 4° C abgewartet. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert. Zur Separation wurde eine spezielle Säule des Herstellers Miltenyi verwendet (LD-Säule), die einmalig mit 1 ml MACS-Puffer vorgespült wurde. Die markierten Zellen wurden über einen Nylonfilter mit 40 µm Porenweite auf die LD-Säule, die in einem Magneten eingespannt war, gegeben. Der Filter hielt dabei größere Partikel auf und verhinderte so, dass die Säule verstopfte. Dadurch, dass alle mit AK markierten Zellen in der Säule zurück blieben, konnten die Monozyten als einzige Zellart bis in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen passieren. Die Aufreinigung mit dem Monocyte Isolationskit II hatte den Vorteil, dass man Monozyten ohne Antikörper-Markierung erhielt. Somit wurde eine eventuelle Beeinflussung bei der Stimulation durch die MicroBeads vermieden. Nach Zentrifugation (4° C, 1300 rpm, 5 min) und dreimaligen Spülen der Säule mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wurde die isolierten Monozyten abzentrifugiert, in 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und gezählt.



### Abb. 6: Funktionsprinzip der magnetischen Monozyten-Separation

Alle PBMCs außer Monozyten wurden mit einem magnetisch markierten Antikörper gelabelt. Gab man anschließend alle Zellen auf eine magnetisierte Säule bleiben die markierten Zellen in dieser hängen und die Monozyten können heraus gespült werden.

## 2.5 Gewinnung von murinen Knochenmarkszellen und Differenzierung zu mDC

Zur Isolation von Knochenmarkszellen aus den Hinterläufen von Mäusen, wurden die Knochen der Hinterläufe frei präpariert und an den Gelenken abgetrennt. Nun wurden am oberen und am unteren Ende jeweils ein kleines Stück Knochen entfernt und der Knochenmarkskanal mit Medium ausgespült. Die Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen und bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert. Hiernach wurden die Zellen in 10 ml Erylyse-Lösung aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen mit 0,9 %igen NaCl gewaschen wurden, wurden sie in Medium aufgenommen und gezählt.

Für die Differenzierung zu myeloiden dendritischen Zellen (mDC) wurden  $2 \times 10^6$  Zellen

pro Vertiefung in 3 ml Vollmedium mit 2 % GM-CSF in eine Sechsllochplatte gegeben und sieben Tage kultiviert. Nach einer Woche wurde das Medium mit einer 10 ml Pipette gesammelt, die Vertiefungen mit PBS gespült und sie gesammelten Zellen abzentrifugiert. Nach dem Zählen wurden zur sofortigen Transfektion von RNA  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in einer 96-Loch-Platte ausplattiert, oder die Zellen mit  $1 \times 10^6$  mDC pro Cryotube in Stickstoff eingefroren.

## **2.6 Gelelektrophorese**

### **2.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden RNA aufgetrennt und auf ihre Länge hin untersucht. Die Gelelektrophorese fand unter denaturierenden Bedingungen statt.

Hierfür wurden 2,5 ml Rotiphorese mit 7,2 g Urea in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und mit 1,5 ml 10-fach TBE-Puffer auf 37° C erwärmt. Nachdem sich der Urea vollständig gelöst hatte, wurde das Gemisch mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 15 ml aufgefüllt. Zum Auspolymerisieren wurden 75 µl Amoniumpersulfat (APS) und 7,5 µl TEMED dazugegeben, gemischt und das Gel sofort in der Gelkammer gegossen. Bis zur vollständigen Polymerisation des Gels nach ca. 40 min wurde dies bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach musste das Gel bei 200 V 30 min in TBE-Puffer vorlaufen. Für jede Tasche wurde in der Regel 1 µg RNA-Probe mit 1,56-fachem Ladepuffer gemischt und das Gel beladen.

Das Gel lief sofern nicht anders angegeben 50 min bei einer Spannung von 200 V. Je nach erwarteter Länge der Proben konnte die Laufzeit verlängert werden. Nach diesem Vorgang wurde das Gel 30 min in einer Methylenblaufärbelösung inkubiert. Hierdurch wurden die RNA-Proben auf dem Gel sichtbar. Falls eine zu starke Färbung des Gels eingetreten war, wurde das Gel mehrfach vorsichtig mit Wasser gewaschen.

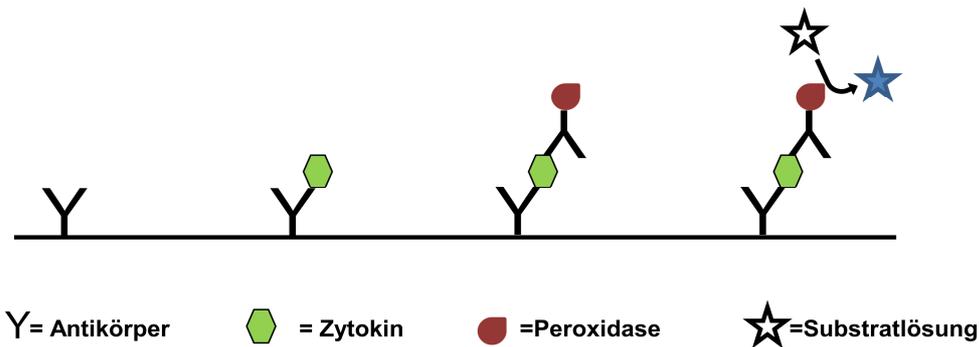
## 2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Hierbei wurden 1,5 %ige Agarosegele zusammen mit 0,5 µl Ethidiumbromid und TAE-Puffer gegossen. Das Ethidiumbromid diente zur Sichtbarmachung der DNA-Proben, die so unter UV-Licht abgebildet werden konnten. Das Gel wurde ca. 45 min bei einer Spannung von 100 V laufen gelassen.

## 2.7 Zytokinmessung

### 2.7.1 Allgemeines

Die Quantität der produzierten Zytokine auf Grund von Stimulation wurde durch die Methode des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Bei diesem Verfahren wurden Zytokine durch eine enzymgekoppelte Farbreaktion nachgewiesen. In einer 96-Loch-ELISA-Platte wurden die Vertiefungen mit einem Antikörper gegen das nachzuweisende Zytokin beschichtet. Enthielt nun eine Probe, die in die Vertiefungen gegeben wurde dieses Zytokin, band es mit einem bestimmten Antigen an die Antikörper und somit auch an die Platte. Nachdem die überschüssige Probe abgewaschen wurde wurde ein zweiter Antikörper in die Vertiefung gegeben, der ebenfalls an das zu untersuchende Zytokinband. Dies tat er allerdings an einem anderen Epitop des Zytokins, damit er nicht in Konkurrenz zu dem schon gebundenen Antikörper trat. An der F<sub>c</sub>-Region des zweiten Antikörpers war ein Enzym (Peroxidase) gebunden, das eine Farbreaktion umsetzte. Nach erneutem Auswaschen der überschüssigen Antikörper wurde eine Substratlösung in die Vertiefungen gegeben, die von zuvor farblos nach blau umgeschlagen war, falls Peroxidase-gebundene Antikörper vorhanden waren. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fand ein weiterer Farbumschlag nach gelb statt. Die Konzentration des Zytokins konnte nun durch photometrische Messung der Farbintensität und einem Vergleich mit einer Standardreihe bestimmt werden.



### Abb. 7: Funktion eines ELISAs

Der an die Platte gebundene Antikörper (AK) bindet spezifisch das jeweilige Zytokin. An einem anderen Epitop dieses Zytokins bindet ein weiterer mit Peroxidase gekoppelter AK. Somit wird, falls das Zytokin vorhanden ist, eine Farbreaktion der Substratlösung umgesetzt.

#### 2.7.2 Humanes Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ )

Für den humanen IFN- $\alpha$ -ELISA wurde eine 96-Loch-ELISA-Platte laut Herstellerangaben mit 50  $\mu$ l Antikörper-Lösung beschichtet und über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde aus der Platte geklopft und diese dann mit 150  $\mu$ l Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Jeder weitere Waschschrift erfolgte mit der gleichen Menge an Waschpuffer. Anschließend wurden 50  $\mu$ l Assay-Puffer pro Vertiefung in die Platte pipettiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proben in der gewünschten Verdünnung mit Assay-Puffer (überwiegend 1:5) in die Vertiefung gegeben. Zur quantitativen Bestimmung des Zytokins wurde ebenfalls eine Standardreihe mit bekannter, abnehmender Konzentration von IFN- $\alpha$  auf die Platte pipettiert. Unmittelbar nach den Proben und der Standardreihe wurde pro Vertiefung 25  $\mu$ l Substratlösung in die Platte pipettiert und der ELISA 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit kräftig aus der Platte geklopft und der ELISA fünfmal mit Waschpuffer gewaschen um zu vermeiden, dass nicht gebundene Antikörper zurückblieben. Zur Entwicklung des ELISAs wurde je 50  $\mu$ l Substratlösung in die Vertiefungen gegeben. Da die Farbreaktion lichtempfindlich war, fand die Inkubation von ca. 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Hierbei wurde das Substrat durch

das an den Zweitantikörper gebundene Enzym umgesetzt und sorgte für eine blaue Verfärbung der Lösung. Wenn die ersten fünf Verdünnungsschritte der Standardreihe zu sehen waren, wurde die Reaktion mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Neben dem Stopp der Reaktion erfolgte auch ein Farbumschlag von Blau zu Gelb. Der so entwickelte humane IFN- $\alpha$ -ELISA konnte nun photometrisch ausgemessen werden. Die Messung erfolgte bei 450 nm und 570 nm. Mit Hilfe der Standardreihe konnte die Konzentration des Zytokins nun berechnet werden.

### **2.7.3 Murines IFN- $\alpha$**

Für den murinen IFN- $\alpha$ -ELISA wurde ebenfalls eine 96-Loch-ELISA-Platte verwendet. Diese wurde mit 50  $\mu$ l Antikörperlösung (100  $\mu$ g/ml) je Vertiefung, die in Coating-Puffer 1:2000 verdünnt wurde, beschichtet. Der ELISA wurde über Nacht bei 4° C inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte mit 150  $\mu$ l Waschpuffer je Vertiefung dreimal gewaschen und anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 50  $\mu$ l Assay-Puffer pro Vertiefung geblockt und der ELISA drei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum ein dreifacher Waschschrift. Danach wurden die Proben unverdünnt und eine Standardreihe mit bekannter Konzentration an murinem IFN- $\alpha$  aufgetragen. Die Proben und der Standard blieben 48 h bei 4° C auf der mit Plastikfolie abgeklebten Platte. Nach zwei Tagen wurden die Proben aus der Platte geklopft und der ELISA zweimal gewaschen. Anschließend konnte 50  $\mu$ l des Zweitantikörpers in jede Vertiefung pipettiert werden und die Platte über Nacht bei 4° C inkubiert werden. Am nächsten Morgen wurde diese fünfzehnmal gewaschen und 50  $\mu$ l des HRP-Konjugats aufgetragen. Die Inkubation für drei Stunden bei Raumtemperatur erfolgte auf dem Schüttler. Anschließend wurde der ELISA zwölfmal gewaschen und entwickelt. Hierfür wurde in jede Vertiefung 50  $\mu$ l Substratlösung pipettiert und im Dunkeln für ca.10 min inkubiert, bis die fünf ersten Verdünnungsstufen zu sehen waren. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 50  $\mu$ l/Vertiefung 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Anschließend konnte die Konzentration des murinen IFN- $\alpha$  photometrisch bestimmt werden.

## 2.8 Statistisches Verfahren

Bei dem zusammenfassenden Vergleich der unterschiedlichen pl-G:C mit pl:C wurden die Daten formell folgendermaßen transformiert.:

$i$  = jeweiliger Versuch

$m_i$  = Mittelwert aus Dreifachbestimmung des jeweiligen Versuches.

$r_i$  = Referenzwert (pl:C) des jeweiligen Versuches

Normierung:  $n_i = \frac{m_i}{r_i}$

Logarithmieren:  $\log n_i = \log m_i - \log r_i$

Mittelwerte der logarithmierten Werte:  $\log m_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \log n_i$

Der Vergleich der jeweiligen Mittelwerte  $\log m_i$  erfolgt mit 0, da  $\log \frac{r_i}{r_i} = \log 1 = 0$

Als Signifikanzniveau wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % zu Grunde gelegt.

## 2.9 Material

### 2.9.1 Geräte und Laborausstattung

Analysewaagen U4100-OD2.2, MC BA 100	Sartorius, Göttingen (Deutschland)
Autoklav	Belimed, Köln (Deutschland)
Begasungsbrutschrank HeraCell 240	Heraeus Instruments, Hanau (Deutschland)
Bioruptor	Diagenode, Lüttich (Belgien)
Eismaschine Icematic	Scotsman, Pogliano (Italien)
ELISA-Reader Apollo LB912	Berthold, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Gefrierschrank (-80 °C)	Hettich, Tuttlingen (Deutschland)
Gefrierschrank (-20 °C)	AEG-Electrolux, Nürnberg (Deutschland)
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Kühlschrank	AEG-Electrolux, Nürnberg (Deutschland)
Mikroskop	Hund, Wetzlar (Deutschland)
Reagenzglas-Schüttler Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Reinstwasseranlage NANOpure Diamond	Barnstead, Leverkusen (Deutschland)
Schüttler KS 260 basic	IKA, Staufen (Deutschland)
Spektralphotometer Nanodrop	Peqlab, Nussbaum (Deutschland)
Sterilbank Clean Air Thermo	Fisher Scientific, Schwerte (Deutschland)
Stickstofftank	Taylor Wharton, Mildstedt (Deutschland)
Thermostatschrank	AQUALytic Liebherr, Biberach (Deutschland)
Wasserbad Isotemp	Fischer Scientific, Schwerte (Deutschland)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

### 2.9.2 Kleingeräte

Gewindeflaschen	Schott, Mainz (Deutschland)
Kolbenhubpipetten Research	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
MACS Multistand	Miltenyi, Bergisch Gladbach (Deutschland)

Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim (Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald (Deutschland)
Quadro MACS Zellseparator	Miltenyi, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Deckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen (Deutschland)
Objektgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen (Deutschland)
Neubauer-Kammer	Brand, Wertheim (Deutschland)

### 2.9.3 Chemikalien

Agarose	Applichem, Darmstadt (Deutschland)
Ammonium Persulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Aqua deltaSelect Spüllösung (H <sub>2</sub> O)	DeltaSelect, Pfullingen (Deutschland)
Benzyl dimethylamin (BDMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Biocoll	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
DEPC-H <sub>2</sub> O	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories, Pasching (Deutschland)
EDTA-Lösung 0,5 M	PAA Laboratories, Pasching (Deutschland)
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
TransIT LT-I	Mirus, Madison (USA)

Methylenblau	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
NaCl 10 %	Braun, Melsungen (Deutschland)
NaCl-Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen (Deutschland)
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumlaurylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Orange G	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Polyinosinic-polycytidylic acid (pI:C)	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Ribonukleotid-Diphosphate (GDP, UDP, IDP, ADP, CDP)	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
TAE (50x)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
TransIT LT-I	Mirus, Madison (USA)
Tris	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tris-HCl pH 7,5, 1 M	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tween	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Urea	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)

#### 2.9.4 Isolation von Monozyten

MicroBead Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach (Deutschland)
MACS-Separationssäule (MS, LS, LD)	Miltenyi, Bergisch Gladbach (Deutschland)
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi, Bergisch Gladbach (Deutschland)

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

### 2.9.5 ELISA

Donkey antibody against rabbit F(ab') <sub>2</sub> -Peroxidase	PBL Biomedical Laboratories, New Jersey (USA)
Rabbit polyclonal antibody against mouse interferon alpha	Acris Antibodies GmbH, Herford (Deutschland)
Rat monoclonal antibody against interferon alpha (RMMA-1)	Acris Antibodies GmbH, Herford (Deutschland)

ELISA-Waschpuffer: 1x PBS, 0,05 % Tween 20

Assay-Puffer IFN- $\alpha$  (human): 1x PBS, 0,5 % FCS, 0,05 % Tween

Assay-Puffer IFN- $\alpha$  (murin): 1x PBS, 10 % FCS

### 2.9.6 Gelelektrophorese

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

Methylenblau-Färbelösung: 0,02 % Methylen Blue, 0.1x TBE Puffer, H<sub>2</sub>O

TBE Puffer: 89mM Tris, 89mM Borsäure, 2 mM EDTA

### 2.9.7 Stimuli-Produktion

Polynukleotidphosphorylase	Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Puffer P1: 50 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM BDMA	
Lyse-Puffer P2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS	
Puffer P3: 3 M Kaliumacetat pH 5,5	
Restriktionsenzym XhoI	New England Biolabs, Ipswich (England)
Restriktionsenzym Neu I und Bakterienstamm E.cloni aus dem Institut für Virologie des Universitätsklinikums Bonn	

### 2.9.8 Zellen und Zellkultur

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

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

Humane Primärzellen aus Buffy Coats von gesunden Spendern, Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (Bonn)

Maus-Primärzellen isoliert aus dem Knochenmark von Wildtyp- oder MDA-5-defizienten Mäusen aus dem Haus für Experimentellen Therapie (HET) Uniklinik Bonn

Plastikwaren für die Zellkultur stammten von Nunc, Langenselbold, Greiner Bio-One, Solingen, Corning Costar, Bodenheim, Eppendorf, Hamburg oder Falcon, Heidelberg (alle Deutschland)

### 3. Ergebnisse

Von der zytosolischen Helikase MDA-5 ist bekannt, dass sie bei einer Infektion der Zelle durch Picornaviren für Initiierung der Immunantwort durch die Produktion von Interferonen und Zytokinen verantwortlich ist. Diese Viren besitzen ein (+) Strang ssRNA-Genom, welches nach der Infektion als virale mRNA fungiert. Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass das lange dsRNA-Analogon pl:C MDA-5 abhängig erkannt wird (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). Die genaue RNA-Struktur, die von MDA-5 erkannt wird und darüber die Zelle in einen antiviralen Zustand versetzt, ist allerdings noch nicht bekannt.

Um Gemeinsamkeiten der Picorna-RNA und von pl:C herauszufinden bzw. sich den Liganden von MDA-5 zu nähern, wurden jeweils unterschiedliche Strategien gewählt. Einerseits wurden enzymatische Modifikationen in die Sequenz der Grundstruktur pl:C eingeführt, um festzustellen, welche strukturellen Bedingungen für die Erkennung durch MDA-5 notwendig sind. Dabei wurden die modifizierten Stimuli auf ihre stimulatorische Fähigkeit hin genauer untersucht. Andererseits wurde virale Replikon-RNA mutiert und auf MDA-5 aktivierende Eigenschaften hin analysiert. So konnten RNA-Eigenschaften identifiziert werden, die für eine MDA-5 abhängige Interferonantwort notwendig sind.

#### 3.1 Modifikationen von pl:C

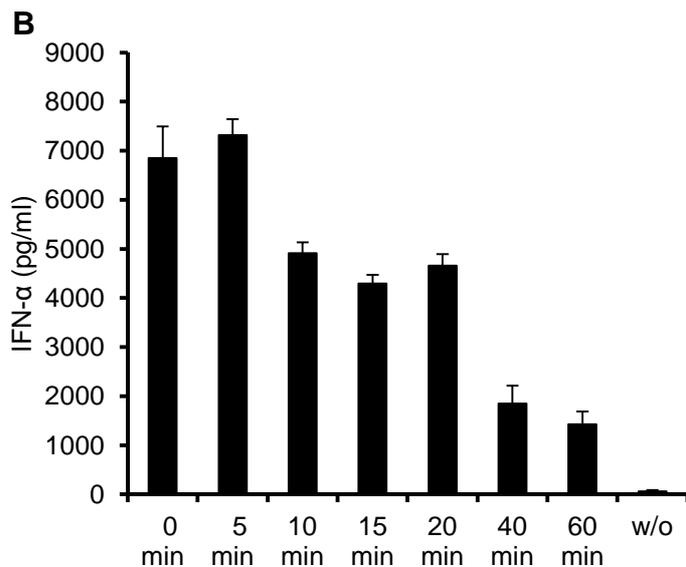
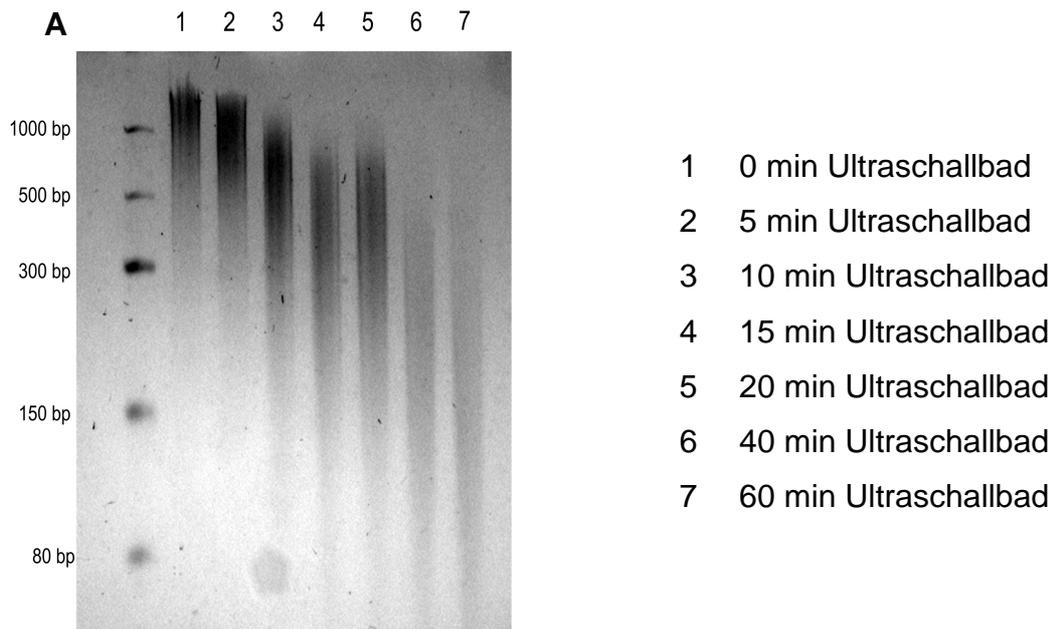
##### 3.1.1 Sonifizieren von pl:C

Von pl:C ist in der Literatur beschrieben, dass es nach enzymatischem Verdau und damit Verkürzung in Fragmente mit ca. 300bp zu einem RIG-I-Liganden wird und die Erkennung durch MDA-5 abnimmt (Kato et al., 2008). Dadurch stellt sich die Frage nach der Rolle, die die Länge der dsRNA bei Erkennung durch MDA-5 spielt. Um die Ergebnisse zu reproduzieren und um auszuschließen, dass die von Kato et al. verwendete enzymatische Verdauung einen Einfluss auf die Erkennung hat, wurde pl:C der Firma Sigma Aldrich mechanisch verkürzt. Hierzu wurde pl:C im Ultraschallbad für unterschiedlich lange Zeiten sonifiziert (5min, 10min, 15min, 20min, 40min, 60min). Die Länge des entstandenen Produkts konnte auf einem Polyacrylamid-Gel überprüft

werden. Es zeigte sich deutlich, dass die Länge des sonifizierten pl:Cs mit steigender Inkubationszeit im Ultraschallgerät stetig abnahm. Unbehandeltes pl:C ist über 1000bp lang, schon nach zwanzigminütiger Inkubation im Ultraschallbad liegt die Länge der dsRNA nur noch bei ungefähr 500bp. Bei längerer Sonifikation von pl:C, konnte die Bande auf dem Gel weniger deutlich dargestellt werden, die Streubreite der RNA-Länge nimmt also zu. So kann man nach 40 bzw. 60 min mechanischer Fragmentierung nur noch Bereiche von ca. 100-300 bp bzw. 80-200 bp als Länge angeben.

Um die Stimulationsfähigkeit von MDA-5 durch die unterschiedlichen pl:C-Fragmente zu untersuchen, wurden humane Monozyten mit den unterschiedlich langen Fragmenten stimuliert. Dabei diente *TransIT*<sup>®</sup>-LT1 von der Firma Mirus, Madison (USA) als Transfektionsreagenz. Nach 20 Stunden wurde IFN- $\alpha$  im Überstand der stimulierten Zellen bestimmt.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, zeigte sich eine positive Korrelation der RNA-Länge mit der im Überstand der Monozyten gemessenen IFN- $\alpha$ -Menge im Überstand der Monozyten.



### Abb. 8: Längenabhängige Erkennung von pl:C in humanen Monozyten

A: pl:C (Sigma) wurde in einem Ultraschallbad (Bioruptor®) unter ständiger Kühlung mit Eiswasser unterschiedlich lange inkubiert (5min, 10min, 15min, 20min, 40min, 60min). Die Probe 0min wurde zur Kontrolle in gleichen Mengen verdünnt, wie es für die anderen Proben zur Sonifikation nötig war. Auf dem Gel zeigt sich bei längerer Inkubation im Ultraschallgerät eine Längenabnahme und eine breitere Streuung der Fragmentlängen von pl:C.

B: Humane Monozyten wurden mit den unterschiedlich lang sonifizierten dsRNA-Strängen und unbehandeltem pl:C zur Kontrolle stimuliert. IFN- $\alpha$  wurde nach 20 Stunden im Überstand bestimmt.

### 3.1.2 Sequenzvariation von pl:C

Wie im vorherigen Experiment gezeigt spielt bei der Erkennung von pl:C durch MDA-5 die Länge der dsRNA eine entscheidende Rolle. Allerdings ist auch bekannt, dass nicht jede lange dsRNA über MDA-5 Interferon induzieren kann. Vorarbeiten der Gruppe hatten gezeigt, dass pl:C nicht als einfaches Doppelstrang-Analogon gilt und andere dsRNA mit ähnlicher Länge aber anderen Baseparungen wie pl:U, pl:G, pl:A, pG:C, pG:A, pA:C, pU:C und pG:U kein Interferon zu induzieren vermochten. Lediglich pA:U stimulierte auf einem wesentlich niedrigerem Niveau als pl:C humane Monozyten (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass pl:C eine spezielle Form von dsRNA ist, die auf Grund noch nicht bekannter Eigenschaften zu einer Erkennung über MDA-5 führt. Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung den Inosin-Cytidin-Basenpaarungen zukommt und in welchem Maße sie für eine Stimulation von MDA-5 in der Doppelstrang-RNA vorhanden sein müssen.

Um zu herauszufinden, welche Eigenschaften der Sequenz essentiell sind, wurden mit Hilfe des Enzyms Polynukleotidphosphorylase (PNPase) Einzelstrang-RNA hergestellt. Die PNPase kann aus Nukleotiddiphosphaten einen langen Nukleotid-Einzelstrang generieren. Dabei wird eine Phosphatgruppe der eingebauten Nukleotiddiphosphate abgespalten. Für die enzymatische Synthetisierung der RNA muss eine Reaktionslösung hergestellt werden. In dieser liegen die Nukleotiddiphosphate in dem Verhältnis vor, in dem sie in den Strang eingebaut werden sollen. Man muss allerdings beachten, dass zwar das Verhältnis, in welchem die unterschiedlichen Nukleotide vorliegen sollen, vorgegeben werden kann, jedoch nicht die genaue Sequenz. So werden diese in einer zufälligen Reihenfolge eingebaut.

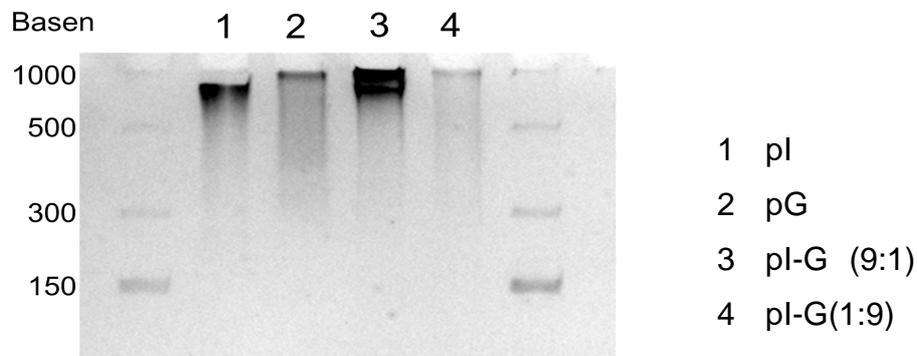
Mit der Polynukleotidphosphorylase konnte nun sowohl der Inosin-Strang als auch der Cytidin-Strang gezielt verändert werden. Bei der Generierung der neuen Stränge wurde darauf geachtet, dass die eingebauten Nukleotide ebenso wie Inosin bzw. Cytidin mit dem Gegenstrang komplementäre Bindungen eingehen konnten.

Deswegen wurde zur Modifikation des Inosin-Stranges Guanosin gewählt. Neben einem pl-Strang der nur aus Inosinen bestand wurden auch mehrere pl-Stränge, die zu einem unterschiedlichen Anteil Guanosine enthielten, hergestellt. Guanosin kann ebenfalls wie Inosin mit Cytidin sogenannte Watson-Crick-Bindungen eingehen. Diese selbst synthetisierten RNAs werden in dieser Arbeit je nach ihrem Verhältnis von Inosin zu

Guanosin als pl-G(19:1), pl-G(9:1), pl-G(1:1), pl-G(1:9), pl-G(1:19), pl-G(1:39), pl-G(1:79) und pl-G(1:99) bezeichnet. Die Konzentration der Einzelstrang-RNA konnte am Photospektrometer bestimmt werden. Zur Überprüfung der Länge der synthetisierten Nucleinsäuren wurden die Einzelstränge auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Wie in Abb. 9 ersichtlich, konnten sowohl lange pl- und pG-Stränge, als auch pl-G-Stränge dargestellt werden, die eine Länge von ca. 1000 Basenpaaren hatten.

Zur vollständigen Herstellung der Stimuli wurde nun noch der synthetisierte Einzelstrang jeweils mit dem komplementären polyC der Firma Sigma-Aldrich in gleicher Menge zusammengegeben und gemischt ( pl-G(19:1):C, pl-G(9:1):C, pl-G(1:1):C, pl-G(1:9):C, pl-G(1:19):C, pl-G(1:39):C, pl-G(1:79):C und pl-G(1:99):C).



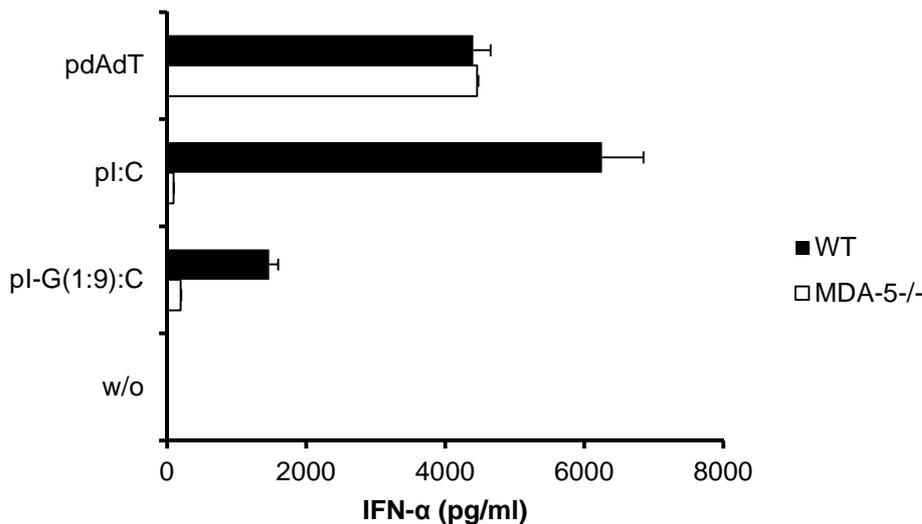
### Abb. 9: Polyacrylamid-Gel mit selbst synthetisiertem pl-G

Einzelstrang-RNA (pl, pG und pl-G im Verhältnis 9:1 und 1:9) wurde mit der Polyribonukleotidphosphorylase hergestellt. Nach Messen der Konzentration am Nanodrop wurde zur Überprüfung der Produktion und der Länge die Einzelstränge auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Es wurde für 70min eine Spannung von 120V angelegt. Links und rechts der RNA befinden sich Größenstandards, die zur Abschätzung der Länge der generierten Stränge dienen.

Auch wenn bekannt ist, dass pl:C selektiv über MDA-5 zu einer Interferonantwort führt, galt es zu überprüfen, inwiefern dies noch der Fall ist, wenn man in dem Inosin-Strang die Basen überwiegend durch Guanosin ersetzt hatte. Deswegen wurden myeloide Dendritische Zellen mit pl-G(1:9):C und pl:C stimuliert. Dabei erfolgte ein Vergleich von mDC die aus dem Knochenmark von Wildtyp (WT) Mäusen gewonnen wurden mit mDC von MDA-5-gendefizienten Mäusen (MDA-5<sup>-/-</sup>).

Wie in Abb. 10 ersichtlich, ist die Interferonantwort der murinen mDC bei der Stimulation

mit pl-G(1:9):C ebenso wie bei pl:C ausschließlich MDA-5 abhängig. Man erkennt ebenso, dass die Menge an induziertem IFN- $\alpha$  bei dem Stimuli mit eingebautem Guanosisin deutlich geringer ist als die bei pl:C. Diese Beobachtung wurde im Folgenden weiter untersucht.



#### Abb. 10: Die Erkennung von pl-G:C ist MDA-5 abhängig

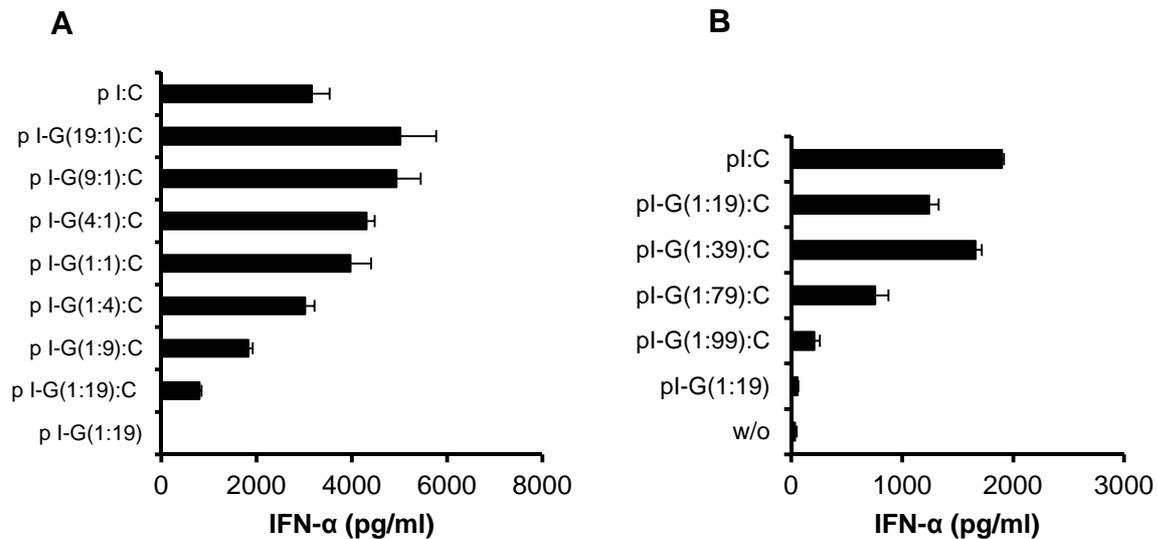
Sowohl aus Wildtyp (WT) als auch aus MDA-5-defizienten Mäusen (MDA-5<sup>-/-</sup>) wurden Knochenmarkszellen isoliert und zu myeloiden Dendritischen Zellen (mDC) differenziert. Diese wurden dann mit pl-G(1:9):C und pl:C stimuliert. Der pl-G-Strang wurde mit dem Enzym Polynukleotidphosphorylase generiert und mit dem komplementären Strang pC zusammengefügt. Als Positiv-Kontrolle der MDA-5<sup>-/-</sup>-Zellen diente das DNA-Polymer pdAdT, das unabhängig von MDA-5 eine Interferonantwort induzieren kann. Sowohl pl:C als auch pl-G(1:9):C werden MDA-5 abhängig erkannt. Dabei ist die Interferonantwort bei pl-G(1:9):C erkennbar schwächer als bei pl:C. Das Experiment in Abb. 10 ist repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Versuche.

Wie oben erwähnt konnten Vorarbeiten der Gruppe zeigen, dass reines pG:C kein Interferon in humanen Monozyten induziert, also auch kein Ligand für MDA-5 sein kann. Da pl-G:C aber offensichtlich MDA-5 aktivieren konnte, stellte sich die Frage, wie sich die Interferonproduktion von humanen Zellen mit abnehmender Zahl von Inosin:Cytidin-Bindungen bzw. zunehmender Zahl von Guanosisin:Cytidin-Bindungen entwickelt. Es sollte weiterhin eine Annäherung an die Antwort auf die Frage erreicht werden, wieviele I:C-Basenpaarungen in der synthetischen dsRNA vorhanden sein müssen, um noch IFN- $\alpha$  induzieren zu können.

Um dies festzustellen wurden weitere pl-G-Stränge synthetisiert, in denen der

Guanosin-Anteil im Inosin-Strang kontinuierlich erhöht wurde. Nach Komplementierung mit pC wurde die entstandene dsRNA in humane Monozyten transfiziert und nach 20 Stunden IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen.

Wie Abb. 11 zeigt, konnte überraschenderweise ein Großteil der Inosine durch Guanosin ersetzt werden und es fand trotzdem noch eine Erkennung des Stimulus über MDA-5 statt. Je mehr Guanosine in den Inosin Strängen vorhanden waren, desto geringer wurde die Stimulation. Aber auch bei einer Erhöhung des Guanosinanteils auf über 95 % fand noch eine deutliche Aktivierung statt. Erst bei dem pl-G:C bei dem die Inosin:Cytidin-Basenpaarungen im Verhältnis zu den Guanosin:Cytidin-Basenpaarungen 1 % ausmachten, war praktisch keine Interferonantwort mehr detektierbar. Dabei wurde diese kontinuierlich weniger und es war kein Schwellenwert erkennbar, an dem die Aktivität abbrach. Dieses Experiment zeigt, dass I:C-Basenpaarungen ein entscheidendes Kriterium bei der Erkennung von synthetischer dsRNA über MDA-5 ist. Jedoch ist schon ein geringer Anteil I:C-Basenpaarungen ausreichend um, wenn auch auf niedrigerem Niveau, MDA-5 abhängig Interferon zu induzieren.

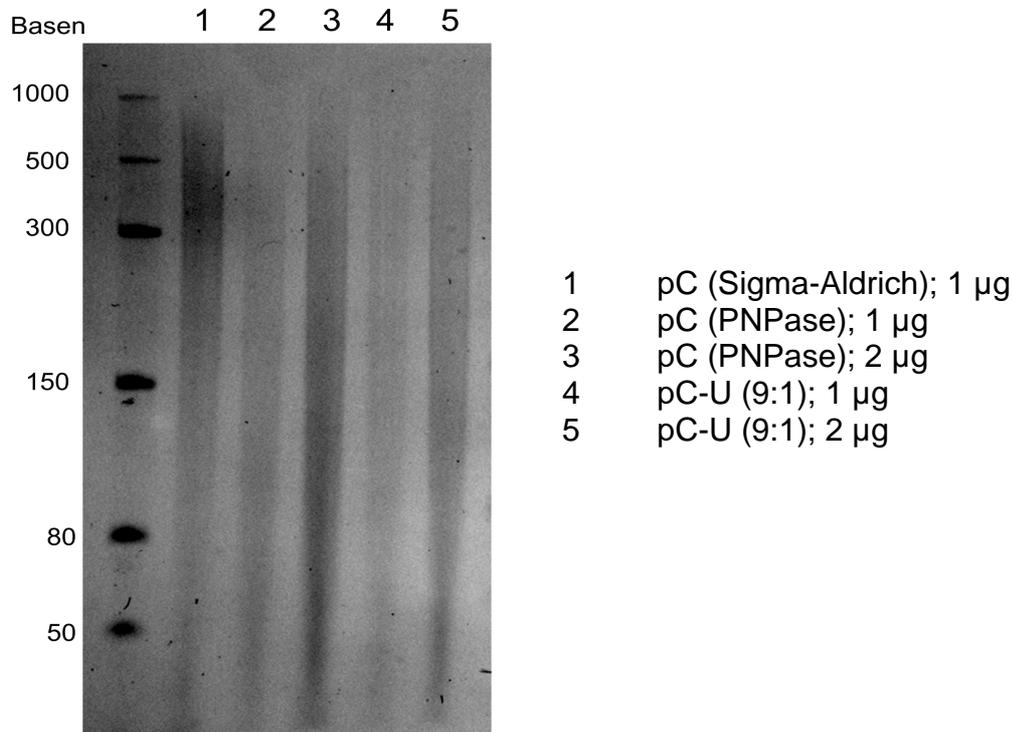


### Abb. 11: Einzelne I:C Basenpaarungen sind hinreichend um Interferon zu induzieren

Humane Monozyten wurden aus Buffy Coats von gesunden Spendern aufgereinigt und mit langer dsRNA stimuliert. Die unterschiedlichen pI-G-Stränge wurden mit dem Enzym Polynukleotidphosphorylase hergestellt. Dabei variierte der Guanosin- und der Inosin-Anteil. Anschließend wurden die langen Einzelstrang-RNA mit dem komplementären pC Strang zusammengegeben. Nach Stimulation wurde nach 20h IFN- $\alpha$  im Überstand gemessen. Als Negativkontrolle dienten die mit der PNPase hergestellten Einzelstränge (hier beispielhaft pI-G(1:19)) bzw. Medium (w/o). Die Abbildungen A und B zeigen, dass wenige Inosine in einem pI-G-Strang der mit pC hybridisiert wurde ausreichen, um in humanen Monozyten ein Interferonsignal auszulösen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der pI-Strang in der Sequenz verändert werden konnte und einzelne Inosin-Cytidin-Paare ausreichend sind, um als Ligand für MDA-5 zu dienen, war die Überlegung, ob auch eine Modifikation des poly Cytidin-Stranges vorgenommen werden kann. Da auch weiterhin die Bildung einer Doppelstrang-RNA gesichert werden sollte, wurde eine Base zur Modifikation des pC Stranges gewählt, die wiederum wie Cytidin Wasserstoffbrückenbindungen mit Inosin eingehen konnte. In der Literatur wird eine synthetische dsRNA beschrieben, die pI:C sehr ähnlich ist und als weniger toxisches Analogon beschrieben wird, das für den klinischen Einsatz geeignet sein könnte, da es trotz geringerer Toxizität noch zur Maturation von T-Zellen führen kann (Navabi et al., 2009). Bei dieser dsRNA ist ein zwölftel der Cytidine durch Uracil ersetzt und wird von den Autoren Ampligen<sup>®</sup> genannt. Analog zu diesem in der Literatur beschriebenen Molekül wurden nun wieder mit Hilfe der Polyribonukleotidphosphorylase

lange polyC-Stränge synthetisiert, in welche unterschiedliche Anteile von Uracil eingebaut wurde. Entsprechend zu dem Experiment, bei dem der Inosin-Strang modifiziert wurde erfolgte eine Überprüfung der Synthese auf einem Polyacrylamid Gel.



**Abb. 12: Polyacrylamidgel mit selbst synthetisiertem pC-U**

Die Nukleodiphosphate CDP und CDP mit UDP im Verhältnis 9:1 wurden mit der PNPase zu langen ssRNA-Strängen synthetisiert. Um die Synthese und die Länge zu überprüfen wurden sie jeweils in den Konzentrationen 1 µg und 2 µg aufgetragen. Als Vergleich wurde ebenso polyC von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim (Deutschland) aufgetragen. Links auf dem Gel befindet sich der Längenstandard zur Abschätzung der Größe.

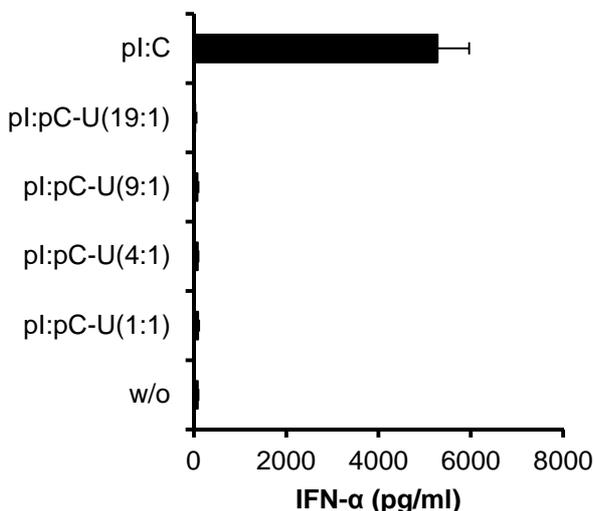
Um die Stimulationsfähigkeit von pl:C mit selbst hergestelltem pC Strang einerseits und pl:C-U andererseits zu überprüfen, wurden zunächst die selbst synthetisierten Stränge mit Polyinosin der Firma Sigma-Aldrich in gleicher Konzentration zusammen pipettiert und vorsichtig vermischt. Hierbei wird, zur Unterscheidung der Stimuli die RNA mit dem selbst hergestelltem pC-Strang pl+pC genannt, im Gegensatz zu pl:C, das von der Firma Sigma-Aldrich stammt.

Zunächst wurden humane Monozyten aufgereinigt und mit den langen dsRNA stimuliert.

Nach zwanzig Stunden wurde Interferon im Überstand gemessen. Dabei wurde die Induktion von IFN- $\alpha$  von pl:C, pl+pC und pl:C-U(9:1) verglichen.

Bei dem Experiment in Abb. 13 wurde der Uracil-Anteil im Cytidin-Strang weiterhin verändert. So wurde bei der PNPase-Reaktion ein Verhältnis von Cytidin zu Uracil von 1:1, 4:1, 9:1, und 19:1 gewählt und die Stränge mit pl hybridisiert. Allerdings zeigten sich bei keiner Stimulation mit einem pl:C-U eine Interferonproduktion in humanen Monozyten. Auch in dem pC-U Strang, der lediglich 5 % Uracil enthielt und mit dem Komplementärstrang Polyinosin zusammen gegeben worden war, wurde MDA-5 nicht aktiviert. In vorangegangenen Experimenten konnte mit einem selbst synthetisierten, reinen pC-Strang, der mit pl hybridisiert wurde ein deutliches Interferonsignal hervorgerufen werden (Daten nicht gezeigt). Hieraus lässt sich schließen, dass zwar der Inosin Strang in der Sequenz verändert werden kann, und die dsRNA trotzdem noch als Ligand für MDA-5 dient, aber in dem Cytidin-Strang kein Uracil vorhanden sein darf, ohne dass die Interferonantwort abbricht.

Die vorangegangenen Experimente wurden gemeinsam mit der naturwissenschaftlichen Doktorandin Vera Wimmenauer durchgeführt.



**Abb. 13: pl:C-U induziert keine Interferonantwort in humanen Monozyten**

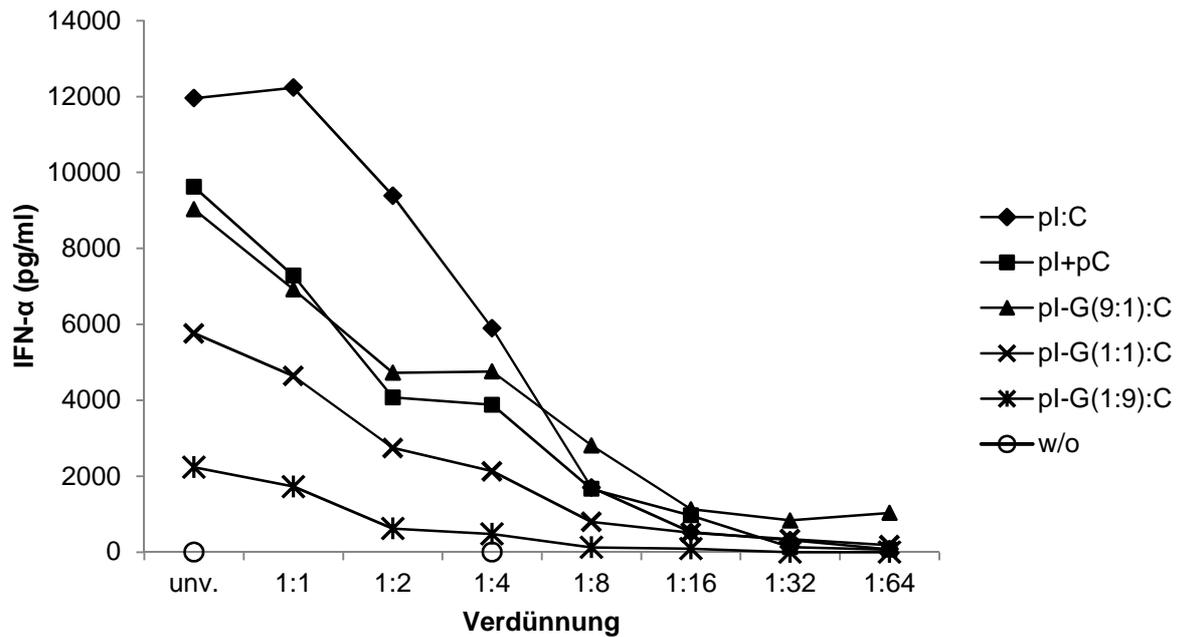
Mit der Polyribonukleotidphosphorylase wurde der Uracil-Anteil im Cytidin-Strang variiert (1:1, 4:1, 9:1, 19:1). Diese Stränge wurden mit komplementären pl hybridisiert und in humane Monozyten transfiziert. Nach 20 Stunden wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Hier zeigte sich im Gegensatz zu pl:C bei keinem der Synthetisierten pl:C-U-Stimuli eine Interferonproduktion.

### 3.1.3 Verdünnungsreihe

Da überraschenderweise festgestellt wurde, dass auch pl-G:C mit hohen Guanosin-Anteilen im Inosin-Strang über MDA-5 erkannt wurde, sollten nun die Eigenschaften von pl-G:C genauer untersucht werden. Insbesondere ging es um die Frage, ob bei der Menge von pl:C, das Guanosin enthält ein Schwellenwert besteht, ab dem überhaupt noch Interferon in Monozyten induziert wird.

Hierfür wurden unterschiedliche pl-G-Stränge (9:1, 1:1, 1:9) mit pl:C (Sigma) in einer Verdünnungsreihe verglichen. Es sollte festgestellt werden, ob die Stimulationseigenschaften der unterschiedlichen RNAs abhängig von der Verdünnung einen anderen Verlauf nehmen, im Vergleich zu der Reihe des pl:C. Mit der jeweiligen dsRNA und poly Adenosin (pA), einer RNA ohne stimulatorische Eigenschaft, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und ausgehend von unverdünntem pl:C bzw. pl-G:C jeweils mit der gleichen Menge pA vermischt (unverdünnt, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64). So befanden sich in den kationischen Komplexen gleich viel RNA, die in die Zellen transfiziert wurde, allerdings weniger RNA mit MDA-5-stimulatorischer Funktion.

Die Abb. 14 zeigt, dass wie in den vorangegangenen Versuchen die Stimulation der humanen Monozyten auch bei unverdünnten Proben mit zunehmenden Guanosin-Anteil in der dsRNA abnahm. Allerdings war auch hier im Verlauf der Verdünnung eine kontinuierliche Abnahme des IFN- $\alpha$ -Signal vorhanden. Bei keiner der unterschiedlichen dsRNA zeigte sich ein plötzlicher Abbruch der Stimulationsfähigkeit. Ab einer Verdünnung von 1:16 von pl:C bzw. pl-G:C mit pA und anschließender Transfektion in Monozyten war kaum noch ein Unterschied in der Menge des produzierten Interferons sichtbar. Je stärker die unverdünnte RNA Interferon induzierte, desto stärker wirkte sich die Verdünnung absolut gesehen auf die Stimulationsfähigkeit aus. Die Kurve fiel steiler ab, als bei den Stimuli, die von Beginn an ein geringeres Niveau an Interferon induziert hatten.



**Abb. 14: Kontinuierliche Abnahme der Interferonproduktion bei einer Verdünnung von pl:C und pl-G:C mit pA**

Humane Monozyten wurden mit langer dsRNA stimuliert. Die pl-G Stränge wurden mit der Polynukleotidphosphorylase hergestellt und mit komplementären pC hybridisiert. Zum Vergleich diente mit PNPase hergestelltes pl, das ebenfalls mit pC hybridisiert wurde (pl+pC) und pl:C. Die lange ds RNA wurde mit nicht stimulierender RNA (pA) verdünnt. Nach 20 Stunden wurde IFN- $\alpha$  im Überstand bestimmt. Wie ersichtlich war der Abfall der Interferonproduktion kontinuierlich. Je stärker der jeweilige Stimulus unverdünnt in der Lage war IFN- $\alpha$  zu induzieren, desto schneller nahm die absolut produzierte Interferonmenge ab.

### 3.2 Statistische Analyse

Auffallend bei den Versuchen mit pl-G:C war, dass die stimulatorische Fähigkeit der einzelnen Stränge über mehrere Ansätze deutlich unterschiedlich war. Unabhängig von den Erklärungsansätzen erschien es deswegen sinnvoll, eine übergreifende Analyse über mehrere Versuche zu machen. Ziel war es, eine Aussage über die stimulatorischen Eigenschaften der pl-G:Cs im Vergleich zu dem schon als Stimulus bekanntem pl:C zu machen. Dabei wurde untersucht, ob ein signifikanter Unterschied in der Menge der Interferonproduktion bei Transfektion der jeweiligen selbst synthetisierten Stimuli im Vergleich zu Transfektion von pl:C bestand.

Die folgenden Auswertungen zeigen eine Zusammenfassung aller durchgeführten Versuche, bei denen ein Vergleich von pl:C und pl-G:C erfolgte in einem Boxplotdiagramm.

In Boxplotdiagrammen wird im Allgemeinen der Median, gekennzeichnet durch einen Querstrich, als Lagemaß dargestellt. Der Median ist im Vergleich zum Mittelwert ein robustes Lagemaß, da er gegenüber Ausreißern unempfindlich ist.

Die Boxhöhe zeigt die Interquartilsbreite an und ist damit ein Maß für die Variabilität der Daten. 50 % der Werte liegen innerhalb des Bereichs, der durch die Box markiert wird.

Die Antennen, im Englischen auch als Whiskers bezeichnet, haben höchstens die 1,5-fache Länge der Boxhöhen. Liegen in dieser Entfernung keine weiteren Werte, dann werden die Längen der Antennen durch den kleinsten bzw. den größten Wert bestimmt.

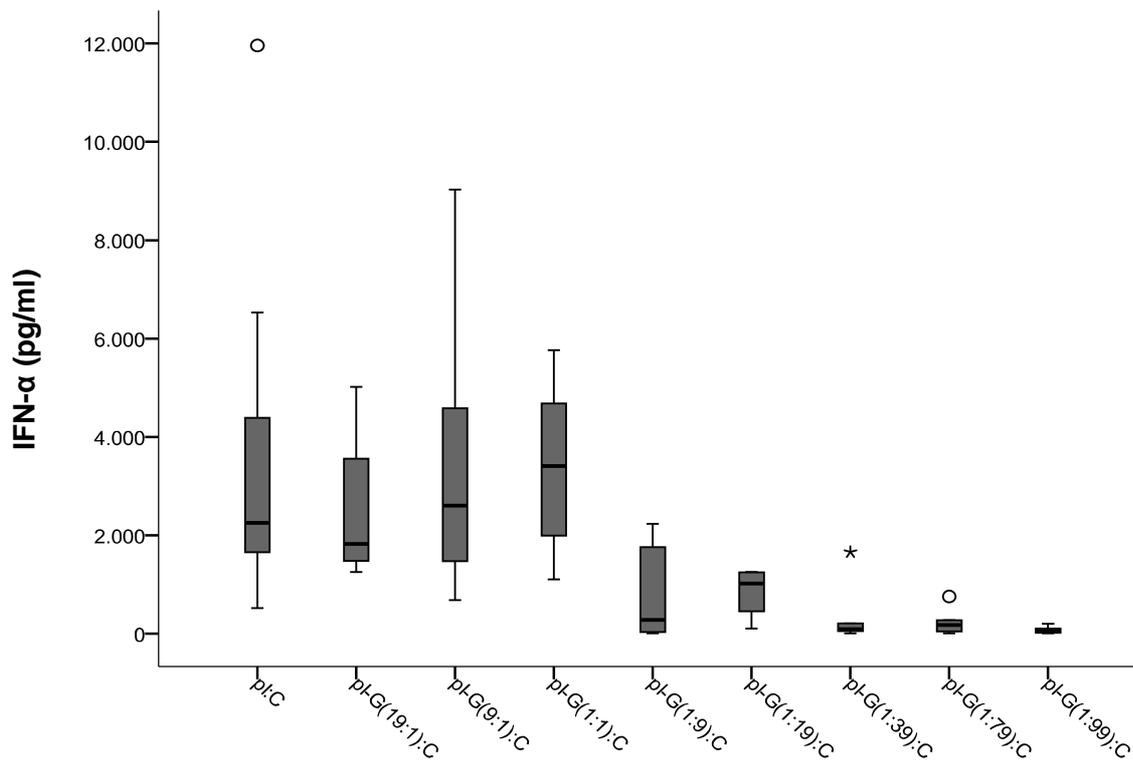
Während die Box also die mittleren 50 % der vorkommenden Werte umfasst, deckt das Intervall zwischen den Antennenenden bei 1,5-facher Boxlänge ungefähr den Bereich  $\mu \pm 2\sigma$  ab, was bei normalverteilten Daten gerade dem symmetrischen 95 %-Intervall entspricht. Einzelne Datenwerte, die mit einem Kreis gekennzeichnet sind, können als Ausreißer angesehen werden. Daten, die durch ein Sternchen dargestellt sind, gelten sogar als extreme Ausreißer, da sie außerhalb des  $\mu \pm 3\sigma$  Bereichs liegen, was bei normalverteilten Daten dem Bereich außerhalb des 99,74 %-Intervalls entspricht.

Der Vorteil des Boxplotsdiagramms liegt im Vergleich mehrerer Verteilungen und kann als Voruntersuchung zur statistischen Analyse Hinweise geben, ob Daten für einen statistischen Test transformiert werden sollten, bzw. ob ein parametrischer Test wie der T-Test geeignet ist, um Unterschiede aufzuzeigen.

Im vorliegenden Datenfall zeigte sich, dass die Variabilität der produzierten Interferonmenge innerhalb der pl-G:C sich von Stimulus zu Stimulus stark unterschied. Ein Problem hinsichtlich gängiger Testverfahren war die offensichtliche Abhängigkeit der Varianz von der Größe des Lagemaßes. Mit Ausnahme der Verteilung der Werte von pl-G(1:1):C waren die Daten nicht symmetrisch verteilt, die Annahme normalverteilter Werte, die dem T-Test zugrunde liegt, war sicherlich für einige Kategorien fraglich. Um auch bei geringen Fallzahlen Unterschiede der verschiedenen Kategorien gegenüber den Werten von pl:C statistisch abzusichern wurden die Daten wie unten beschrieben normiert und transformiert.

	Mittelwert IFN (pg/ml)	SEM	Mittelwert aus den normierten Daten	Anzahl der Versuche
pl:C	3221,0228	638,3170	-	18
pl-G(19:1):C	2629,7517	721,7190	0,8982	5
pl-G(9:1):C	3272,7807	540,2657	1,1884	17
pl-G(1:1):C	3396,0222	709,0381	0,7746	6
pl-G(1:9):C	848,0084	304,8504	0,1723	9
pl-G(1:19):C	852,2650	269,3385	0,3029	4
pl-G(1:39):C	405,7809	315,6061	0,2093	5
pl-G(1:79):C	253,5828	134,4044	0,1461	5
pl-G(1:99):C	81,5047	35,6642	0,0413	5

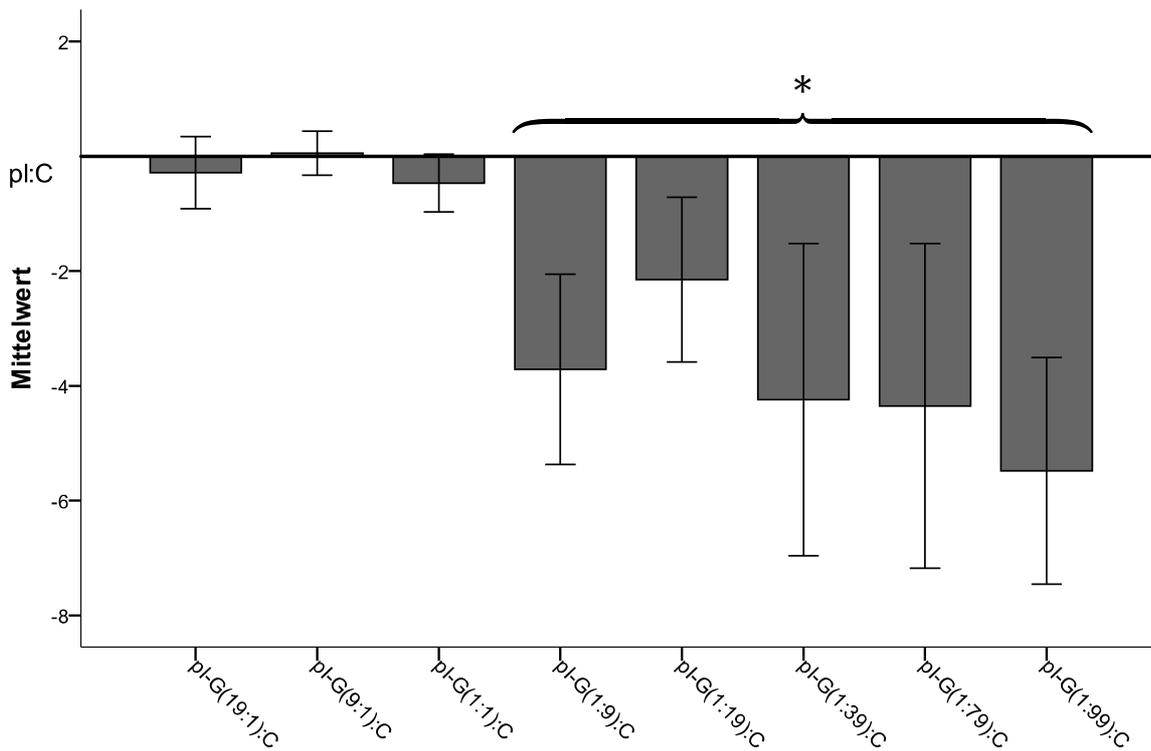
**Tabelle 1: Mittelwerte, SEM und Mittelwerte der normierten Daten und Anzahl der in die Statistik eingeflossenen Versuche der unterschiedlichen pl-G:C**



### Abb.15: Unterschiede bei der Stimulation der jeweiligen pl-G:C

Dargestellt ist die Verteilung der produzierten Interferonmenge für die verschiedenen pl-G:C. Hierfür wurden alle Versuche eines bestimmten Stimulus zusammengefasst und die wesentlichen statistischen Maßzahlen durch ein Boxplot dargestellt. Die statistischen Maßzahlen für die einzelnen Boxplots können Tabelle 1 entnommen werden.

Von den einzelnen Versuchen wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert mit dem dazugehörigen SEM (standard error of the mean) berechnet. In den einzelnen Versuchen diente pl:C als bekannter Stimulus als Referenzwert. Deswegen wurden die jeweiligen pl-G:C-Werte relativ zu pl:C betrachtet, das heißt durch Division durch den im gleichen Versuch gemessenen pl:C-Wert normiert. Da die normierten Werte als Anteilswerte keiner Normalverteilung unterliegen, sondern im Allgemeinen rechtsschief verteilt sind werden sie logarithmiert. Ein Vergleich zwischen den einzelnen Guanosin enthaltenden RNA-Strängen gegen den Referenzwert erfolgte dann durch Testen, ob der Nullwert im 95 %-Konfidenzintervall um den Mittelwert der logarithmierten Werte lag.



**Abb.16: Viele Guanosine inhibieren die Interferonantwort signifikant**

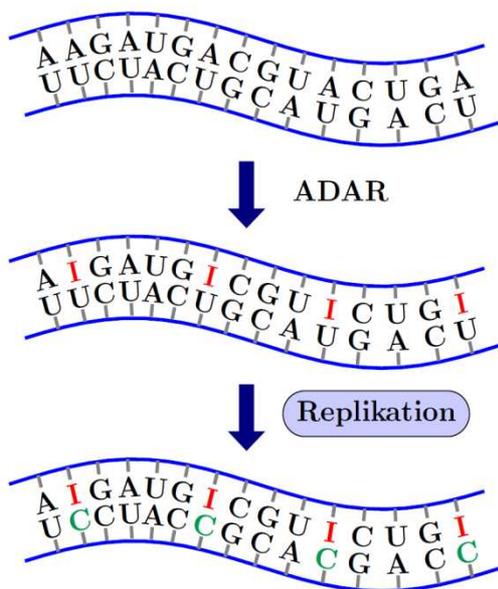
Die Graphik zeigt, dass die Interferonproduktion von humanen Monozyten bei Stimulation mit pl-G(1:99):C, pl-G(1:79):C, pl-G(1:39):C, pl-G(1:19):C und pl-G(1:9):C im Mittel signifikant niedriger als die entsprechenden pl:C-Werte ausfallen. Dagegen zeigt sich für pl-G(1:1):C, pl-G(9:1):C und pl-G(19:1):C kein signifikanter Unterschied zum Basiswert pl:C.

Als Ergebnis zeigte sich, dass über alle durchgeführten Versuche dsRNA-Stränge, die mehr als 50 % Guanosin enthielten, signifikant schlechter in humanen Monozyten stimulierten, als pl:C. Bei den selbst synthetisierten Strängen, die mindestens im Verhältnis 1:1 Inosine enthielten, konnte kein Unterschied zu der Stimulationsfähigkeit von dem bekannten Stimulus pl:C festgestellt werden. Weder stimulierte diese RNA besser noch schlechter.

### 3.3 Untersuchung des viralen Liganden

#### 3.3.1 EMCV-RNA Kinetiken

Da gezeigt werden konnte, dass für eine Erkennung von synthetischer Doppelstrang-RNA I:C Basenpaarungen eine notwendige Bedingung waren, stellte sich die Frage, ob das Vorhandensein von diesen Basenpaarungen auch die Voraussetzung für die Erkennung des natürlichen Liganden, virale RNA, ist. In der ursprünglichen RNA von Viren sind keine Inosine vorhanden. Allerdings besitzen humane Zellen ein zytosolisch vorliegendes Enzym die sogenannte Adenosindesaminase (adenosin deaminase acting on doublestradet RNA, ADAR). Sie ist durch Interferon induzierbar und kann Adenosin



**Abb. 17: Theorie zu Modifikation der RNA durch ADAR und Replikation**

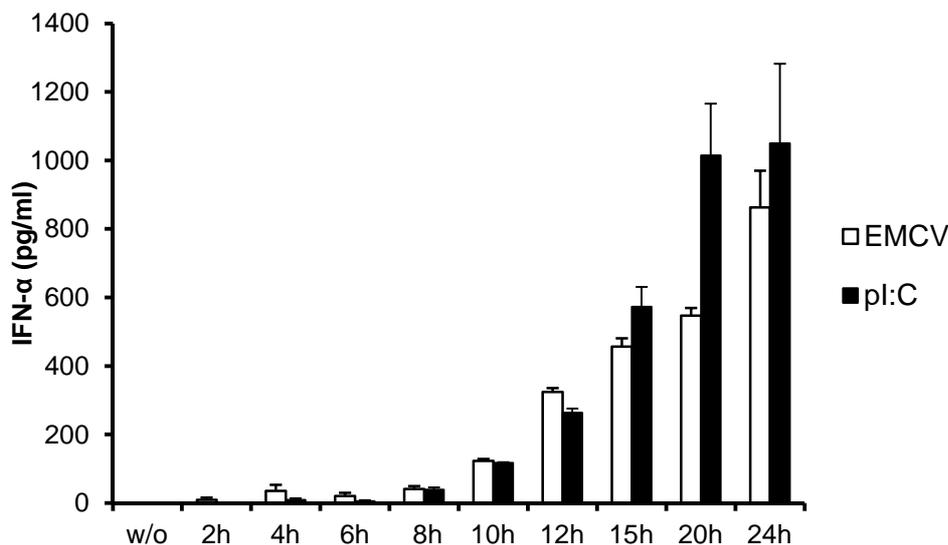
zu Inosinen desaminieren. Findet anschließend eine Replikation der RNA statt, wird komplementär zu dem Inosin nicht Uracil, sondern Cytidin eingebaut. So könnten bei einer Replikation in der Zelle Inosin:Cytidin Basenpaarungen entstehen.

Die Vermutung war, dass eine vorangehende Modifikation der RNA durch ADAR und Replikation eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. Da pI:C schon über die Inosin-Cytidin-Basenpaarungen verfügt und hier keine Modifikationen mehr stattfinden muss, könnte es bei dieser synthetischen dsRNA zu einem früheren Interferonanstieg kommen, als bei den viralen Liganden.

Als natürlicher Ligand diente bei diesem Versuch Encephalomyocarditis Virus-RNA (EMCV), ein Picornavirus. Diese RNA wurde aus infizierten A549-Zellen isoliert, in denen das Virus sich ca. 48 Stunden repliziert hatte. Mit Hilfe von  $\text{CaCl}_2$  wurde das Virus ausgefällt und die RNA isoliert. Da Picornaviren Viren sind, deren RNA eine positive Polarität aufweist, ist diese allein schon infektiös und kann in der Zelle repliziert werden.

Bei dem Experiment wurden humane Monozyten zeitgleich mit EMCV-RNA und pl:C stimuliert. Jeweils nach 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 15h, 20h und 24h wurde Überstand von den mit EMCV-RNA und von den mit pl:C stimulierten Zellen als Dreifachbestimmung abgenommen.

Wie Abb. 18 zeigt, wies die Interferonantwort auf die Stimulation mit EMCV-RNA wider Erwarten keinen verspäteten Anstieg im Vergleich zu der Stimulation mit pl:C auf. Bei beiden Stimuli zeigte sich eine erste messbare Interferonproduktion von den humanen Monozyten nach acht bis zehn Stunden. Dieses Ergebnis lässt deshalb keinen zeitlichen Unterschied zwischen dem Beginn der Erkennung durch MDA-5 von viraler RNA einerseits und pl:C andererseits erkennen ist.



**Abb. 18: Die Interferonproduktion in humanen Monozyten beginnt gleichzeitig bei Transfektion von pl:C und EMCV-RNA**

Humane Monozyten wurden aus Buffy Coats aufgereinigt und zeitgleich mit pl:C bzw. EMCV-RNA stimuliert. Die EMCV-RNA wurde aus infizierten Zellen gewonnen. Nach Transfektion wurden in unterschiedlichen Zeitabständen zur Stimulation (2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 15h, 20h, 24h) die Überstände der Zellen abgenommen und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde der IFN-α Gehalt bestimmt. Als Negativkontrolle diente Medium, das mit der letzten Probe nach 24h entnommen wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Interferonanstieg bei Transfektion von pl:C nicht früher erfolgt als bei Stimulation der Zelle mit EMCV-RNA.

Dieses Experiment repräsentiert die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

### 3.3.2 Virale Replikons

Um genauere Untersuchungen und Modifikationen an den natürlichen Liganden dieses Rezeptors durchzuführen, wurden Elemente des Genoms unterschiedlicher Viren, die sogenannten viralen Replikons genutzt. Virale Replikons sind virale RNA-Strukturelemente, die einen Abschnitt der vollständigen RNA enthalten. Sie sind als Plasmide konserviert und können in Bakterien repliziert und anschließend mittels *in vitro* Transkription in RNA umgewandelt werden. Die viralen Strukturelemente enthielten sämtliche Gene, die für solche Proteine kodierten, die für eine Replikation der Viren notwendig waren. Deshalb konnte auch eine Replikation der RNA im Zytosol der transfizierten Zellen stattfinden.

Es wurden Replikons verschiedener positiv-Einzelstrang-RNA Viren untersucht. Als Modelle wurden Yellow-Fever-Replikons (YF, Familie der Flaviviridae) und Sindbis-Replikons (Sind, Familie der Togaviridae) gewählt.



#### Abb. 19: Schematische Darstellung des Yellow Fever Replikons

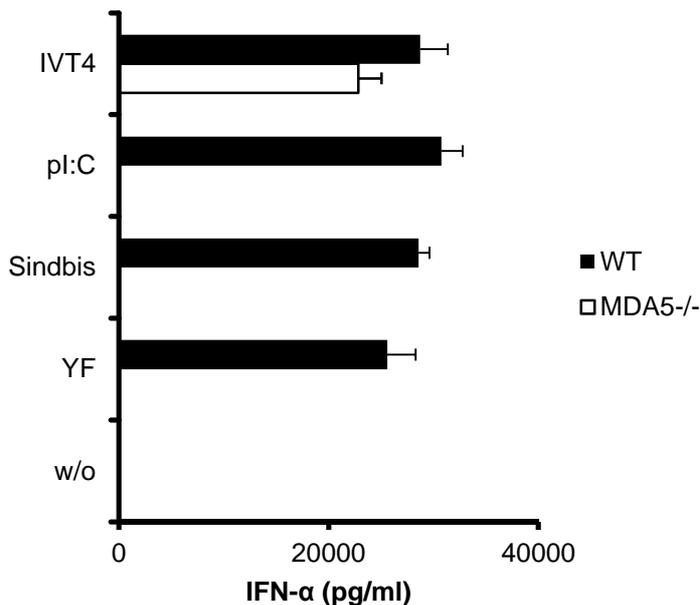
Die Abbildung zeigt den Aufbau eines Yellow Fever Virus-Replikons. Nach der SP6-Promotorregion folgen einige Strukturproteine (C20, Ubiquitin, luc, FMDV2A, E22) und nicht Strukturproteine (NS1-NS5). Bei der Replikonvariante Yellow Fever GDD liegt eine Mutation im Bereich von NS5 vor, der essentiell für die Synthese der RNA-Polymerase ist. Dadurch kann die RNA des Replikons nach der Transfektion in der Zelle nicht replizieren.

Abkürzungen: SP6= Promotorregion für die SP6-Polymerase, C20= ersten 20 Codons des Capsid-Proteins, luc= Luciferase, FMDV2A= foot-and-mouth disease virus 2A coding sequence für eine Autoprotease, E22= die letzten 22 Codons des Envelope-Proteins, NS1-NS5= non structural protein 1-5

Nach Transformation der entsprechenden Plasmide in Bakterien (*E. coli*) wurden die das Plasmid enthaltenden Kolonien unter Antibiotikaselektion herangezüchtet. Nach der Plasmidpräparation wurden diese mit Restriktionsenzymen linearisiert und durch *In vitro* Transkription die komplementäre RNA-Sequenz synthetisiert.

Mit der viralen Replikon-RNA wurden nun murine mDCs stimuliert. Um die Abhängigkeit der Interferonantwort von MDA-5 zu überprüfen wurden sowohl DCs von Wildtyp, als auch von MDA-5 defizienten Mäusen verwendet.

Wie das Diagramm in Abb. 20 zeigt, war eine MDA-5 abhängige Detektion, wie bekannt, bei pl:C zu beobachten. Aber ebenfalls die virale Replikon-RNA der positiv-Einzelstrang-Viren wurden MDA-5 abhängig erkannt und induzierten eine Interferonantwort.



**Abb. 20: Virale Replikons werden MDA-5 abhängig erkannt.**

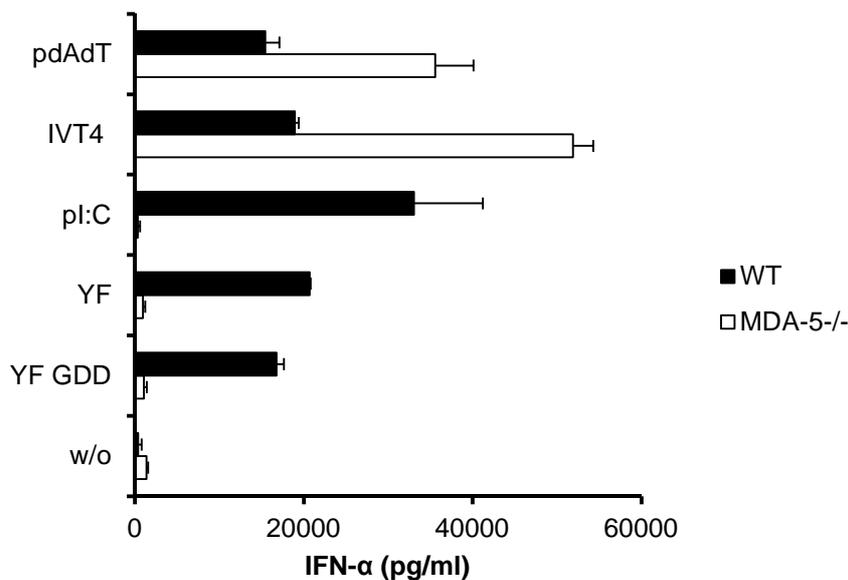
Aus Knochenmark aus den Hinterläufen von Mäusen wurden Zellen gewonnen und zu murinen DC differenziert. Dabei wurden Zellen von Wildtyp- und MDA5<sup>-/-</sup>-Mäusen miteinander verglichen. Die Replikon-RNA verschiedener Viren (Yellowfieber, Sindbis) wurde durch *In vitro*-Transkription von Plasmiden, die Teile des Genoms dieser Viren enthielten, gewonnen. Als Kontrolle für die Wildtypzellen diente IVT4. Hierbei handelt es sich um eine 5'Triphosphat-RNA, die zytosolisch über RIG-I IFN-α induzieren kann. Wie aus der Abbildung ersichtlich, wurden neben pl:C auch die viralen Replikons rein MDA-5 abhängig erkannt.

Im Zusammenhang mit der weiter oben erläuterten Theorie, dass der Ligand für MDA-5 bei einer viralen Infektion der Zelle erst durch Modifikation und vor allem durch Replikation entstehen könnte, wurden weitere Experimente mit den viralen Replikons durchgeführt.

Von dem Replikon des Yellow Fever Virus stand eine Variante zur Verfügung, die in

dem Nicht-Strukturprotein5 (NS5) eine Punktmutation aufwies. Diese Mutation befand sich in dem für die Replikation essentiellen GDD-Motiv und führte zu einem Funktionsverlust der RNA-Polymerase. Hierdurch verloren die in die Zellen transfizierte Replikon YF GDD-RNA die Fähigkeit zur Replikation (Bollati et al., 2009). Laut der ADAR-Hypothese würden in dieser Situation keine Inosin-Cytidin Basenpaarungen entstehen können, sondern nur durch Desaminierung Inosin-Uracil-Basenpaarungen.

Die Replikons mit und ohne Punktmutation wurden jeweils in murine Wildtyp- und MDA-5<sup>-/-</sup>-DCs transfiziert und IFN- $\alpha$  nach 20 Stunden im Überstand bestimmt. Wie aus Abb. 21 ersichtlich, führt sowohl die Stimulation mit Yellow Fever-Replikon, als auch die Variante mit Mutation zu einem Interferonsignal. Dabei war die Menge des Produzierten IFN- $\alpha$  vergleichbar. Beide Liganden wurden rein MDA-5 abhängig erkannt. Hierdurch wurde gezeigt, dass zur Erkennung eines viralen Liganden durch MDA-5 keine Replikation der RNA in der Zelle notwendig ist.



**Abb. 21: Zur Interferoninduktion über MDA-5 ist keine Replikation der Virus-RNA notwendig**

Aus Wildtyp-Mäusen und MDA5-defizienten Mäusen wurden Knochenmarkszellen isoliert und mit GM-CSF haltigem Medium zu mDC differenziert. Diese wurden mit unterschiedlichen Yellow-Fever-Replikons stimuliert. Dabei zeigte YF GDD eine Mutation in der Polymerase, so dass eine Replikation in der Zelle nach Transfektion nicht möglich war. Als Kontrolle dienten wiederum pdAdT und IVT4, die mit Lipofektamin transfiziert wurden. Wie deutlich zu erkennen ist findet sowohl als Reaktion auf die Transfektion von YF als auch auf YF GDD eine MDA-5 abhängige Interferonproduktion statt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Interpretation der Ergebnisse

Das angeborene Immunsystem ist essentiell für eine schnelle Reaktion des Organismus auf eine Infektion. Um das Eindringen eines Pathogens zu entdecken sind spezielle Rezeptoren (PRR) in den Zellen vorhanden, die in der Evolution hochkonservierte Strukturen auf Pilzen, Bakterien und Viren erkennen. MDA-5 ist als Teil des angeborenen Immunsystems einer dieser Rezeptoren und essentiell für die zytosolische Erkennung von Doppelstrang-RNA (Kang et al., 2002). Von dieser Helikase ist bekannt, dass er für die Detektion viraler Infektionen, die von Picornaviren verursacht werden, verantwortlich ist. Des Weiteren ist pl:C als synthetischer Ligand bekannt (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). pl:C ist eine lange dsRNA, die ausschließlich aus Inosin- und Cytidin-Basenpaarungen besteht. Es galt lange als einfaches Analogon für dsRNA und erst Versuche mit gendefizienten Mäusen zeigten, dass pl:C im Zytosol selektiv von MDA-5 erkannt wird. Trotzdem gelang es bis heute nicht, die Gemeinsamkeit von Picornavirus-RNA und pl:C herauszufinden, die als spezifischer Ligand für MDA-5 fungiert.

In dieser Arbeit sollten Eigenschaften synthetischer Liganden untersucht werden, die möglicherweise ursächlich für die Aktivierung von MDA-5 sind. Dabei konnten neue modifizierte Liganden entdeckt werden und einige Bedingungen formuliert werden, die ein MDA-5 Ligand vorweisen muss. Die neuen Liganden wurden in einer Metaanalyse mit dem schon bekanntem Stimuli pl:C verglichen.

Des Weiteren wurde erstmals gezeigt, dass neben vollständiger Virus-RNA auch virale Replikons von MDA-5 erkannt werden. Virale Replikons sind RNA-Strukturelemente, die Teile eines Virus-Genoms enthalten und in Zellen replikationsfähig sind. Mit Hilfe eines Exemplars, das eine Mutation in der RNA-Polymerase aufwies, konnte gezeigt werden, dass keine Replikation der Virus-RNA stattfinden muss, um eine Interferonantwort über MDA-5 zu induzieren.

In dieser Arbeit wurde der bekannte MDA-5-Ligand pl:C mittels hochfrequentem Ultraschall in kürzere Fragmente geteilt und in humane Monozyten transfiziert. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Menge des produzierten Interferons in Abhängigkeit von der Länge des Stimulus. Dies lässt die Aussage zu, dass die Länge von pl:C ein

entscheidendes Kriterium zur Erkennung ist. Kato und Kollegen zeigten 2008, dass pl:C längenabhängig von MDA-5 erkannt wird. Die Arbeitsgruppe inkubierte die lange dsRNA mit einem bakteriellem Enzym, der RNaseIII. Dabei stellten sie fest, dass die kürzeren Fragmente RIG-I-abhängig erkannt wurden. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bei der mechanischen Scherung von pl:C wurde das Signal in humane Monozyten, die auch RIG-I im Zytosol besitzen, kontinuierlich schwächer. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Resultate könnte darin liegen, dass durch die chemische Verkürzung Teile mit einer anderen Struktur, z.B. veränderte RNA-Enden, entstanden sind im Vergleich zu dem mechanischen Verfahren im Ultraschallbad. Übereinstimmend zeigte sich aber, dass die Länge ein wichtiger Faktor ist, um Interferon über MDA-5 zu induzieren. Dass sie aber nur ein notwendiges, aber kein hinreichendes Kriterium für die Eigenschaft als Ligand ist, zeigten Versuche, in denen die Sequenz von pl:C verändert wurde.

Bei der Modifikation der Sequenz von pl:C zeigte sich in den hier durchgeführten Experimenten, dass der Inosin-Strang durch Guanosine ergänzt werden kann, ohne dass die stimulatorische Fähigkeit vollständig verloren geht. Allerdings korrelierte die Anzahl der Inosin-Cytidin-Basenpaarungen mit der Menge des induzierten Interferons. Je mehr Guanosine enthalten waren, desto weniger fungierte die RNA als MDA-5 Stimulus. Dies ließ sich besonders deutlich durch eine Metanalyse über mehrere Versuche darstellen. Hier zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Mengen des produzierten Interferons feststellbar war, solange mindestens 50 % Inosin in dem pl-G enthalten war. Stieg der Anteil von Guanosin in dem Strang weiter an, so war die Differenz signifikant, der Stimulus also deutlich weniger aktiv als pl:C.

Ein Versuch, in dem sowohl pl:C als auch pl-G:C(9:1), pl-G:C(1:1) und pl-G:C(1:9) systematisch mit pA verdünnt und in humane Monozyten transfiziert wurden, zeigte, dass in diesem Fall die Kurve der stärker Interferonproduzierenden Stimuli absolut betrachtet steiler abfiel, als die der schon unverdünnt weniger wirksamen Stimuli. So zeigte sich schon ab einer Verdünnung von 1:16 kaum noch ein Unterschied zwischen den dsRNAs. Für die Degression der Interferonproduktion bei Verdünnung des Stimulus gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Es wäre möglich, dass weniger humane Monozyten stimuliert wurden, was in einer geringeren Menge von IFN- $\alpha$  resultierte. Eine andere Erklärung wäre, dass zwar gleich viele Zellen aktiviert wurden, diese aber, da

weniger RNA pro Zelle im Zytosol vorlag, pro Monozyt weniger Interferon produzierten. Die Versuchsreihe, bei der die Sequenz von pl:C verändert wurde, zeigt die zentrale Bedeutung von Inosin-Cytidin-Basenpaarungen für die Erkennung der RNA. Sie sind essentiell, damit pl:C an MDA-5 binden und den Rezeptor aktivieren kann. Was das Wesentliche an dieser Verbindung ist, bleibt weiterhin unklar. Inosin bildet sogenannte Tetraden, die zu einer besonderen Stabilität und Sekundärstruktur der Nukleinsäure führt (Arnott et al., 1974). Denkbar wäre, dass diese Sekundärstruktur eine Rolle bei der Bindung des Liganden spielt.

Die Guanosin-Cytidin-Paarungen selbst induzierten bei Transfektion keine Interferonantwort. Das belegen auch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, in denen pG:C keine stimulatorische Aktivität in humanen Monozyten zeigt. Da aber das Signal bei pl-G:C nicht unmittelbar abbricht, sondern schrittweise schlechter wird, scheinen die Guanosine, die Ausbildung der über MDA-5 erkannten Struktur nicht zu inhibieren. Ursache hierfür könnte sein, dass sich lediglich weniger stimulierende Motive ausbilden können, also durch die Zunahme von G:C Basenpaaren eine Art „Verdünnungseffekt“ der eigentlich aktiven I:C Basenpaare auftritt. Da aber nicht bekannt ist, was das interferon-induzierende Motiv ist, könnte auch die dreidimensionale Anordnung von pl:C eine Rolle spielen, die bei der Sequenzmodifikation geändert wird, wodurch der Stimulus weniger gut gebunden werden kann. Oligomere von Guanosin bilden ebenso wie Inosin Tetraden-Strukturen aus, die sich allerdings durch die Anordnung der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander unterscheiden (Arnott et al., 1974). Dieser Unterschied könnte dafür verantwortlich sein, dass G:C-Basenpaarungen zwar nicht zu einer Erkennung über MDA-5 führen, aber durch die ähnlichen Tetraden die Sekundärstruktur des pl:C auch nicht wesentlich gestört wird, so dass die vorhandenen I:C-Paare weiterhin als Ligand für MDA-5 fungieren können. Die Versuche zur Variation der Länge und Variation des Inosin-Stranges zeigen, dass vermutlich ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren verantwortlich für eine Immunantwort über MDA-5 ist.

Anders verhielt es sich, wenn man den Cytidin-Strang durch den Einbau eines zunehmenden Anteils Uracil veränderte. Bereits ein pC Strang mit nur einem geringen Anteil an Uracil und hybridisiert mit pl war nach Transfektion in humane Monozyten nicht mehr in der Lage die Zellen zur Interferonproduktion anzuregen.

In der Literatur ist das Molekül Ampligen® (pI-C<sub>12</sub>U) beschrieben, mit dem auch schon unterschiedliche *in vivo* Studien durchgeführt worden sind, da es als weniger toxisch als pI:C gilt (Carter et al., 1987; Hendrix et al., 1993). Bei dieser RNA wurde in dem Cytidin-Strang ein zwölftel der Cytidine durch Uracil ersetzt. Diese dsRNA wird nicht über MDA-5 erkannt sondern ausschließlich über TLR3 (Gowen et al., 2007). Vitali und Kollegen fanden 2010 heraus, dass dsRNA, die Inosin-Uracil-Basenpaarungen enthielt, inhibierend auf die Interferonantwort und auf die Expression interferoninduzierter Gene wirkte (Vitali und Scadden, 2010). IU-RNA verhindert demnach die Phosphorylierung von IRF3, das eine zentrale Rolle in der Signalübermittlung hat. Zusätzlich interagiert dsRNA, die mehrere I:U-Basenpaarungen enthält, direkt mit den RIG-I-like-Helikasen und inhibiert die Bindung von pI:C.

Diese Ergebnisse kongruieren größtenteils mit denen aus dieser Arbeit. Die inhibitorische Funktion von Inosin-Uracil-RNA würde erklären, warum das Interferonsignal bei Modifikation des Cytidinstrangs mit Uracil sofort abbricht. In den Versuchen von Vitali und Kollegen wurden HeLa-Zellen parallel mit pI:C und RNA, die I:U-Basenpaarungen enthielt, stimuliert und so die inhibitorische Wirkung verglichen. In unseren Versuchen wurde ausschließlich pI:C-U ohne Zugabe von pI:C transfiziert. Insofern könnte die abgebrochene Produktion von Interferon dafür sprechen, dass der Stimulus so verändert wurde, dass er nicht mehr als MDA-5-Ligand dient. Da Vitali und Kollegen kurze RNA-Abschnitte mit unterschiedlichen Sequenzen verwendet haben, ist nicht sicher, ob sie die gleichen Eigenschaften in Bezug auf MDA-5 besitzen wie pI:C-U. Allerdings ist im Kontext der oben genannten Publikationen nicht auszuschließen, dass pI:C-U an MDA-5 gebunden wird, aber kein Signal, das zur Interferonantwort führt, induziert. Es könnte demnach zusätzlich weitere Schritte, die zur Transkription von Genen der Interferonsynthese führen, wie die Phosphorylierung von IRF3, inhibiert haben. Um diese Möglichkeit zu verifizieren bzw. auszuschließen wären weitere Bindungsstudien mit dem Liganden nötig.

In dieser Arbeit wurden weiterhin auch virale RNA Liganden für MDA-5 untersucht. Es bestand die Hypothese, dass bei Eindringen von viraler RNA in die Zelle erst Modifikationen an den Nukleinsäuren stattfinden muss, damit dieses als Ligand für MDA-5 dienen kann. Das zytosolisch vorliegende Enzym ADAR1 ist durch Interferon induzierbar und desaminiert in dsRNA Adenosin zu Inosin (Bass und Weintraub, 1988; Patterson

und Samuel, 1995; Wagner et al., 1989). Bei einer Replikation werden dem Inosin gegenüber bevorzugt Cytidine eingebaut, so dass I:C-Basenpaarungen entstehen. Da diese Hypothese für die Aktivierung von MDA-5 voraussetzt, dass vor der Interferonproduktion erst ein Replikationszyklus und die anschließende Basen-Modifikation durch ADAR erfolgen müsste wurde der zeitlich Verlauf der Interferonantworten, induziert durch pl:C oder EMCV-RNA verglichen. Hier zeigte sich kein Unterschied beim Beginn des Anstieges nach Transfektion. Dies sprach eher gegen die Theorie, dass erst noch Replikation und Veränderungen der RNA stattfanden. Allerdings ist es schwer abzuschätzen, wie viel Zeit ein solcher Zyklus in Anspruch nimmt, vor allem in Relation zu der Zeit, die der weitere Signalweg und anschließende Transkription und Translation der Gene, die zur Produktion der Zytokine führen, braucht. So wäre eine spätere Interferonantwort bei Stimulation mit EMCV-RNA ein starkes Indiz für die ADAR-Hypothese gewesen, aber die Feststellung, dass natürlicher und synthetischer Ligand eine ähnliche Anstiegskinetik aufweisen schließt nicht aus, dass die ursprüngliche Virus-RNA erst noch abgeändert wird.

Mit der Bereitstellung verschiedener viraler Replikons durch das Virologische Institut des Universitätsklinikums Bonn konnten mögliche natürliche Liganden genauer untersucht werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass neben den in Abb. 20 gezeigten Replikons des Yellow Fever Virus (Familie der Flaviviridae) und des Sindbisvirus (Familie der Togaviridae) auch Replikons des Poliovirus (Familie der Picornaviridae) MDA-5 abhängig erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Alle diese Virus Familien gehören zu den Plus-Strang-Viren. Der Aufbau ihres Genoms und ihr Replikationszyklus unterscheiden sich allerdings. So besitzen das Sindbisvirus und das Yellow Fever Virus im Gegensatz zu den Picornaviren keine IRES-Sequenz, sondern wie zelleigene mRNA eine 5'Cap-Struktur (Kaariainen et al., 1987; Liu et al., 2010). Sowohl das 5'-CAP, als auch die IRES-Sequenz dienen der Erkennung der RNA durch das Ribosom und der sofortigen Translation. Dadurch ist bei Plus-Strang-Viren im Gegensatz zu Minus Strang-Viren, die erst durch virale Polymerasen umgeschrieben werden müssen schon allein die RNA infektiös. Ein weiterer Unterschied zwischen den Genomen ist, dass Flaviviren keinen Poly-A-Schwanz besitzen, wie die andern beiden Viren (Liu et al., 2010; Wengler, 1981).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch virale Replikons MDA-5 abhängig erkannt werden. Und zwar nicht nur solche, die Teile des Genoms von Picornaviren enthalten, sondern auch solche mit dem Genomelementen von anderen Plus-Strang-Viren. Picornaviren haben am 5'-Ende ihres Genom ein sogenanntes VpG-Cap (Lee et al., 1977). Da Replikons zwar Teile des Genoms enthalten aber kein Protein wie das VpG-Cap konnte somit ausgeschlossen werden, dass dieses eine entscheidende Struktur für die Auslösung einer Reaktion des innatens Immunsystems ist. Dies deckt sich mit Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, in denen das VpG-Cap verdaut wurde und dennoch eine Interferonantwort messbar war.

Durch den Nachweis, dass die Replikons MDA-5 abhängig erkannt werden, bestand die Möglichkeit gezielt veränderte Replikons einzusetzen. So wurde ein Yellow Fever Replikon, das im Polymerase kodierenden Teil des Genoms eine Punktmutation trug, in murine mDC transfiziert. Durch diese Mutation war eine Replikation der RNA unmöglich. In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch dieses replikationsdefiziente Replikon MDA-5 abhängig erkannt wird. Diese Feststellung widerlegte die Hypothese, dass erst eine ADAR abhängige Modifikation und anschließend eine Replikation stattfinden müsse, damit die virale RNA einen Liganden für MDA-5 bildet. Damit stellt sich die Frage, inwiefern Inosin-Cytidin-Basenpaarungen eine Rolle bei der Detektion von Virus-RNA spielen. Da in der Sequenz der Replikons keine Inosine vorhanden waren und durch die fehlende Replikation auch keine Doppelstrang-RNA vorlag, ist es fraglich, ob an der Virus-RNA überhaupt Modifikationen durch ADAR durchgeführt werden. Die Feststellung, dass durch die fehlende Replikation keine dsRNA im Zytosol vorliegt, lässt weiterhin die Überlegung aufkommen, welche Struktur durch MDA-5 erkannt wird. Da dieser Rezeptor dafür bekannt ist, dass er dsRNA erkennt (Kang et al., 2002), wäre es eine Möglichkeit, dass in dem Genom der Plusstrangviren durch Faltung streckenweise dsRNA entsteht, die das Erkennungsmotiv enthält. Diese Beobachtungen würden die Theorie unterstützen, dass der Faltung der RNA in Sekundärstrukturen eine wesentliche Rolle zukommt und pI:C durch Tetradenbildung eine dem ähnliche Struktur ausbilden kann. Ein Abschnitt der RNA in der bekannterweise mehrere Sequenzen mit Faltungen vorliegen ist die IRES-Sequenz. Da aber wie oben beschrieben Flaviviren keine IRES besitzen, sondern ein 5'-CAP und

trotzdem MDA-5 abhängig erkannt werden, konnte ausgeschlossen werden, dass diese Region essentiell für die Funktion als Ligand ist.

Auch der Poly-A-Schwanz der picornaviralen RNA scheint mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an der Interferoninduktion beteiligt zu sein, da Yellow Fever keinen besitzt und des Weiteren hier keine besondere Faltung vorhanden ist (Wengler, 1981). Ein interessanter Aspekt wäre also, die hier verwendeten Replikons auf ihre Sekundärstruktur zu untersuchen. Da die experimentelle Darstellung der Faltung ein sehr aufwendiger Prozess ist (Watts et al., 2009), wäre es z.B. eine Möglichkeit mit einem geeigneten Programm die wahrscheinlichste Faltung der RNA über einen Algorithmus zu errechnen. In den letzten Jahren wurden immer neue Verfahren entwickelt, um die wahrscheinlichste Faltung zu berechnen (Ding und Lawrence, 2003; Nebel und Scheid, 2011). Durch gezielte Änderung der Sequenz und so Änderung der Sekundärstruktur könnten evtl. weitere Aussagen über notwendige Eigenschaften des MDA-5-Liganden getroffen werden.

Weiterhin unklar ist auch die eigentliche Funktion von ADAR in der Virusabwehr. Da die Expression durch IFN induzierbar ist, wäre weiterhin denkbar, dass die Modifikationen virale RNA zu Liganden für unterschiedliche Rezeptoren verändern könnte. Es wäre aber auch möglich, dass gezielt einzelne Basen desaminiert würden, so dass eine Translation der RNA und somit die Protein-Produktion gestört würde. Die ADAR verändert z.B. das Genom von Hepatitis C Virus und verhindert so seine Replikation (Taylor et al., 2005).

Eine andere Funktion von ADAR zeigten 2009 Hartner und Kollegen: Sie identifizierten ADAR1 als ein Enzym, das hemmenden Einfluss auf den Interferon-Signalweg und somit auch auf Apoptose in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen hat (Hartner et al., 2009). Weitere Arbeiten eines anderen Labors zeigten wie weiter oben schon erwähnt, dass dsRNA, die Inosin-Uracil-Basenpaarungen enthält, von sich aus die Phosphorylierung von IRF3 und somit das Interferonsignal und Apoptose inhibieren kann (Vitali und Scadden, 2010). Es ist also durchaus möglich, dass ADAR an der Erkennung von natürlichen Liganden durch MDA-5 nicht beteiligt ist, sondern im Gegenteil eine überschießende Interferonantwort und frühzeitige Apoptose verhindern soll. Allerdings bleibt die Frage offen, warum bei pl:C Inosine essentiell für die Funktion des synthetischen Liganden sind.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit wichtige Eigenschaften bestimmt, die ein MDA-5 Ligand haben muss. Bei der Erkennung von pl:C sind sowohl die Länge, als auch die I:C-Basenpaarungen von wesentlicher Bedeutung, wobei einige wenige Inosine ausreichen um eine Interferonantwort auszulösen. Des Weiteren kann man sagen, dass weder das VpG-Cap, noch das 3'-poly-A -Ende oder die IRES-Sequenz ausschlaggebend für die Interferonantwort via MDA-5 ist.

Bei der Erkennung von Virus-RNA spielte die Replikation keine Rolle. Es ist also wahrscheinlich, dass an der RNA keine Modifikationen mehr durchgeführt werden, sondern die zwingend erforderliche Struktur schon von vornherein in der RNA vorhanden ist. Darüber hinaus weist die nicht notwendige Replikation darauf hin, dass der Sekundärstruktur und somit der teilweise vorliegenden dsRNA-Abschnitte eine entscheidende Rolle zukommt.

## **4.2 Klinische Bedeutung**

MDA-5 ist seit 2006 als ein Rezeptor des innate Immunsystems bekannt. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass auch einige bekannte Krankheitsbilder mit diesem PRR zusammenhängen bzw. durch ihn beeinflussbar sind.

Im Jahr 2009 wurden Mutationen unterschiedlicher Gene im Hinblick auf ihren Einfluss bei der Erkrankung Diabetes mellitus Typ I untersucht (Nejentsev et al., 2009). Hier zeigte sich, dass unterschiedliche Mutationen, die die Funktion von MDA-5 beeinträchtigen, eine protektive Wirkung besaßen. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Diskussion interessant, dass Diabetes mellitus Typ I durch eine asymptomatische Virusinfektion und anschließende überschießende Immunreaktion verursacht werden könnte.

Zudem konnte bei Patienten, die an der Autoimmunerkrankung Dermatomyositis litten eine erhöhte Expression von MDA-5 in Hautzellen festgestellt werden (Zahn et al., 2011). Wobei hier der genaue Pathomechanismus noch zu klären ist.

Seit kurzem ist bekannt, dass Rig-I-like Helikasen als negativ-Regulator des Immunsystems bei Autoimmunkrankheiten wie Multipler Sklerose fungieren können. Prinz und Kollegen zeigten in einem Mausmodell, dass durch gezielte Aktivierung von RIG-I mit Triphosphat-RNA oder MDA-5 mit pl:C eine signifikante Verbesserung der

sterilen Entzündung des ZNS und eine verminderte Zerstörung der Axone erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse, denen das für den Signalweg der RIG-I-like-Helikasen wichtige Protein IPS-1 fehlte, einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf (Dann et al., 2011).

Dies zeigt die therapeutischen Möglichkeiten von spezifischen Liganden auf. Schon heute spielen Interferone in der Humanmedizin bei einigen Erkrankungen eine bedeutende Rolle. So wird die Multiple Sklerose als immunmodulatorische Therapie mit Interferon- $\beta$  behandelt und eine Hepatitis C Infektion neben antiviralen Medikamenten auch mit pegyliertem Interferon- $\alpha$ . Wenn klinisch einsetzbare Liganden für PRR existierten, so könnte eine gezieltere Immunmodulation erfolgen. Dafür müssen allerdings genaue Strukturen der Liganden bekannt sein und weiterhin eine Form existieren, die auch für das humane System applizierbar und nicht toxisch wäre. Durch die lange Halbwertszeit von pl:C gilt dieses allerdings als sehr toxisch (Robinson et al., 1976). Deswegen wäre es auch von großem klinischem Interesse einen geeigneten Liganden von MDA-5 zu identifizieren, der besser für den Einsatz am Patienten geeignet wäre.

Die RLH sind auch deswegen von besonderem Interesse, da sie ubiquitär und nicht nur in Immunzellen vorkommen. Erste Forschungsergebnisse zeigen, dass durch Aktivierung des Immunsystems auch maligne Tumore bekämpft werden können. So kann die gezielte Stimulation von ovariellen Tumorzellen mit RIG-I-Agonisten diese in einen antiviralen Zustand versetzt und zu einer erhöhten Apoptoserate führen (Kubler et al., 2010). Darüber hinaus vermag auch die Stimulation mit pl:C und somit Aktivierung von MDA-5, in Ovarialkarzinomzellen vermehrt Apoptose und NK-Zell-Aktivierung zu erreichen (Kubler et al., 2011).

Generell kann man sagen, dass es weitreichende potentielle Einsatzgebiete für spezifische RLH-Stimulantien gibt. Sowohl bei Infektionen, bei Autoimmunkrankheiten als auch bei malignen Tumorerkrankungen bestehen Möglichkeiten eine Immunantwort gezielt zu initiieren, lenken bzw. unerwünschte Formen der Reaktivität zu unterdrücken.

## 5. Zusammenfassung

Bei einer Infektion des Körpers durch ein Pathogen muss das Immunsystem schnell reagieren, um eine Ausbreitung des Krankheitserregers zu verhindern. Dies geschieht durch hochkonservierte Strukturen (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) auf Pilzen, Bakterien und Viren, die über spezielle Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) als „fremd“ identifiziert werden. Einer dieser Rezeptoren ist die zytosolische Helikase MDA-5, die Doppelstrang-RNA als Ligand besitzt. Obwohl bekannt ist, dass das synthetische dsRNA-Analogon pl:C und das Genom von Picornaviren eine Aktivierung von MDA-5 bewirken, bleibt die genaue Struktur, die als Erkennungsmuster dient, unbekannt. Diese Arbeit identifizierte Eigenschaften sowohl von pl:C, als auch von viraler RNA, die notwendig sind um eine Interferonantwort über MDA-5 zu erreichen.

Es wurden lange RNA-Stränge mit unterschiedlichen Sequenzen mit Hilfe der Polynukleotidphosphorylase (PNPase) hergestellt und auf ihre Stimulationsfähigkeit untersucht. Des Weiteren wurde pl:C im Ultraschallbad mechanisch verkürzt und analysiert, welchen Einfluss die Länge auf die produzierte Interferonmenge hat.

Weiterhin wurden virale Strukturelemente mittels *in vitro* Transkription hergestellt und replikationsfähige und –inkompetente Elemente verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Länge von pl:C, positiv mit der Aktivierung von MDA-5 korreliert. Aber auch die Basenabfolge ist entscheidend bei der Eigenschaft als Ligand. Hierbei werden auch komplexere Sequenzen erkannt, sofern sie einen Mindestanteil I:C-Basenpaarungen enthalten.

Es wurde festgestellt, dass virale Strukturelementen von Polio-, Sindbis- und Yellowfevervirus MDA-5 abhängig erkannt werden. Dabei war die Replikationsfähigkeit der viralen RNA für die Aktivierung von MDA-5 und die dabei induzierte Interferonantwort nicht notwendig.

## Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der RIG-I-like Helikasen (nach Barral et al., 2009) ..	17
Abb. 2: Aufbau des Genoms eines Poliovirus vom Typ 1 (nach De Jesus, 2007).....	19
Abb. 3: Signalweg der RIG-I like Helikasen (nach Kawai und Akira, 2008).....	20
Abb. 4: Desaminierung von Adenosin zu Inosin.....	25
Abb. 5: Funktion des Transfektionsreagenz LT1.....	38
Abb. 6: Funktionsprinzip der magnetischen Monozyten-Separation .....	41
Abb. 7: Funktion eines ELISAs .....	44
Abb. 8: Längenabhängige Erkennung von pl:C in humanen Monozyten .....	54
Abb. 9: Polyacrylamid-Gel mit selbst synthetisiertem pl-G.....	56
Abb. 10: Die Erkennung von pl-G:C ist MDA-5 abhängig .....	57
Abb. 11: Einzelne I:C Basenpaarungen sind hinreichend um Interferon zu induzieren..	59
Abb. 12: Polyacrylamidgel mit selbst synthetisiertem pC-U .....	60
Abb. 13: pl:C-U induziert keine Interferonantwort in humanen Monozyten .....	61
Abb. 14: Kontinuierliche Abnahme der Interferonproduktion bei einer Verdünnung von pl:C und pl-G:C mit pA.....	63
Abb.15: Unterschiede bei der Stimulation der jeweiligen pl-G:C.....	66
Abb.16: Viele Guanosine inhibieren die Interferonantwort signifikant .....	67
Abb. 17: Theorie zu Modifikation der RNA durch ADAR und Replikation.....	68
Abb. 18: Die Interferonproduktion in humanen Monozyten beginnt gleichzeitig bei Transfektion von pl:C und EMCV-RNA .....	69
Abb. 19: Schematische Darstellung des Yellow Fever Replikons .....	70
Abb. 20: Virale Replikons werden MDA-5 abhängig erkannt. ....	71
Abb. 21: Zur Interferoninduktion über MDA-5 ist keine Replikation der Virus-RNA notwendig.....	72

## 6. Literaturverzeichnis

Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985a; 42: 791-798

Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985b; 42: 779-789

Arnott S, Chandrasekaran R, Marttila CM. Structures for polyinosinic acid and polyguanylic acid. *Biochem J* 1974; 141: 537-543

Balachandran S, Roberts PC, Brown LE, Truong H, Pattnaik AK, Archer DR, Barber GN. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* 2000; 13: 129-141

Barral PM, Sarkar D, Su ZZ, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, Fisher PB. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 2009; 124: 219-234

Bass BL, Weintraub H. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell* 1988; 55: 1089-1098

Bekeredjian-Ding I, Roth SI, Gilles S, Giese T, Ablasser A, Hornung V, Endres S, Hartmann G. T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes. *J Immunol* 2006; 176: 7438-7446

Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC. Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors* 2004; 22: 243-251

Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, de Lamballerie X, Gould EA, Grard G, Grimes JM, Hilgenfeld R, Jansson AM, Malet H, Mancini EJ, Mastrangelo E, Mattevi A, Milani M, Moureau G, Neyts J, Owens RJ, Ren J, Selisko B, Speroni S, Steuber H, Stuart DI, Unge T, Bolognesi M. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res* 2009; 87:125-148

Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, Tschopp J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 12203-12209

Carter WA, Strayer DR, Brodsky I, Lewin M, Pellegrino MG, Einck L, Henriques HF, Simon GL, Parenti DM, Scheib RG, et al. Clinical, immunological, and virological effects of amplitgen, a mismatched double-stranded RNA, in patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1987; 1: 1286-1292

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997; 90: 1458-1470

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5: 919-923

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. 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: 747-752

Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997; 27: 431-441

Dann A, Poeck H, Croxford AL, Gaupp S, Kierdorf K, Knust M, Pfeifer D, Maihoefer C, Endres S, Kalinke U, Meuth SG, Wiendl H, Knobloch KP, Akira S, Waisman A, Hartmann G, Prinz M. Cytosolic RIG-I-like helicases act as negative regulators of sterile inflammation in the CNS. *Nat Neurosci* 2011; 15: 98-106

De Jesus NH. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology* 2007; 4: 70

de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 289-307

Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193: 233-238

Ding Y, Lawrence CE. A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 7280-7301

Dunne A, Ejdeback M, Ludidi PL, O'Neill LA, Gay NJ. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* 2003; 278: 41443-41451

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 571-611

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815-3822

Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 39-62

Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4: 491-496

Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5: 1249-1255

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. 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: 8459-8464

Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mitchell WM, Alexopoulou L, Flavell RA, Sidwell RW. 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: 5200-5208

Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* 2007; 282: 11817-11826

Hartner JC, Walkley CR, Lu J, Orkin SH. ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling. *Nat Immunol* 2009; 10: 109-115

Hendrix CW, Margolick JB, Petty BG, Markham RB, Nerhood L, Farzadegan H, Ts'o PO, Lietman PS. Biologic effects after a single dose of poly(I):poly(C12U) in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 429-435

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314: 994-997

Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 3628-3632

Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, MacPherson GG. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 2000; 191: 435-444

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216

Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 1988; 62: 2636-2643

Jelinek DF, Braaten JK. Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995; 154: 1606-1613

Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1683-1690

Kaariainen L, Takkinen K, Keranen S, Soderlund H. Replication of the genome of alpha-viruses. *J Cell Sci Suppl* 1987; 7: 231-250

Kang DC, Gopalkrishnan RV, Lin L, Randolph A, Valerie K, Pestka S, Fisher PB. 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: 1789-1800

Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. 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: 637-642

Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. 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: 1601-1610

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441: 101-105

Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 1-20

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005; 6: 981-988

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167: 5887-5894

Kochs G, Haller O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem* 1999a; 274: 4370-4376

Kochs G, Haller O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999b; 96: 2082-2086

Kubler K, Gehrke N, Riemann S, Bohnert V, Zillinger T, Hartmann E, Polcher M, Rudlowski C, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70: 5293-5304

Kubler K, Pesch C, Gehrke N, Riemann S, Dassler J, Coch C, Landsberg J, Wimmenauer V, Polcher M, Rudlowski C, Tuting T, Kuhn W, Hartmann G, Barchet W. Immunogenic cell death of human ovarian cancer cells induced by cytosolic poly(I:C) leads to myeloid cell maturation and activates NK cells. *Eur J Immunol* 2011; 41: 3028-3039

Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DF. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003; 4: 1009-1015

Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14: 461-470

Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, Wimmer E. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 59-63

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983

Liu L, Dong H, Chen H, Zhang J, Ling H, Li Z, Shi PY, Li H. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front Biol* 2010; 5: 286-303

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002; 100: 4512-4520

Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007; 448: 816-819

Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; 189: 521-530

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; 10: 417-426

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 4-9

Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 437: 1167-1172

Montoya M, Schiavoni G, Mattei F, Gresser I, Belardelli F, Borrow P, Tough DF. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 2002; 99: 3263-3271

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 5998-6004

Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997; 278: 1612-1615

Navabi H, Jasani B, Reece A, Clayton A, Tabi Z, Donninger C, Mason M, Adams M. A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro. *Vaccine* 2009; 27: 107-115

Nebel ME, Scheid A. Evaluation of a sophisticated SCFG design for RNA secondary structure prediction. *Theory Biosci* 2011; 130: 313-336

Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 2009; 324: 387-389

Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 321-349

O'Neill LA, Dunne A, Edjeback M, Gray P, Jefferies C, Wietek C. Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2003; 9: 55-59

Oganesyan G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006; 439: 208-211

Ortaldo JR, Lang NP, Timonen T, Herberman RB. Augmentation of human natural killer cell activity by interferon: conditions required for boosting and characteristics of the effector cells. *J Interferon Res* 1981; 1: 253-262

Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4: 161-167

Patterson JB, Samuel CE. 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: 5376-5388

Pestka S. The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 2000; 55: 254-287

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006; 314: 997-1001

Platanias LC, Uddin S, Domanski P, Colamonici OR. Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and beta subunits of the type I interferon receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 23630-23633

Player MR, Torrence PF. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther* 1998; 78: 55-113

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999; 189: 615-625

Rabinovici R, Kabir K, Chen M, Su Y, Zhang D, Luo X, Yang JH. ADAR1 is involved in the development of microvascular lung injury. *Circ Res* 2001; 88: 1066-1071

Rebouillat D, Hovanessian AG. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 295-308

Robinson RA, DeVita VT, Levy HB, Baron S, Hubbard SP, Levine AS. A phase I-II trial of multiple-dose polyriboinosic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 599-602

Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2769-2778

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196: 137-151

Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005; 175: 5260-5268

Ryzhakov G, Randow F. SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J* 2007; 26: 3180-3190

Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, Xiang Y, Bose S. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol* 2009; 10: 1073-1080

Saha SK, Pietras EM, He JQ, Kang JR, Liu SY, Oganessian G, Shahangian A, Zarnegar B, Shiba TL, Wang Y, Cheng G. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* 2006; 25: 3257-3263

Sallusto F, Lanzavecchia A. 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: 1109-1118

Sampson LL, Heuser J, Brown EJ. 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: 1005-1013

Samuel CE. Mechanism of interferon action: phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated kinase processing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 600-604

Sasai M, Shingai M, Funami K, Yoneyama M, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *J Immunol* 2006; 177: 8676-8683

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. 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: 423-434

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009; 31: 25-34

Serra MJ, Smolter PE, Westhof E. Pronounced instability of tandem IU base pairs in RNA. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1824-1828

Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122: 669-682

- Siegel FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-1837
- Silvennoinen O, Ihle JN, Schlessinger J, Levy DE. Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. *Nature* 1993; 366: 583-585
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-1162
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14
- Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 17-22
- Taniguchi T, Takaoka A. A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 378-386
- Taylor DR, Puig M, Darnell ME, Mihalik K, Feinstone SM. New antiviral pathway that mediates hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol* 2005; 79: 6291-6298
- Uze G, Lutfalla G, Mogensen KE. Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15: 3-26
- Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* 2007; 178: 6444-6455
- Vitali P, Scadden AD. Double-stranded RNAs containing multiple IU pairs are sufficient to suppress interferon induction and apoptosis. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 1043-1050
- Wagner RW, Smith JE, Cooperman BS, Nishikura K. 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: 2647-2651
- Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, Leonard CW, Bess JW Jr., Swanstrom R, Burch CL, Weeks KM. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature* 2009; 460: 711-716
- Wengler G. Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology* 1981; 113: 544-555
- Williams A, Flavell RA, Eisenbarth SC. The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 34-40

Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005; 19: 727-740

Yamaguchi T, Handa K, Shimizu Y, Abo T, Kumagai K. Target cells for interferon production in human leukocytes stimulated by sendai virus. *J Immunol* 1977; 118: 1931-1935

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; 169: 6668-6672

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr., Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005; 175: 2851-2858

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 730-737

Zahn S, Barchet W, Rehkemper C, Hornung T, Bieber T, Tuting T, Wenzel J. Enhanced skin expression of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) in dermatomyositis and related autoimmune diseases. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64: 988-989

Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 2588-2592

## 7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Professor Dr. Gunter Hartmann für die Möglichkeit der Dissertation, bei der ich in seinen Laboren Einblicke in die medizinische Forschung gewinnen konnte.

Ein besonders herzlicher Dank gilt auch dem Arbeitsgruppenleiter Dr. Winfried Barchet für die Planung und engagierte Betreuung des Projektes. Er hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank auch an die naturwissenschaftliche Doktorandin Vera Wimmenauer, die mir vor allem in der Anfangszeit eine große Hilfe im Labor war und dem technischen Assistenten Malte Stasch. Ebenso danke ich dem ganzen Team der Klinischen Chemie und Pharmakologie, für die immer vorhandenen Hilfestellungen und offenen Ohren.

An Professor Dr. Christian Drost und Frau Dr. Beate Kümmerer richte ich meinen Dank für die Bereitstellung der viralen Replikons und die geduldige Beantwortung von Rückfragen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei der BONFOR-Kommission für die Bereitstellung des Stipendiums, das es mir ermöglicht hat, ein Freisemester zu nehmen und mich ganz auf die Forschung zu konzentrieren.

Ein ganz großer Dank gilt besonders meinen Eltern für ihre durchgehende Unterstützung jeglicher Art während des Studiums und dieser Dissertation.