

**Untersuchung zur Regulation der Interferonexpression
durch das murine Interferon-induzierbare Protein
IFI203**

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

Anna Carola Hertrich
aus Saarlouis
2019

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Veit Hornung
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hölzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.12.2018

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

Für Bea und Frank in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	12
2.	Einleitung	18
2.1	Das Immunsystem - allgemeine Prinzipien	18
2.2	Das adaptive Immunsystem.....	18
2.3	Das angeborene Immunsystem	21
2.3.1	<i>Pattern recognition receptors</i> als zentrale Vermittler angeborener Immunität	22
2.3.2	PAMPs und MAMPs als Liganden der PRRs.....	22
2.3.3	Konsequenzen bei Detektion von MAMPs durch PRRs.....	24
2.3.4	DNA agiert als MAMP	25
2.3.5	Als MAMP aktiviert DNA verschiedene Signalwege des angeborenen Immunsystems.....	26
2.3.6	Interferone sind die zentralen Effektoren der von zytosolischer DNA angestoßenen Immunaktivierung.....	26
2.3.7	<i>Toll-like-Rezeptoren</i> als erste bekannte PRRs für die Erkennung bakterieller DNA	28
2.3.8	Identifikation von STING als zentraler Faktor für die DNA-abhängige Interferonantwort.....	29
2.3.9	IFI16 und DDX41 als erste vermeintliche zytosolische DNA-Rezeptoren	30

2.3.10	Die molekulare Grundlage der Induktion von Typ-I-Interferonen durch zytosolische DNA.....	31
2.3.11	<i>Interferon-stimulatory DNA</i> (ISD) triggert ebenfalls die cGAMP-Synthese durch cGAS.....	33
2.3.12	<i>Stimulator of interferon genes</i> (STING) bindet den <i>second messenger</i> cGAMP.....	33
2.3.13	STING fungiert als Sensor von zyklischem di-GMP	34
2.3.14	Weitere Sensoren zytosolischer dsDNA	35
2.4	Genomweiter siRNA-Screen zur Identifizierung weiterer Faktoren, die regulierend auf die STING-Signalkaskade einwirken.....	38
2.5	Charakterisierung von Ifi203	40
2.5.1	Die Familie der PYHIN-Proteine	41
2.6	Humane und murine PYHIN-Proteine	42
2.6.1	Zelluläre Sublokalisierung der PYHIN-Proteine.....	44
2.6.2	Orthologien zwischen den PYHIN-Proteinen unterschiedlicher Spezies.....	44
2.6.3	Zielsetzung.....	47
3.	Material und Methoden	48
3.1	Material	48
3.1.1	Geräte.....	48

3.1.2	Chemikalien	48
3.1.3	Reagenziensätze	49
3.1.4	Materialien für die Zellkultur.....	49
3.1.5	Stimuli für die <i>in vitro</i> Zellaktivierung.....	50
3.1.6	Transfektionsreagenzien.....	50
3.1.7	Medien, Puffer und Lösungen	50
3.1.7.1	Zellkultur	50
3.1.7.2	Molekularbiologie.....	51
3.1.8	Primer für Taq-PCR	51
3.1.9	Primer für die real-time-PCR.....	52
3.1.10	Antikörper.....	52
3.1.11	Zelllinien.....	52
3.2	Methoden	53
3.2.1	Zellulär-immunologische Methoden	53
3.2.1.1	Zellkulturbedingungen.....	53
3.2.1.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	53
3.2.1.3	Transfektion und Stimulation von Zellen	53

3.2.1.4	Überexpressionsexperimente	54
3.2.1.4.1	Überexpression von Ifi203 mit <i>stimulatory shRNA</i> vs. <i>non-stimulatory shRNA</i>	54
3.2.1.4.2	Überexpression zusammen mit STING bzw. STING + cdGMP-Synthetase .	54
3.2.1.5	Präparation von <i>bone marrow-derived macrophages</i> (primäre Knochenmarksmakrophagen, BMDMs)	55
3.2.1.6	Luciferase-Assay	56
3.2.1.7	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	57
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	58
3.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukleotiden	58
3.2.2.2	RNA-Extraktion und Reverse Transkription	58
3.2.2.3	DNA-Extraktion zur Genotypisierung von Mäusen.....	59
3.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	60
3.2.2.5	Funktioneller Gen-Knockdown mittels ZINKFINGER-Nukleasen	64
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	66
3.2.3.1	ELISA.....	66
3.2.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	68
3.2.4	Virologische Methoden	69

3.2.4.1	Allgemeines Prinzip der RNA-Interferenz mittels <i>small interfering</i> RNAs (siRNAs) und <i>small hairpin</i> RNAs (shRNAs).....	69
3.2.4.2	Herstellung und Konzentration lentiviraler shRNA-Vektoren.....	71
3.2.4.3	Kalzium-Phosphat-Transfektion	72
3.2.4.4	Herstellung von transduzierten Zelllinien	72
3.2.4.5	Genomweiter siRNA-Screen als effizientes Werkzeug für <i>loss of function</i> -Analysen potentieller Modulatoren des cdGMP-STING-Interferon-Signalweges.....	73
3.2.5	Statistische Analyse.....	74
4.	Ergebnisse.....	75
4.1	Charakterisierung von Ifi203	75
4.1.1	Untersuchung der zellulären Lokalisation des murinen IFI203 mittels Fluoreszenzmikroskopie	75
4.1.2	Bestimmung der Ifi203-Expression vor und nach IFN-Stimulation	76
4.2	Funktionsanalyse des Ifi203 Proteins	79
4.2.1	Untersuchungen zum Funktionsverlust von Ifi203	79
4.2.2	Die Induktion von Interferon bei Stimulation mit STING-Liganden wie zyklischem di-GMP und Doppelstrang-DNA ist abhängig von Ifi203.....	79
4.2.3	Untersuchungen der Funktion von Ifi203 anhand von Überexpressionsexperimenten	82

4.2.3.1	Bei Überexpression besitzt Ifi203 immunstimulatorische Aktivität.....	82
4.2.4	Generierung einer Ifi203-defizienten Maus	87
4.2.4.1	Auswirkungen der Mutation von Ifi203 auf die Induktion von ISGs	90
4.2.4.2	Die Mutation von Ifi203 hat keine Auswirkung auf die Interferon-bedingte Zytokinantwort.....	93
5.	Diskussion.....	95
5.1	Ifi203 scheint zu den Interferon-stimulierten Genen (ISGs) zu gehören	95
5.2	IFI203 lokalisiert im Zellkern	95
5.3	Die shRNA-bedingte Repression von Ifi203 führt zu einer deutlichen Reduktion der Interferoninduktion, unabhängig welcher Signalweg aktiviert wird	96
5.4	Überexpression von Ifi203 ist in der Lage eine Interferonantwort zu provozieren und potenziert darüber hinaus die PRR-vermittelte Interferonantwort.....	97
5.5	In dem von uns etablierten Mausmodell lässt sich keine Relevanz von Ifi203 für die Immunabwehr nachweisen	97
5.6	Offene Fragen.....	98
5.6.1	Mögliche Erklärungen für die diskrepanten Ergebnisse bezüglich Ifi203	98
5.6.2	Die von uns beobachtete Steigerung der Interferonproduktion durch Ifi203 könnte auf einen Priming-Effekt zurückzuführen sein.....	100

5.6.3	Möglicherweise bewirkt die Zinkfinger-basierte Mutation von IFI203 keinen vollständigen Funktionsverlust des Proteins	101
5.7	Obwohl IFI203 für die Interferoninduktion nach Erkennung zytosolischer DNA nicht essentiell ist, sprechen doch einige Punkte für eine Funktion des Proteins für das angeborene Immunsystem.....	102
5.7.1	Möglicherweise agiert IFI203 <i>downstream</i> der PRRs	103
5.7.2	Eventuell resultieren die divergierenden Ergebnisse aus zelltypspezifischen Unterschieden der Funktion von Ifi203	105
5.7.2.1	Beim Menschen scheint das PYHIN-Mitglied IFI16 als Cofaktor zu cGAS verstärkend auf die Aktivierung von STING und das weitere <i>downstream signaling</i> einzuwirken.....	105
5.7.2.2	Die Bedeutung von IFI16 für die Erkennung zytosolischer DNA ist in der Literatur umstritten	106
5.7.2.3	Es gibt begründeten Anhalt zur Annahme, dass Ifi203 das murine Äquivalent zu IFI16 ist	108
6.	Zusammenfassung	111
7.	Abbildungsverzeichnis	113
8.	Literaturverzeichnis.....	115
9.	Danksagung.....	127

1. Abkürzungsverzeichnis

AIM2.....	<i>absent in melanoma 2</i>
ALR.....	<i>Aim2-like receptors</i>
AMP.....	Adenosinmonophosphat
APCs.....	Antigen-präsentierende Zellen
ASC.....	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP.....	Adenosintriphosphat
BMDMs.....	<i>bone marrow-derived macrophages,</i> primäre Knochenmarksmakrophagen
BSA.....	bovines Serumalbumin
CARD.....	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
cdG.....	zyklisches di-GMP
cdGMP.....	zyklisches di-GMP
c-di-AMP.....	zyklisches di-AMP
cDNA.....	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
CDNs.....	<i>cyclic dinucleotides,</i> zyklische Dinukleotide
ChIP.....	Chromatin-Immunopräzipitation
cGAMP.....	zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat
cGAS.....	cGMP-cAMP-Synthase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG.....	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid

CTD.....	C-terminale Domäne
DAMPs.....	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DCs.....	dendritische Zellen
DD.....	<i>death domain</i>
DNA.....	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dsDNA.....	Doppelstrang-DNA
dsRNA.....	Doppelstrang-RNA
EBERs.....	<i>Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNAs</i>
EBV.....	Epstein-Barr-Virus
eGFP.....	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EIF2A.....	<i>eukaryotic translation initiation factor</i>
ELISA.....	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
ERIS.....	<i>endoplasmic reticulum interferon stimulator</i>
FCS.....	fötales Kälberserum
GFP.....	<i>green fluorescent protein</i>
GTP.....	Guanosintriphosphat
h.....	Stunde(n)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEK.....	<i>human embryonic kidney</i>

Hel-1.....	Helikasedomäne 1
Hel-2.....	Helikasedomäne 2
Hel-2i.....	Insertion in Helikasedomäne 2
HHV-8.....	Herpesvirus Typ 8
HIN-200.....	<i>hematopoietic, interferon-inducible nuclear proteins with a 200 amino acid repeat</i>
HIV.....	Humane Immundefizienz-Virus
HSV.....	Herpes simplex-Virus
Ifi.....	<i>interferon inducible</i>
Ifi16.....	<i>interferon inducible protein 16</i>
Ifi202.....	<i>interferon inducible protein 202</i>
Ifi203.....	<i>interferon inducible protein 203</i>
Ifi204.....	<i>interferon inducible protein 204</i>
IfiX.....	<i>interferon inducible protein X</i>
IFN.....	Interferon
IFNAR-1.....	<i>interferon alpha receptor 1</i>
IFNAR-2.....	<i>interferon alpha receptor 2</i>
IL.....	Interleukin
IL-1R.....	Interleukin 1-Rezeptor
iNOS.....	<i>inducible NO synthase, induzierbare NO-Synthase</i>
IRF3.....	<i>Interferon regulatory factor 3</i>

ISD.....	<i>Interferon-stimulatory DNA</i>
ISGs.....	<i>IFN-stimulated genes</i> , Interferon-induzierte Gene
ISRE.....	<i>Interferon-sensitive response element</i> , Interferon-sensibles Antwortelement
KSHV.....	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
LGP2.....	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS.....	Lipopolysaccharid
LRR.....	<i>Leucine-rich repeats</i>
LTA.....	Lipoteichonsäure
LTRs.....	<i>long terminal-repeats</i>
MAMPs.....	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MCMV.....	Maus-Cytomegalievirus
MDA5.....	melanoma differentiation factor 5
min.....	Minute(n)
MITA.....	<i>mediator of interferon regulatory factor 3 activation</i>
MNDA.....	<i>myeloid nuclear differentiation antigen</i>
MPYS.....	Methionin-Prolin-Tyrosin-Serin-Sequenz
mRNA.....	<i>messenger RNA</i>
N.....	mol/l
NF-κB.....	<i>nuclear factor kappa B</i>
NLS.....	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssequenz

NMD.....	<i>nonsense-mediated mRNA Decay</i>
NO.....	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OAS.....	Oligoadenylatsynthasen
OB.....	<i>oligonucleotide/oligosaccharide-binding</i>
PAMPs.....	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pDCs.....	plasmazytoide dendritische Zellen
PBS.....	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pIRF3.....	phosphoryliertes IRF3
PKR.....	<i>dsRNA-activated protein kinase R</i> , Proteinkinase R
POL II.....	RNA Polymerase II
POP3.....	<i>Pyrin domain only protein 3</i>
PRR.....	<i>pattern recognition receptor</i>
PYD.....	Pyrimidomäne
PYHIN(-Genfamilie).....	Pyrimin- und HIN-Domäne(-Genfamilie)
R-848.....	Resiquimod
RIG-I.....	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RISC-Komplex.....	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLRs.....	RIG-I-like-Rezeptoren

RNA.....	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi.....	RNA-Interferenz
rpm.....	<i>revolutions per minute</i>
siRNA.....	<i>small interfering RNAs</i>
SDS.....	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE.....	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA.....	<i>small hairpin RNA</i>
SLE.....	Systemischer Lupus erythematosus
SPF.....	spezifisch pathogenfrei
STING.....	<i>stimulator of interferon genes</i>
TALEN.....	TAL-Effektornukleasen
TBK1.....	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TIR.....	Toll/IL-1R
TLR.....	<i>toll like receptor</i>
TMEM173.....	<i>transmembrane protein 173</i>
VAs.....	<i>Adenovirus virus-associated RNAs</i>
ZFN.....	Zinkfinger-Nukleasen

2. Einleitung

2.1 Das Immunsystem - allgemeine Prinzipien

Der Begriff Immunität leitet sich vom lateinischen Wort „*immunis,-e*“ ab, was ursprünglich „frei/befreit von...“ bedeutet und im übertragenen Sinne „gefeit gegen“, „geschützt vor“. Das Gebiet der Immunologie befasst sich somit mit den Mechanismen, mit Hilfe derer sich ein Organismus gegen äußere Bedrohungen zur Wehr setzt. In erster Linie versteht man unter äußeren Bedrohungen Pathogene, wie Bakterien, Viren oder Parasiten. Die Effizienz des Immunsystems setzt dabei eine genaue Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ voraus. Allerdings bedeutet Immunität nicht nur Schutz vor körperfremden Molekülen oder Organismen, sondern auch vor körpereigenen pathogenen Prozessen. So bewirkt das Immunsystem nicht nur die Erkennung und Eliminierung von pathogenen Mikroben wie Bakterien, Viren und Parasiten, sondern auch von transformierten oder neoplastisch veränderten Körperzellen.

Darüber hinaus gilt es zu bedenken, dass eine überschießende Immunantwort gegenüber körpereigenen Strukturen für den Organismus ebenso fatale Folgen haben kann, wie eine ausbleibende Reaktion auf Pathogene. Demnach beruht Gesundheit auf dem Gleichgewicht zwischen Immunität und Toleranz. Um diese komplexe Aufgabe zu bewältigen, beruft sich das Immunsystem auf ein kompliziertes Netzwerk aus humoralen und zellulären Faktoren. Bei höheren Vertebraten kann grundsätzlich eine Unterteilung des Immunsystems in eine angeborene (*innate immunity*) und eine erworbene („adaptive“) Immunität vorgenommen werden. Diese beiden Komponenten des Immunsystems unterscheiden sich von einander in vielfältigen Aspekten, von denen ein ganz wesentlicher Unterschied die Moleküle darstellen, die für die Detektion von Pathogenen verantwortlich sind, wie auch die genetische Codierung dieser Moleküle.

2.2 Das adaptive Immunsystem

Das phylogenetisch jüngere System der beiden Komponenten ist die adaptive Immunität, auch erworbene Immunität genannt. Das adaptive Immunsystem ist zwar nicht primär Gegenstand dieser Arbeit, aufgrund seiner enormen Bedeutsamkeit für die Abwehr von

Krankheitserregern, welche der des angeborenen Immunsystems mindestens äquivalent ist, und die reziproken Wechselwirkungen zwischen den beiden Elementen, muss es hier allerdings auch Erwähnung finden.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem entfaltet das adaptive Immunsystem seine Wirkung antigenspezifisch. Antigene sind Bestandteile von Proteinen, Polysacchariden oder Lipiden, die in der Lage sind, eine Reaktion des adaptiven Immunsystems hervorzurufen. Das erworbene oder adaptive Immunsystem ist so konzipiert, dass es für die Konfrontation mit einer praktisch unendlich großen Zahl an Antigenen gewappnet ist.

Die Hauptakteure des adaptiven Immunsystems sind im Wesentlichen B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten reifen nach Aktivierung durch Bindung an ihr entsprechendes Antigen zu Plasmazellen heran, welche Antikörper sezernieren. Antikörper sind globuläre Proteine, welche sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, antigene Determinanten eines Pathogens zu erkennen und nicht-kovalent, aber hochaffin zu binden. Man bezeichnet sie auch als Immunglobuline.

T-Lymphozyten hingegen reifen zu verschiedenen Effektorzellen heran, die jeweils unterschiedliche Funktionen in der Immunabwehr erfüllen. Anhand ihrer Oberflächenmoleküle unterscheidet man im Wesentlichen zwei Hauptklassen, CD8 und CD4-positive T-Zellen. CD8 und CD4 dienen dabei nicht nur als Markerproteine, sondern sie sind auch von essentieller Bedeutung hinsichtlich der Zell-Zell-interaktion. CD8-T-Zellen wirken direkt zytotoxisch und sind für die Elimination virusinfizierter Zellen zuständig. CD4-T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet und umfassen mehrere Untergruppen. Im Gegensatz zu den CD8+-T-Zellen entfalten sie ihre antiinfektiöse Wirkung indirekt, indem sie beispielsweise B-Zellen zur Produktion von Antikörpern anregen. Zum anderen sind sie in der Lage die antimikrobiellen Mechanismen von Makrophagen (also Zellen des angeborenen Immunsystems) zu stimulieren. Damit fungieren sie auch als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Zwecks Antigenerkennung besitzt jede B- und jede T-Zelle einen strukturell einzigartigen Rezeptor, der jeweils für ein bestimmtes Antigen spezifisch ist. Während der Rezeptor der

B-Zellen quasi einem membrangebundenen Antikörper entspricht, ist der T-Zell-Antigenrezeptor evolutionär zwar mit den Immunglobulinen verwandt, unterscheidet sich aber in Struktur und Bindungseigenschaften. Dies resultiert in der Tatsache, dass der T-Zellrezeptor Antigenmoleküle nicht direkt bindet, sondern vielmehr Fragmente von Antigenen erkennt, welche wiederum an der Oberfläche anderer Zellen gebunden sind.

Zusammen genommen verfügen die Lymphozyten einer Population über eine enorme Vielfalt an Antigenrezeptoren. Man schätzt, dass die B-Zell-Population in der Lage ist, spezifische Rezeptoren für ungefähr 10^{15} unterschiedliche Antigene zu produzieren. Erstaunlicherweise leitet sich diese Mannigfaltigkeit von Antigen-Rezeptoren von weniger als 400 entsprechenden Genen ab (Murphy et al., 2009). Die hohe Diversität Antigen-erkennender Rezeptoren wird dabei durch einzigartige Rekombinationsprozesse ermöglicht. Der zu Grunde liegende Vorgang wird als somatische Rekombination bezeichnet. Die Proteindomänen der Antigenrezeptoren, die für die Spezifität der Antigenbindung verantwortlich sind, bezeichnet man als variable Regionen. Die vollständige Sequenz der variablen Regionen wird im menschlichen Genom nicht als Ganzes codiert, sondern separat in mehreren Teilen - in sogenannten Gensegmenten. Während der Differenzierung der Lymphozyten werden diese Gensegmente durch Genumlagerung neu kombiniert, wobei die Auswahl eines Gensegments rein zufällig geschieht. Die große Zahl möglicher Kombinationen im Rahmen der somatischen Rekombination sorgt letztendlich für die hohe Diversität der Antigenspezifität.

Durch diese enorme Vielfalt an Antigenrezeptoren erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass ein individueller Lymphozyt auf ein passendes Antigen trifft, das an seinen Rezeptor bindet und dann zu einer Aktivierung und Proliferation der Zelle führt. Dieser Prozess, auch klonale Expansion genannt, ist während einer Infektion unerlässlich, um eine effiziente Immunantwort zu etablieren. Allerdings benötigt der Prozess der klonalen Expansion in der Regel mindestens drei bis fünf Tage (Medzhitov und Janeway, 2000).

Ein weiterer „Nachteil“ besteht darin, dass diese Rekombinationsprozesse während der somatischen Entwicklung der B- und T-Zellen ablaufen und demzufolge nicht in der Keimbahn codiert sind. Dementsprechend können entstandene Rezeptoren nicht an nachfolgende Generationen weitergegeben werden, ungeachtet der Tatsache, welchen

Nutzen sie dem Organismus bringen. Sie müssen jeweils von den Nachkommen neu kreiert werden.

2.3 Das angeborene Immunsystem

Wie oben beschrieben, arbeitet das adaptive Immunsystem antigenspezifisch und zeichnet sich dementsprechend durch eine hohe Effizienz hinsichtlich der Elimination von Krankheitserregern aus. Allerdings benötigt das adaptive Immunsystem zu Gunsten des Prozesses der klonalen Expansion eine gewisse Vorlaufzeit, bis eine adäquate Immunreaktion aufgebaut werden kann. Während dieser Zeit spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Überbrückungsfunktion. Es stellt die vorderste Verteidigungslinie des Körpers gegenüber Pathogenen dar und ermöglicht eine erste und schnelle Reaktion auf mikrobielle Pathogene (Akira et al., 2006). Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle bei der Induktion und Modulierung der adaptiven Immunantwort. Das angeborene Immunsystem ist verantwortlich für die Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ und damit die Vereitelung fehlgeleiteter Immunreaktionen gegenüber dem Wirtsorganismus. Ein erster Meilenstein für das Verständnis der Wirkweise des angeborenen Immunsystems präsentierte der Immunologe Charles Janeway bereits 1989 in einem visionären Artikel, welcher im Rahmen des *Cold Spring Harbor Symposium on Immune Recognition* desselben Jahres veröffentlichte wurde. Hier begründet Janeway die sogenannte *pattern recognition*-Theorie, welche besagt, dass die Detektion von Krankheitserregern auf speziellen primitiven Rezeptoren beruht, die evolutionär konservierte Bestandteile mikrobieller Organismen erkennen (Janeway, 1989). Diese wurden von Janeway erstmals als PRRs, als *pattern recognition receptors*, bezeichnet. Laut Janeway sind diese PRRs nicht nur für den eigentlichen Infektionsnachweis verantwortlich, sondern sie spielen auch eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Damit liegt die Bedeutung von Janeways Postulat nicht nur darin, dass es das elementare Prinzip zellulärer Immunerkennung erstmalig darstellte, sondern Janeway schuf dadurch vielmehr auch die Basis für die konzeptionelle Integration der beiden Komponenten des Immunsystems höherer Wirbeltiere (Medzhitov, 2009).

2.3.1 *Pattern recognition receptors* als zentrale Vermittler angeborener Immunität

Heute ist das System der PRRs gut untersucht und zu weiten Teilen verstanden. Wie die Immunrezeptoren des adaptiven Immunsystems fungieren auch die PRRs nach dem sogenannten „Schlüssel-Schloss-Prinzip“, d.h. ein Rezeptor ist für seinen entsprechenden Liganden spezifisch. Um die Ausbreitung eingedrungener Pathogene jedoch schnellstmöglich einzudämmen, werden PRRs konstitutiv auf spezialisierten Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, welche ständig auf der Suche nach Krankheitserregern durch den Organismus patrouillieren. Zu diesen Zellen, die auch als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) bezeichnet werden, gehören unter anderem Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (Ramachandra et al., 2009). Dabei liegt im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem, dessen Rezeptorrepertoire auf somatischen Rekombinationsprozessen beruht, kein klonales Expressionsmuster vor. Vielmehr tragen unterschiedliche Subpopulationen der APCs unterschiedliche PRRs und zwar in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Funktion. Darüber hinaus exprimieren auch nicht-spezialisierte Zellen (wie Epithel- und Endothelzellen oder Fibroblasten) PRRs und können so einen Beitrag zur Immunerkennung leisten (Takeuchi und Akira, 2010).

Während das adaptive Immunsystem durch Rekombination zu einer extrem hohen Variabilität hinsichtlich seiner Antigenrezeptoren fähig ist, sind PRRs fest im Genom codiert und werden unverändert von Generation zu Generation weitergegeben. So erfolgt bei Detektion eines Pathogens durch Aktivierung des entsprechenden PRRs eine unmittelbare Immunreaktion, ohne dass vorher die Rekombination eines Rezeptors und eine Vorselektion für das entsprechende Antigen notwendig ist. Nachteil dieser Keimbahn-codierten Vererbung der PRRs ist jedoch die begrenzte Anzahl der codierten und vererbaren Rezeptoren im Vergleich zur Rezeptorvielfalt des adaptiven Immunsystems. Dafür verfügen PRRs jedoch über andere Eigenschaften, die ihnen die notwendige Effizienz im Kampf gegenüber potentiellen Schädlingen verleihen.

2.3.2 PAMPs und MAMPs als Liganden der PRRs

PRRs erkennen in der Regel spezifisch Moleküle, die nur von Fremdorganismen, jedoch nicht vom Wirt selbst gebildet werden. Man bezeichnet diese Moleküle daher auch als

PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Vance, 2009). Korrekterweise lautet die treffendere Bezeichnung für diese Moleküle jedoch MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*), da sie auch von nicht-pathogenen, symbiotischen Mikroorganismen exprimiert werden (Ablasser et al., 2013). Diese molekularen Muster können bakteriellen, viralen, parasitären oder mykotischen Ursprungs sein. Darüber hinaus sind diese MAMPs meist für den entsprechenden Mikroorganismus nicht nur charakteristisch, sondern meist auch essentiell für dessen Pathogenität bzw. für dessen Überleben. Daher zeichnen sich MAMPs auch durch eine unter phylogenetischen Gesichtspunkten hohe Mutationsstabilität aus und werden über Generationen von Mikroben hinweg konserviert. Typische MAMPs sind beispielsweise Bestandteile der Zellwand Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien, wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) (Wright et al., 1990), Lipoteichonsäure (LTA) oder Flagellin, ein wichtiger Bestandteil bakterieller Geißeln (Hayashi et al., 2001). Aber auch Nukleinsäuren wie bakterielle oder virale DNA oder RNA können unter bestimmten Umständen als MAMP fungieren.

Des Weiteren können PRRs auch durch endogene Moleküle aktiviert werden. Es handelt sich hierbei um Substanzen, die eigentlich eine physiologische Rolle innerhalb der Wirtszelle spielen und nur im Rahmen von Gewebeschäden oder Zelluntergang freigesetzt werden. Analog zu den MAMPs werden diese Moleküle als DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) bezeichnet (Bianchi, 2007). Sie dienen dem Organismus als Alarmsignal und lösen über die Aktivierung des angeborenen Immunsystems aseptische Entzündungsreaktionen aus, welche im schlechtesten Fall auch zu weiteren Gewebeschäden führen können.

Um nun für die gesamte Bandbreite mikrobieller MAMPs gewappnet zu sein, stützt sich das angeborene Immunsystem auf ein ganzes Arsenal sehr unterschiedlicher PRRs. Diese überwachen sowohl den extrazellulären Raum als auch zytosolische, endosomale oder nukleäre Kompartimente der Zelle hinsichtlich des Auftretens von MAMPs und initiieren im Falle ihrer Akkumulation eine schützende Abwehrreaktion.

2.3.3 Konsequenzen bei Detektion von MAMPs durch PRRs

Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die unmittelbare und gleichzeitig adäquate Abwehrreaktion auf Pathogene. Bei Erkennung eines MAMP durch den entsprechenden PRR kommt es meist zur einer allosterischen Konformationsänderung des PRRs, was eine darauffolgende Signalweiterleitung ermöglicht. Durch die Rekrutierung von Adaptermolekülen werden Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, die zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine führen. Ganz allgemein gesprochen sind Zytokine Botenstoffe, die, indem sie die Differenzierung und Proliferation von Zellen regulieren, die Konzentration der Immunantwort steuern. Man unterscheidet Interleukine, Interferone, kolonienstimulierende Faktoren und Tumornekrosefaktoren. Interleukine dienen zum einen der Kommunikation der Leukozyten untereinander, zum anderen lösen sie auch systemische Entzündungsreaktionen wie Fieber, Vasodilatation und gesteigerte Gefäßwandpermeabilität aus. Interferone sind vor allem in der Bekämpfung von Virusinfektionen von Bedeutung.

Durch die Ausschüttung von Zytokinen können außerdem weitere spezialisierte Zellen der angeborenen Immunität an den Ort des Geschehens rekrutiert werden. Gleichzeitig dienen manche der sezernierten Botenstoffe auch dazu, eine überschießende und für den Wirt schädliche Immunreaktion zu verhindern. Darüber hinaus sind die Zellen des angeborenen Immunsystems auch in der Lage, durch Freisetzung spezieller Zytokine sowie die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, das adaptive Immunsystem zu aktivieren. So bewirkt beispielsweise IL-6, ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin mit vielseitigem Effekt auf Immun- und Nicht-Immunzellen, unter anderem die Aktivierung und Expansion von T-Zellen sowie die Differenzierung von B-Zellen und nimmt außerdem Einfluss auf die Akute-Phase-Proteine (Hunter und Jones, 2015).

Ferner werden durch die PRR-getriggerten Signaltransduktionskaskaden auch Mechanismen aktiviert, die einen direkten, zellautonomen antimikrobiellen Effekt ausüben können. Ein Beispiel für einen zellautonomen Effektormechanismus ist z.B. Stickstoffmonoxid (=NO) (Fang, 1997). Bei NO handelt es sich um ein Radikal, welches seine antimikrobielle Wirkung entfaltet, indem es zum einen Doppelstrangbrüche in bakterieller DNA induziert und zum anderen die Synthese bakterieller DNA durch

Inhibition der Ribonukleotid-Reduktase unterbindet (Nathan und Schiloh, 2000). Durch solche Effektormechanismen wird dem infektiösen Geschehen unmittelbar Einhalt geboten.

2.3.4 DNA agiert als MAMP

Handelt es sich bei MAMPs um charakteristische mikrobielle Moleküle, die sich durch eine einzigartige, speziesspezifische Struktur auszeichnen, erfolgt die Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“ durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zuverlässig. Ein Beispiel hierfür ist das oben bereits erwähnte LPS aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Bei LPS handelt es sich um ein Glykokonjugat, welches sich aus einer hydrophoben Domäne, dem hochkonservierten Lipid A, einem semi-konservierten Kernbereich und einer variablen Zuckerkette zusammensetzt und in dieser Konformation nur bei Prokaryonten vorkommt. Im Gegensatz dazu gestaltet sich die Pathogen-Erkennung auf Basis von Nukleinsäuren deutlich komplexer.

Als zentraler Träger der Erbinformation ist DNA ein natürlicher Bestandteil jeder Zelle, allerdings ist ihr Vorkommen in eukaryotischen Zellen auf den Nukleus sowie die Mitochondrien beschränkt; sie tritt also unter normalen Umständen nicht frei im Zytosol auf (Hornung und Latz, 2010). DNA im Zytosol einer Zelle dient dementsprechend als Hinweis auf das Vorliegen einer Infektion. Das gilt sowohl für Infektionen durch Viren, als auch für bestimmte bakterielle und parasitäre Erreger wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* (Manzanillo et al., 2012), *Listeria monocytogenes* (Stetson und Medzhitov, 2006) und *Francisella tularensis* (Jones et al., 2010), sowie das Protozoon *Plasmodium falciparum* (Sharma et al., 2011).

Zusätzlich zur Rolle als „Fremd“-Signal im Laufe einer Infektion kann DNA auch als DAMP, also als endogenes Gefahrensignal dienen. Dies kann allerdings fatale Folgen haben, wie das zum Beispiel bei der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus erythematosus (SLE) der Fall ist (Ablasser et al., 2013). Ein möglicher Mechanismus der Autoimmunität beruht hier auf der fälschlichen Aktivierung des Immunsystems durch unvollständigen Abbau von DNA durch körpereigene Nukleasen.

2.3.5 Als MAMP aktiviert DNA verschiedene Signalwege des angeborenen Immunsystems

Wie oben beschrieben, führt die Aktivierung von PRRs durch MAMPs oder DAMPs zur Induktion vielfältiger Signalkaskaden, die dem Zweck dienen, die Infektion schnellstmöglich einzudämmen. Im Falle der Detektion von DNA im Zytosol werden zwei Hauptsignalwege eingeleitet: Der erste Signalweg führt zur Bildung eines sogenannten Inflammasoms (Hornung und Latz, 2010). Dabei handelt es sich um einen Proteinkomplex, der zur Aktivierung des Protease-Vorläufers Procaspase 1 führt. Die aktive Caspase 1 aktiviert im Weiteren die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 durch Spaltung der Vorläuferproteine proIL-1 β und proIL-18. Die Sekretion dieser Zytokine bewirkt sowohl eine lokale Entzündungsreaktion als auch den raschen lytischen Zelltod, der auch Pyroptose genannt wird (Schroder, 2010). Der zuständige Sensor, der bei Bindung von zytosolischer DNA die Formierung des Inflammasoms initiiert, ist *absent in melanoma 2* (AIM2). Es konnte gezeigt werden, dass AIM2 eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Viren wie dem Vaccinia-Virus und dem Maus-Cytomegalievirus (MCMV), von zytosolischen Bakterien wie *Francisella tularensis* und *Listeria monocytogenes* sowie von extrazellulären Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* (Rathinam et al., 2010; Fernandes-Alnemri et al., 2010; Tsuchiya et al., 2010) spielt.

Der zweite Signalweg führt nach Erkennung von DNA im Zytosol zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) und *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), was schließlich in der Expression von Typ-I-Interferonen, Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen resultiert.

2.3.6 Interferone sind die zentralen Effektoren der von zytosolischer DNA angestoßenen Immunaktivierung

Im Zentrum der Immunantwort, die vom angeborenen Immunsystem durch freie zytosolische DNA induziert wird, stehen Typ-I-Interferone. Interferone (IFN) sind lösliche Glykoproteine, deren Bezeichnung auf Alick Isaacs und Jean Lindenmann zurückgeht. Ihnen gelang es 1957 erstmals ein Protein zu isolieren, das von Vertebratenzellen nach

Inkubation mit Hitze-inaktiviertem Influenzavirus sezerniert wurde. Isaacs und Lindemann beobachteten, dass dieses Protein wiederum mit der viralen Replikation in infizierten Zellen „interferiert“ (Isaacs et al., 1957). Die seither beschriebenen Interferone werden gemäß Aminosäuresequenz, Chromosomenlokalisierung und Rezeptorspezifität drei verschiedenen Gruppen zugeordnet: Typ-I-Interferone, Typ-II-Interferone und *IFN-like cytokines*. Typ-I-Interferone umfassen sieben Subtypen: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- δ , IFN- ω IFN- τ und IFN- ζ (oder Limitin). Sämtliche Mitglieder dieser Gruppe übermitteln Signale durch einen Rezeptorkomplex, der aus zwei Untereinheiten besteht, namentlich IFNAR-1 (*interferon alpha receptor 1*) und IFNAR-2. Die Familie der humanen Typ-I-Interferone beinhaltet dreizehn Gene, die für verschiedene Isoformen von IFN- α codieren, ein Gen das für IFN- β codiert und zwei Gene für IFN- ω -Isoformen. Alle diese Typ-I-IFN-Gene sind auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 9 lokalisiert (Pestka et al., 2004).

Zur Induktion von Typ-I-Interferonen kommt es in Folge der Erkennung eines Pathogens durch den entsprechenden PRR. Verantwortlich sind einerseits die spezialisierten Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und dendritische Zellen (DCs). Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) produzieren vor allem IFN α . Andererseits können auch Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören, wie Fibroblasten und Epithelzellen, Typ-I-Interferone produzieren (vorrangig IFN- β) (Takaoka und Yanai, 2006).

Die Produktion von Typ-I-Interferonen induziert sowohl in der betroffenen Zelle selbst als auch in benachbarten Zellen die Expression von sogenannten ISGs (*IFN-stimulated genes*). Durch diese ISGs wird eine Vielfalt intrazellulärer Mechanismen in Gang gesetzt, die die Ausbreitung der Infektion begrenzen sollen. Beispielsweise inhibieren ISG-codierte Proteine die virale Replikation, indem sie Transkription und Translation unterbinden. Außerdem veranlassen sie den Abbau viraler Nukleinsäuren und greifen in den Lipidstoffwechsel der Zelle ein (Saka und Valdivia, 2012).

Die Zellen des angeborenen Immunsystems reagieren auf Typ-I-Interferone zusätzlich mit der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen sowie einer gesteigerten Antigenpräsentation. So werden auch die Zellen des adaptiven Immunsystems in die antiinfektiöse Immunantwort miteinbezogen. Zusätzlich wirken die

Typ-I-IFN auch direkt auf diese Zellen und verstärken beispielsweise die Antikörperproduktion durch B-Zellen (Ivashkiv und Donlin, 2014).

Dass virale Nukleinsäuren ein maßgeblicher Faktor der Induktion von Typ-I- Interferonen sind, stand also bereits kurz nach der Entdeckung der Typ-I-Interferone fest. So wurde virale dsRNA in der Folge zur Simulation viraler Infektionen *in vitro* eingesetzt (Hornung und Latz, 2010). Die Tatsache, dass auch dsDNA zu ähnlichen Immunreaktionen führt, rückte jedoch erst Mitte der 1980er Jahre ins Interesse der Immunologie, als Tokunaga et al. zeigen konnten, dass nukleinsäurehaltigen Lysate aus Mycobakterien in der Lage sind zelluläre Abwehrreaktionen zu provozieren (Tokunaga et al., 1984).

2.3.7 *Toll-like-Rezeptoren* als erste bekannte PRRs für die Erkennung bakterieller DNA

Der von Tokunaga beschriebene immunstimulatorische Effekt bakterieller DNA beruht auf einer hohen Frequenz an nicht-methylierten CpG-Dinukleotiden, welche im Genom der Vertebraten so nicht vorkommen. Wie Hemmi et al. zeigen konnten, werden diese CpG-Motive durch einen *Toll-like*-Rezeptor, TLR9, erkannt (Hemmi et al., 2000). Die Familie der *Toll-like*-Rezeptoren stellt ein phylogenetisch hochkonserviertes System an PRRs dar, deren Entdeckung das Verständnis für das Prinzip der spezifischen, PAMP-assoziierten Antigenerkennung des angeborenen Immunsystems enorm vorangebracht hat. Der Name „*toll-like*“ kommt daher, dass die Forschungsgruppe um die Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Vollhard, welche das erste bekannte Genprodukt dieser Familie als entscheidenden Faktor für die embryonale Entwicklung der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifiziert hatte, von ihrer Entdeckung so begeistert war, dass das entsprechende Gen „*toll*“ getauft wurde (Anderson et al., 1985). Später konnte gezeigt werden, dass Toll neben der Embryogenese weiterhin eine Rolle in der Abwehr von Infektionen durch Pilze bei adulten Fliegen spielt (Lemaitre et al., 1996).

Bei den TLRs handelt es sich um Typ-I-Membranproteine (was bedeutet, dass ihr N-Terminus extrazellulär an der Membranaußenseite gelegen ist), die aus drei Hauptdomänen bestehen: Eine Ektodomäne, die eine spezifische Sequenz an LRR-Motiven (*Leucine-rich repeats*) enthält, eine Transmembrandomäne und eine

intrazelluläre Domäne, die aufgrund ihrer Homologie zu der des Interleukin 1-Rezeptors (IL-1R), als Toll/IL-1R-Domäne (oder kurz: TIR-Domäne) bezeichnet wird. Die Ektodomäne ist für die Erkennung des jeweiligen PAMPs verantwortlich, wobei die Primärstruktur der LRR-Domäne eine charakteristische Hufeisenform bedingt. Die Bindung des entsprechenden Antigens durch die Ektodomäne triggert das *downstream signalling*, welches wiederum über die zytoplasmatische TIR-Domäne vermittelt wird (Bowie et al., 2000). Bis heute konnten zehn bzw. zwölf funktionale TLRs in Menschen bzw. Mäusen identifiziert werden, wobei TLR1 bis TLR9 sowohl von Maus als auch vom Mensch exprimiert werden. TLR10 ist aufgrund einer retroviralen Insertion im Genom von Mäusen nicht mehr funktionsfähig, während TLR11 bis TLR13 im menschlichen Genom nicht mehr nachweisbar sind. Die Familie der TLRs lässt sich in Abhängigkeit von ihrer subzellulären Lokalisation und den jeweilig erkannten Liganden in zwei Untergruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11, die alle an der Zelloberfläche exprimiert werden und hauptsächlich mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine oder Proteine (vgl. LPS, s.o.) erkennen. Die zweite Gruppe beinhaltet neben TLR9 noch TLR3, TLR7 und TLR8, welche ausschließlich in intrazellulär angesiedelten, vesikulären Organellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen und Endolysosomen vorkommen und dort für die Detektion mikrobieller Nukleinsäuren verantwortlich sind.

2.3.8 Identifikation von STING als zentraler Faktor für die DNA-abhängige Interferonantwort

Vor dem Hintergrund des elementaren Wirkprinzips des angeborenen Immunsystems, der Unterscheidung zwischen „fremd“ und „selbst“, erscheint die Detektion bakterieller oder viraler Nukleinsäuren, die sich durch signifikante Merkmale wie das oben beschriebene CpG-Motiv auszeichnen, unproblematisch. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten allerdings zeigen, dass auch intrinsische DNA, wenn sie im Zytosol auftritt, zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt und dass diese Aktivierung TLR-unabhängig erfolgt (Stetson et al., 2006; Ishii et al., 2006). Auch wenn es damit eine offenkundige Tatsache war, dass zytoplasmatische DNA als Immunstimulator fungiert, blieb

die Frage offen, über welchen Rezeptor die Erkennung der DNA und die anschließende Induktion von Interferon vonstattengeht.

2008 veröffentlichten Ishikawa et al. Ergebnisse, die erstmalig eine Verbindung zwischen DNA-Erkennung und dem Protein STING (*stimulator of interferon genes*) herstellten (Ishikawa et al., 2008). Bei STING, welches auch als TMEM173, MPYS, MITA oder ERIS bezeichnet wird, handelt es sich um ein Transmembranprotein mit fünf teilweise membrandurchspannenden Domänen, das am Endoplasmatischen Retikulum angesiedelt ist. Untersuchungen an STING-defizienten Mäusen demonstrierten, dass STING für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems in der Gegenwart von zytoplasmatischer DNA unentbehrlich ist. Gleichzeitig demonstrierten mehrere Arbeitsgruppen, dass STING auch für die Induktion von Interferon bei der Detektion zyklischer Dinukleotide (*cyclic dinucleotides, CDNs*) obligat ist (Jin et al., 2011; Sauer et al., 2011). CDNs sind *second messenger*-Botenstoffe, die von einer Vielzahl an Bakterienspezies produziert werden. Sie bestehen aus zwei Ribonukleotiden, die jeweils über einheitliche 3'-5'-Phosphodiestererbindungen zu einem Kreis geschlossen werden. Genauere Untersuchungen veranschaulichten, dass die Interferoninduktion durch CDNs die direkte Bindung der CDNs durch STING impliziert (Burdette et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnte weder durch funktionale noch durch strukturelle Experimente die unmittelbare Erkennung von DNA durch STING nachgewiesen werden. Vielmehr ergaben sich Hinweise darauf, dass für die Immunantwort als Reaktion auf zytosolische DNA noch weitere Faktoren, die *upstream* von STING agieren, notwendig sind (Burdette et al., 2011).

2.3.9 IFI16 und DDX41 als erste vermeintliche zytosolische DNA-Rezeptoren

Bisher wurden mehrere potentielle Sensoren zytosolischer DNA, die sich scheinbar STING zur Signaltransduktion bedienen, diskutiert. Unterholzner et al. identifizierten das Protein IFI16 aus der Familie der PYHIN-Proteine als Rezeptor für Doppelstrang-DNA (Unterholzner et al., 2010). Die Gruppe konnte zum einen zeigen, dass IFI16 DNA mit hoher Affinität bindet, und zum anderen, dass der Knockdown von IFI16 in einer kompromittierten Interferonantwort nach Stimulation mit DNA resultiert. Außerdem

demonstrierten die Untersuchungsergebnisse, dass IFI16 zwar eigentlich im Zellkern lokalisiert ist, aber nach Stimulation mit DNA ins Zytoplasma transloziert und dort mit STING und der Kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) einen Komplex bildet. Unterholzner et al. postulierten, dass diese Rekrutierung von TBK1 durch den DNA-Rezeptor IFI16 zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt, die dann wiederum in den Zellkern wandern und dort die Interferon-Genexpression aktivieren.

Zhang et al. erweiterten die Liste der PRRs um ein weiteres Mitglied, indem sie zeigten, dass DDX41, ein Mitglied der DExD/H-Helikasen-Familie, als zytosolischer DNA-Rezeptor fungiert, und dass DDX41 für den Aufbau einer Interferonantwort nach Detektion von DNA essentiell ist (Zhang et al., 2011). Ähnlich wie bei IFI16 ließ sich auch für DDX41 eine direkte Wechselwirkung mit STING nachweisen. Diese Ergebnisse begründeten somit ein Modell, in dem DDX41 DNA im Zytosol erkennt und dann eine STING-abhängige Interferonantwort auslöst.

Allerdings muss auch erwähnt werden, dass hinsichtlich der Bedeutung von IFI16 und DDX41 widersprüchliche Ergebnisse existieren und andere Arbeitsgruppen weder für IFI16 noch für DDX41 nachweisen konnten, dass ein Funktionsverlust einen Effekt auf die Interferoninduktion nach Stimulation mit DNA hat (Wu und Chen, 2014). Insofern werden in Zukunft noch weitere genetische Untersuchungen einschließlich Knockout-Maus-Modelle erforderlich sein, um die tatsächliche Bedeutung dieser Faktoren für die DNA-getriggerte Interferonantwort aufzuklären.

2.3.10 Die molekulare Grundlage der Induktion von Typ-I-Interferonen durch zytosolische DNA

2013 gelang schließlich dem Chen-Labor am *University of Texas Southwestern Medical Center* in Dallas der entscheidende Durchbruch auf der Suche nach dem universellen, sequenzunabhängigen DNA-Rezeptor. Sun et al. konnten mit Hilfe von differentieller Proteinaufreinigung, funktionellen Assays und Massenspektrometrie ein Protein identifizieren, welches sie als cGMP-cAMP-Synthase, kurz cGAS, bezeichneten. Sie konnten zeigen, dass cGAS in der Lage ist, DNA zu binden und in Anwesenheit von DNA

die Synthese des zyklischen Dinukleotids cGAMP aus GTP und ATP zu katalysieren (Sun et al., 2013).

Zusammen mit den 2'-5'-Oligoadenylatsynthasen gehört cGAS zu einer Proteinfamilie, die eine wichtige Funktion bei der Erkennung zytosolischer Nukleinsäuren einnimmt. Während cGAS ein direkter Sensor zytosolischer dsDNA ist und seine Aktivierung zur Expression von Typ-I-Interferon führt, spielen die Oligoadenylatsynthasen (OAS-Enzyme) ebenfalls eine Rolle bei der Erkennung zytosolischer dsRNA. Ihre Aktivierung führt jedoch nicht zur Expression von Typ-I-Interferonen, sondern zur indirekten Aktivierung der latenten Nuklease RNase L, die wiederum zelluläre und auch virale RNA-Moleküle degradiert. OAS1 und cGAS sind evolutionär verwandt und weisen große Gemeinsamkeiten in Bezug auf ihre räumliche Struktur auf. Zudem werden beide Moleküle sequenzunabhängig durch doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle aktiviert und beide synthetisieren einen *second messenger*, der über 2'-5'-Phosphodiesterbindungen verknüpft ist (Hornung et al., 2014). Die dsDNA-Bindung von cGAS führt zu Konformationsänderungen der Proteinstruktur, die zum einen die Formierung eines Homodimers aus zwei cGAS-Molekülen mit jeweils einem gebundenen DNA-Molekül erlauben, zum anderen aber auch die Aktivierung des katalytischen Zentrums von cGAS ermöglichen. In diesem katalytischen Zentrum wird aus GTP und ATP der zyklische Botenstoff cGAMP (cyclic GMP-AMP) gebildet (Xiao und Fitzgerald, 2013).

cGAMP ist ein kleines Molekül, das strukturelle Analogie zu den zyklischen di-Nukleotid-*second messenger*-Molekülen, wie zyklisches di-AMP (c-di-AMP) oder zyklisches di-GMP (cdGMP, cdG), aufweist (O'Neill, 2013). c-di-AMP beispielsweise fungiert gleichermaßen in Bakterien und Eukaryoten als Botenstoff. Zyklisches di-GMP hingegen ist unter Bakterien weit verbreitet und ist dort an der Koordination essentieller Vorgänge wie Wachstum, Proliferation, Ausbildung eines Biofilms und Fortbewegung beteiligt (Jenal et al., 2017). Genauere Untersuchungen haben gezeigt, dass im Gegensatz zu di-Nukleotiden bakteriellen Ursprungs, die über 3'-5'-Phosphodiester-Brücken verbunden sind, von cGAS produziertes cGAMP durch eine atypische (nicht-kanonische) 2'-5'-Phosphodiesterverbindung charakterisiert ist (Ablasser et al., 2013; Diner et al., 2013; Gao et al., 2013).

Zwischen den beiden ringbildenden Nukleotiden des endogenen cGAMPs besteht zum einen eine Phosphodiesterbrücke zwischen dem Kohlenstoffatom C2 von GMP und dem Kohlenstoffatom C5 von AMP und zum anderen eine Phosphodiesterbrücke zwischen dem Kohlenstoffatom C3 von AMP und dem Kohlenstoffatom C5 von GMP. cGAMP stellt damit eine im Metazoen-System bisher unbekannte Art von *second messenger* dar. Die Entdeckung von cGAS ist somit auch deshalb von besonderem Interesse, da cGAS den ersten bekannten PRR darstellt, der sich zur Signalweiterleitung ausschließlich eines *second messengers* bedient (Ablasser und Hornung, 2013).

2.3.11 *Interferon-stimulatory DNA* (ISD) triggert ebenfalls die cGAMP-Synthese durch cGAS

Bei der *Interferon-stimulatory DNA* handelt es sich um synthetisch hergestellte, 45 Basenpaare lange doppelsträngige DNA. Die Sequenz dieses Oligonukleotids beinhaltet Nukleotide in rein zufällig generierter Reihenfolge, zeichnet sich jedoch dadurch aus, dass sie kein zusammenhängendes CpG-Motiv enthält. Stetson und Medzhitov zeigten, dass ISD in der Lage ist, in Makrophagen sowie in dendritischen Zellen eine starke Interferonantwort zu induzieren, und dass diese Interferonantwort IRF3-abhängig, aber TLR-unabhängig geschieht (Stetson und Medzhitov, 2006). Ishikawa et al. wiesen nach, dass die von ISD ausgelöste Interferonantwort über den STING-TBK1-IRF3-Signalweg vermittelt wird (Ishikawa, 2009). Die Entdeckung von cGAS als Rezeptor für zytosolische DNA lieferte dann den zuständigen Mechanismus für die Aktivierung von STING durch ISD, welches als dsDNA ebenfalls von cGAS gebunden wird.

2.3.12 *Stimulator of interferon genes* (STING) bindet den *second messenger* cGAMP

Eingehend wurde schon berichtet, dass bereits vor der Entdeckung von cGAS bekannt war, dass STING eine essentielle und spezifische Rolle in der Erkennung zytosolischer DNA einnimmt (Ishikawa und Barber, 2008). Ferner war bekannt, dass bakterielle zyklische Dinukleotide an STING binden und dadurch aktivieren. Wu et al. konnten schließlich zeigen, dass cGAMP an das Adaptermolekül STING (*stimulator of interferon genes*)

bindet und damit eine Typ-I-Interferon Antwort induziert (Wu et al., 2013). Andere Bezeichnungen für STING sind, wie bereits erwähnt, MITA (*mediator of interferon regulatory factor 3 activation*), ERIS (*endoplasmic reticulum interferon stimulator*), TMEM173 (*transmembrane protein 173*) oder MPYS (leitet sich von der Methionin-Prolin-Tyrosin-Serin-Sequenz am N-terminalen Ende ab). Humanes und murines STING weisen eine Homologie von 68 % auf und bestehen aus 398 beziehungsweise 378 Aminosäuren. Der N-Terminus der häufigsten Transkriptvariante weist vier Transmembran-Domänen auf, die STING während des *steady state* in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankern. Der C-Terminus bildet eine globuläre Domäne und ragt ins Zytosol (Ishikawa und Barber, 2008). STING wird vorrangig in Thymus, Herz, Milz, Plazenta, Lunge und Leukozyten exprimiert, während es im Gehirn, Skelettmuskel, Dünn- und Dickdarm, Leber und Niere so gut wie nicht vorkommt (Burdette und Vance, 2013). Auf zellulärer Ebene wird es hauptsächlich in Makrophagen, T-Zellen, verschiedenen Subtypen dendritischer Zellen, Endothelzellen sowie bestimmten Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert (Ishikawa und Barber, 2008). Während des *steady state* liegt STING als Homodimer vor. Kristallisationsstudien haben gezeigt, dass dieses Homodimer eine V-förmige Bindetasche für zyklische di-Nukleotide wie cGAMP aufweist (Huang et al., 2012). Nach Aktivierung durch die Bindung an geeignete Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Translokation des Proteins vom ER bewirkt und die Interaktion mit der Kinase TBK-1 (*Tank-binding kinase 1*) erlaubt (Ishikawa et al., 2009; Sun et al., 2009). TBK-1 phosphoryliert daraufhin den Transkriptionsfaktor *IFN regulatory factor 3* (IRF3) an bestimmten Serinresten des C-Terminus. Phosphoryliertes IRF3 (pIRF3) bildet in der Folge Homodimere und transloziert in den Nukleus, wo es durch die Bindung an Promotorelemente die Expression von Typ-I-Interferon induziert (Lin et al., 2008).

2.3.13 STING fungiert als Sensor von zyklischem di-GMP

STING spielt eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Typ-I-Interferonen im Falle einer Infektion. So bedingt nicht nur das Vorkommen von dsDNA im Zytosol über die Bildung von cGAMP durch cGAS die STING-abhängige Interferonproduktion; vielmehr gibt es noch weitere Mechanismen, die zu einer Aktivierung von STING führen. Das Erstaunliche

ist hierbei, dass STING nicht nur als Adaptermolekül, sondern auch als direkter Rezeptor, also als PRR, fungieren kann. Dies ist zum Beispiel der Fall für zyklisches di-GMP, dessen molekulare Struktur in Abb. 1 dargestellt ist. cdGMP erfüllt alle Charakteristika eines PAMPs: Es handelt sich um einen bakterienspezifischen *second messenger*, der in so komplexe Prozesse wie Biofilmbildung, Expression der Virulenzfaktoren und Motilität involviert ist (Karaolis et al., 2007; Ryan, 2013). Es wird also nur vom Krankheitserreger produziert und nicht vom Wirt und ist darüber hinaus für den Krankheitserreger bzw. für dessen Virulenz essentiell.

Es konnte gezeigt werden, dass STING cdGMP direkt binden kann und diese Bindung ebenfalls zur Interaktion von STING mit TBK1 führt (Burdette und Vance, 2013). cdGMP bindet dabei innerhalb derselben Bindetasche des STING-Homodimers wie cGAMP (Huang et al., 2012).

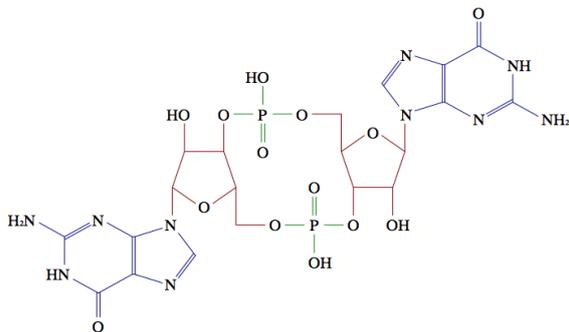


Abb. 1: Der STING-Ligand zyklisches di-GMP

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0e/C-di-GMP.svg>)

2.3.14 Weitere Sensoren zytosolischer dsDNA

Die große Bedeutung der Erkennung von DNA im Zytosol der Zelle spiegelt sich auch in der Vielfalt der Sensoren wieder.

Ein STING-unabhängiger Signalweg, der ebenfalls zu Induktion der Interferon-Expression führt, involviert die RNA-Polymerase III und den PRR *retinoic acid inducible gene I* (RIG-

l).

RIG-I gehört zu den sogenannten RIG-I-like-Helikasen oder RIG-I-like-Rezeptoren (RLRs). Neben RIG-I zählen MDA5 (*melanoma differentiation factor 5*) und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) zu dieser Familie zytosolischer Proteine. Ihnen ist eine sogenannte DExD/H-Box gemeinsam, mit deren Hilfe sie in Abhängigkeit einer ATPase dsRNA entwinden können. Diese DExD/H-Box besteht aus einer C-terminalen Domäne (CTD) und zwei Helikasedomänen (Hel-1 und Hel-2), wobei sich Hel-2 durch eine bestimmte Insertion (Hel-2i) auszeichnet. Im Falle von RIG-I und MDA5 folgt N-terminal der DExD/H-Box ein Paar aus zwei CARD-Motiven (*caspase activation and recruitment domain*). Ausgehend von verschiedenen Kristallstrukturanalysen geht man heute davon aus, dass RIG-I in Abwesenheit eines geeigneten Liganden in einem Zustand der Autoinhibierung vorliegt, indem die CARD-Domäne des unstimulierten RIG-I an Hel-2i gebunden ist. Die Bindung von RNA durch die CTD-Domäne bewirkt dann eine Konformationsänderung, welche zum einen das aktive Zentrum der Helikasedomänen freilegt als auch die CARD-Domänen für Multimerisierung und Signalweiterleitung zugänglich macht (Kolakofsky et al., 2012).

Die drei RLRs werden ubiquitär exprimiert (Schlee, 2013). Während die Funktion von LGP2 noch unklar ist, ist die Bedeutung von RIG-I und MDA5 bereits gut beschrieben. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Erkennung viraler aber auch bakterieller RNA und führen über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 und NF- κ B zur Expression von Typ-I-IFN und anderer pro-inflammatorischer Zytokine (Yoneyama et al., 2007). RNA-Liganden, die als potente RIG-I-Aktivatoren fungieren, sind dadurch charakterisiert, dass sie am 5'-Ende als „glatter“ Doppelstrang ohne Nukleotidüberhang vorliegen. Bedingung für eine effektive Bindung durch RIG-I ist außerdem, dass die RNA ein Triphosphat am 5'-Ende trägt (Schlee, 2013). Exemplarisch ist in Abb. 2 der synthetische RIG-I-Ligand IVT4 zu sehen, der die beiden oben genannten Kriterien erfüllt und daher standardmäßig als potenter RIG-I-Aktivator zum Einsatz kommt.

Trotz dieser augenscheinlichen Spezifität für RNA-Liganden gab es Hinweise, dass auch die Stimulation mit Doppelstrang-DNA zu einer RIG-I-abhängigen Interferoninduktion führt (Cheng et al., 2007). Dieser scheinbare Widerspruch ließ sich aufklären, als es zwei

unabhängigen Arbeitsgruppen gelang zu demonstrieren, dass das DNA-Heteropolymer poly(dA:dT), welches in den früheren Arbeiten als experimenteller DNA-Stimulus verwandt wurde, als Substrat der RNA-Polymerase III dient (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2009).

RNA-Polymerase III kommt in allen eukaryotischen Zellen vor, wo sie für die Transkription von Transfer-RNAs (tRNAs) sowie weiterer kleiner, nicht-codierender RNAs verantwortlich ist (Unterholzner, 2013). Ablasser et al. und Chiu et al. konnten jedoch zeigen, dass RNA Pol III auch unabhängig von dieser transkriptionellen Funktion eine Rolle in der Induktion RIG-I-abhängiger antiviraler Immunantworten spielt. So kann AT-reiche DNA unabhängig von spezifischen Promotoren durch RNA-Polymerase III in AU-RNA-Polymere umgeschrieben werden. Diese AU-Polymere zeichnen sich zum einen durch ein Triphosphat am 5'-Ende aus, zum anderen besitzen sie ein hohes Maß an Selbstkomplementarität, was dazu führt, dass sie sich zu einem Doppelstrang zusammenfalten. Diese beiden Charakteristika machen die Transkripte zu einem idealen Liganden für RIG-I (Ablasser et al., 2009).

Diese Polymerase III-abhängige Aktivierung von RIG-I ist also eine weitere Strategie des Immunsystems, um zytosolische DNA als Pathogenitätsfaktor zu detektieren. Da RIG-I und RNA Pol III ubiquitär exprimiert werden, ist dieser Signalweg vor allem für Zellen von Bedeutung, die nicht zu den spezialisierten Immunzellen gehören. Beispiele für Pathogene, deren Detektion über die RNA Pol III/RIG-I/Interferon-Achse vermittelt wird, sind Infektionen mit Epstein-Barr-Virus (EBV) und Adenovirus (Minamitani et al., 2011). Die Genome des EBV und des Adenovirus codieren jeweils für verschiedene kurze, nicht-translatierte RNAs (*Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNAs (EBERs)* beziehungsweise *Adenovirus virus-associated RNAs (VAs)*). Diese nicht-codierenden RNAs dienen dem Zweck, die interferonabhängige, antivirale Immunantwort zu inhibieren, indem sie die dsRNA-aktivierte Proteinkinase R (*dsRNA-activated protein kinase R, PKR*) blockieren. Die Proteinkinase R ist ein interferoninduziertes Gen. Doppelsträngige RNA viralen Ursprungs überführt die PKR in einen aktiven Zustand, welche daraufhin den eukaryotischen Translation-Initiationsfaktor EIF2A (*eukaryotic translation initiation factor*) phosphoryliert, was die Translation von viraler und endogener mRNA inhibiert (Sharp et al., 1993). EBERs und VAs inhibieren PKR, sodass EIF2A nicht phosphoryliert werden

und die virale Proteinsynthese ungestört ablaufen kann. Mehrere Arbeitsgruppen konnten demonstrieren, dass die von der Polymerase III transkribierten EBERs und VAs von RIG-I erkannt werden, was schließlich zur Induktion der Typ-I-Interferon-Expression führt (Ablasser et al., 2009; Minamitani et al., 2011).

A Sequenz IVT4:

pppGGGACGCUGACCCAGAAGAUCUACUAGAAUAGUAGAUCUUCUGGGUCAGCGUCCC

B

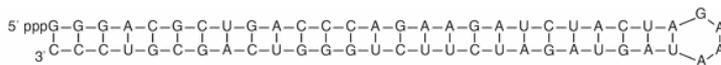


Abb. 2: Sequenz und Sekundärstruktur von IVT4

(Quelle: Goldeck et al., Enzymatic synthesis and purification of a defined RIG-I ligand. Methods Mol Biol. 2014; 1169: 15-25)

2.4 Genomweiter siRNA-Screen zur Identifizierung weiterer Faktoren, die regulierend auf die STING-Signalkaskade einwirken

Um Rezeptoren oder wichtige Modulatoren der zytosolischen Erkennung von zyklischen Dinukleotiden zu identifizieren, wurde von Andrea Ablasser ein Screen konzipiert, in dem die Induktion einer Interferonantwort durch zyklisches di-GMP im Kontext einer genomweiten Perturbation der Genexpression untersucht wurde. Der Screen basierte auf der Methode der RNA-Interferenz (RNAi), einer Form des sequenzspezifischen, posttranskriptionellen *gene silencings*. Diese Methode bietet die effiziente Möglichkeit, bestimmte Gene funktionell im Hochdurchsatzverfahren auszuschalten.

Zur Quantifizierung der resultierenden Interferoninduktion wählte man einen Reporterassay, für welches die Firefly Luciferase *downstream* eines ISRE-Promotors geschaltet wurde. Nach Induktion von Typ-I-IFN (in diesem Falle durch Stimulation mit zyklischen di-GMP) kommt es zur Expression der Luciferase, welche in Form von Lumineszenz quantifiziert werden kann, wobei somit die quantitative Änderung der Lumineszenz als Maß für die Interferonaktivität der Zelle dienen kann. In einem wellbasierten Versuchsaufbau wurden die Zellen eines Wells mit jeweils einer

spezifischen siRNA transfiziert. So kann für jedes Gen exakt bestimmt werden, in welchem Maße die siRNA-Inhibition des entsprechenden Genproduktes die Interferonantwort nach Stimulation mit cdGMP beeinträchtigt oder potenziert.

Zur besseren Übersicht wurden in Abb. 3(A) alle im Screen erfassten Gene systematisch geordnet und gemäß der Größe der Interferonaktivität nach siRNA-Inhibition aufgetragen. So ergibt sich bei einem derartig umfassenden Screen eine sigmoidale Kurve: Am Scheitelpunkt der Kurve befindet sich eine große Gruppe von Genen, deren funktioneller Knockdown keinerlei Konsequenzen für die Induktion von Interferon nach Stimulation mit cdGMP hat. Der rechte aufsteigende Schenkel des Graphen in Abb. 3(A) wird hingegen von den Genen gebildet, deren Suppression die Interferoninduktion steigert. Am linken, absteigenden Schenkel des Graphen gruppieren sich hingegen die Gene, für die der Verlust des korrespondierenden Proteins zu einer Reduktion der STING-abhängigen Interferoninduktion führt. Als Kontrollen dienten TBK1- und IRF3-spezifische siRNAs. In Abb. 3(B) sieht man eine Vergrößerung der graphischen Darstellung der siRNAs mit inhibitorischen Auswirkungen auf die Interferonaktivität. Wie zu erwarten, führt die Suppression von TBK1 und IRF3 zu einer deutlichen Reduktion der Interferonexpression. Der Screen zeigte allerdings auch, dass siRNAs, die gegen ein Gen mit Namen Ifi203 gerichtet waren, einen ähnlich starken Effekt auf die Interferonantwort wie die Kontroll-siRNAs hervorriefen. IFI203 ist Teil der PYHIN-Proteinfamilie. Da in der Literatur bereits weitere Mitglieder dieser Familie als Interferoninduktoren beschrieben worden waren (siehe unten), schien Ifi203 ein vielversprechender Kandidat mit Einfluss auf die STING-Signalkaskade zu sein. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es nun sein, die Bedeutung von Ifi203 für die STING-vermittelte Induktion von Interferon zu validieren.

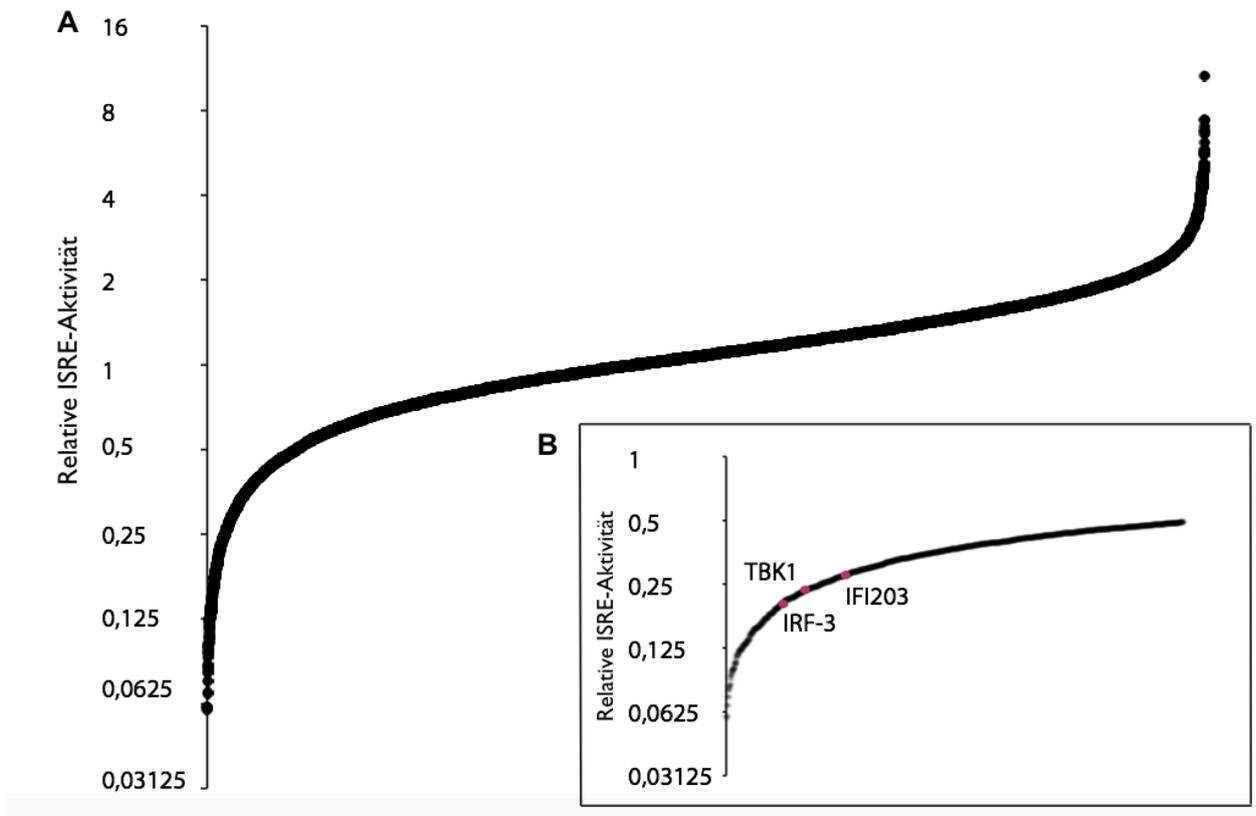


Abb. 3: Genomweiter siRNA-Screen identifiziert Ifi203 als Faktor, dessen Funktionsverlust die Interferonantwort nach Stimulation mit zyklischem di-GMP ähnlich stark inhibiert wie das Adaptermolekül TBK1 und der Transkriptionsfaktor IRF3

(A) Übersicht aller im Screen durch siRNAs erfassten Gene, geordnet nach ihrer relativen Interferonaktivität

(B) Übersicht der Gene, deren Suppression mittels siRNA eine reduzierte Interferonaktivität bewirkt. Hervorgehoben sind die Kontrollen TBK1 und IRF3, sowie der Hit Ifi203, dessen funktioneller Verlust die Interferonaktivität auf ca. ein Viertel reduziert.

(ISRE: *Interferon-sensitive response element*, kurze Nukleotidsequenz innerhalb der Promotorregion der Interferon-abhängigen Gene)

2.5 Charakterisierung von Ifi203

Ifi203 ist ein Mitglied der PYHIN-Proteinfamilie, deren Mitglieder bisher in der Literatur als Regulatoren des Zellzyklus, der Tumorsuppression und der Transkription beschrieben wurde. Neuere Erkenntnisse weisen allerdings darauf hin, dass zumindest einige Vertreter

der PYHIN-Familie als PRRs fungieren können (Connolly und Bowie, 2014). Eine Rolle bei der STING-vermittelten Induktion der Interferonexpression wurde allerdings noch nicht beschrieben.

2.5.1 Die Familie der PYHIN-Proteine

Auf der Suche nach interferoninduzierten Genen (ISGs) konnte sowohl auf dem murinen als auch auf dem humanen Chromosomenabschnitt 1q23 ein Cluster identifiziert werden, welches im Falle des murinen Genoms als Ifi200-Cluster (Ifi: *interferon inducible*) und im Falle des menschlichen Genoms als HIN-200-Cluster (HIN-200: *hematopoietic, interferon-inducible nuclear proteins with a 200 amino acid repeat*) bezeichnet wurde. Innerhalb dieser Cluster liegen Mitglieder einer gemeinsamen Genfamilie, die unter dem Oberbegriff PYHIN-Gene zusammengefasst werden. Der Begriff PYHIN trägt den gemeinsamen Charakteristika Rechnung, durch welche sich die entsprechenden Proteine definieren: Alle Mitglieder der PYHIN-Familie besitzen eine N-terminale Pyrimdomäne sowie eine bzw. zwei C-terminale HIN-Domänen (Ludlow et al., 2008). Eine Ausnahme bilden die PYHIN-Proteine p202a und p202b, die nur aus zwei HIN-Domänen bestehen, sowie das erst kürzlich identifizierte POP3 (*Pyrim domain only protein 3*), dem die HIN-Domäne komplett fehlt (Khare et al., 2014). Man zählt es zu der Gruppe der PYHIN-Proteine, zumal seine Pyrimdomäne sehr hohe Homologie mit Genen dieser Familie aufweist.

Die Pyrimdomäne (PYD), welche auch als PAAD/DAPIN-Domäne bezeichnet wird, zählt zur sogenannten *death domain*(DD)-Proteinsuperfamilie, die jeweils ein *death domain*-Motiv, eine *death domain*-Effektordomäne sowie eine *Caspase recruitment domain* (CARD) besitzen. Das DD-Motiv besteht aus sechs α -Helices und vermittelt homotypische Proteininteraktionen (Schattgen und Fitzgerald, 2011). Im Fall der PYHIN-Familie interagiert die *death domain* mit anderen PYD-enthaltenden Proteinen, um höhermolekulare Komplexe zu bilden, die bekanntermaßen an so bedeutenden Vorgängen wie Inflammation, Apoptose und Zellzyklus beteiligt sind (Park et al., 2007).

HIN-Domänen wurden bisher nur für Mitglieder der PYHIN-Familie beschrieben. Sie

umfassen ca. 200 Aminosäuren und bilden jeweils zwei *oligonucleotide/oligosaccharide-binding* (OB) Faltstrukturen (Albrecht et al., 2005). Die Kristallstruktur der HIN-Domäne zeigte, dass sich diese OB-Faltstrukturen pro HIN-Domäne in einem Tandem aus zwei fünfsträngigen β -Fass-Strukturen, welche wiederum jeweils aus ca. 80 Aminosäuren bestehen, formieren (Liao et al., 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen HIN-Domäne und DNA vorrangig auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen HIN-Domäne und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat von dsDNA beruht (Jin et al., 2012). Diese Tatsache erklärt die sequenzunabhängige Erkennung von zytosolischer DNA durch PYHIN-Proteine wie z.B. AIM2.

Anhand ihrer Aminosäuresequenz werden HIN-Domänen in drei verschiedene Kategorien eingeteilt: HIN-A, HIN-B und HIN-C (Ludlow et al., 2008). Es wird vermutet, dass die verschiedenen HIN-Domänen unterschiedliche DNA-Sequenzen oder DNA-Strukturen (einzel- oder doppelsträngige DNA) erkennen und somit eine gewisse Spezifität gegenüber verschiedenen Pathogenen besitzen. So konnten Unterholzner et al. zeigen, dass die HIN-A Domäne von IFI16 eine höhere Affinität gegenüber ssDNA aufweist, während die HIN-B-Domäne des Proteins vorzugsweise dsDNA bindet. Zusammen weisen HIN-A und HIN-B ebenfalls eine starke Affinität zu dsDNA auf (Unterholzner et al., 2010). Zur genauen funktionellen Differenzierung der verschiedenen HIN-Domänen fehlen bislang allerdings entsprechende Untersuchungen.

2.6 Humane und murine PYHIN-Proteine

Das humane HIN 200-Gencluster codiert für vier PYHIN-Proteine: AIM2 (*absent in melanoma 2*), IFI16 (*interferon inducible protein 16*), MNDA (*myeloid nuclear differentiation antigen*), IFIX (*interferon inducible protein X*). Zudem existiert ein Gen, das nur für eine Pyrin-Domäne codiert, die wiederum eine hohe Homologie zu der POP3 (*Pyrin domain only protein 3*) aufweist. Von diesen ist AIM2 der wohl am besten charakterisierte Rezeptor und die differentiellen Rollen der Pyrin- und der HIN-Domäne sind für dieses Protein gut verstanden. Es konnte gezeigt werden, dass AIM2 zytosolische DNA über die HIN-Domäne erkennt und dann über homotypische Interaktionen der Pyrimdomäne das Inflammasom-Adaptorprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like*

protein containing a CARD) rekrutiert (Hornung, 2009). ASC selber rekrutiert Procaspase 1 via seine *Caspase recruitment domain* (CARD), was schließlich in der Spaltung und Aktivierung von Caspase 1 mündet. Caspase-1 wiederum prozessiert pro-IL-1 β und pro-IL-18 in die biologisch aktiven Zytokine IL-1 β und IL-18. Zudem spaltet aktive Caspase-1 Gasdermin D, welches einen pyroptotischen Zelltod auslöst (Miao et al., 2010; Shi et al., 2015).

Im Gegensatz zum humanen HIN200-Gencluster ist das murine Ifi200 Gencluster deutlich diverser. Sequenzanalysen des Mausgenoms lieferten Hinweise, dass die murine PYHIN-Familie mindestens 13 Mitglieder umfasst (Brunette et al., 2012; Cridland et al., 2012). Bisher konnten folgende Gene identifiziert werden: p202(a/b), p203, p204, p205, p206, Pyhin1/p209, Aim2/p210, Mnda/p211 und Mndal (MNDA-like)/p212. Eine Übersicht hierzu gibt Abb. 4.

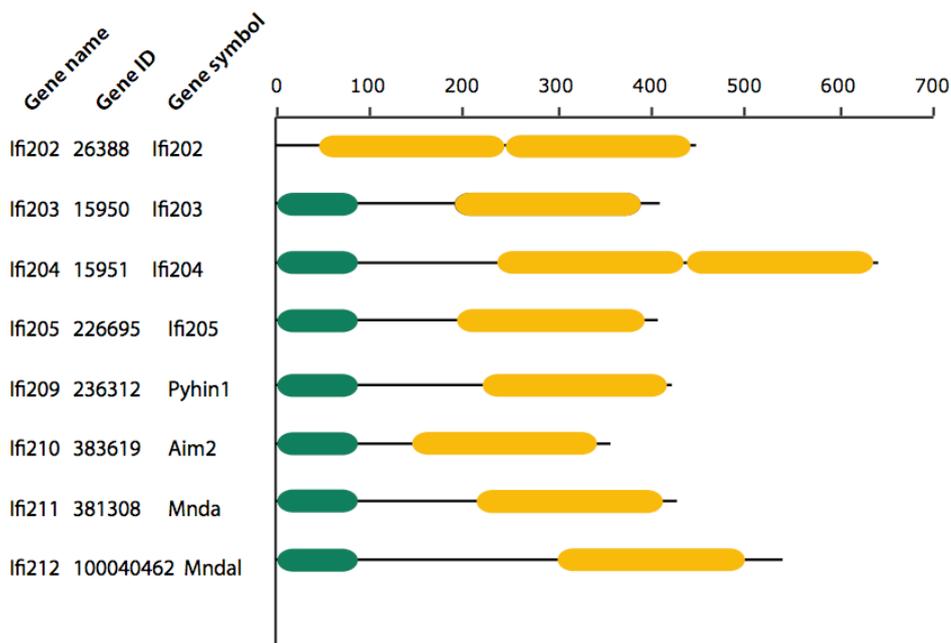


Abb. 4: Übersicht über die Mitglieder der murinen PYHIN-Proteinfamilie
Vereinfachte Darstellung der Proteindomänen im Vergleich
(Pyrin-Domänen in grün, HIN-Domänen in gelb)

2.6.1 Zelluläre Sublokalisierung der PYHIN-Proteine

Der Großteil der PYHIN-Proteine ist im Kern der Zelle lokalisiert. Zu diesem Zweck besitzen solche Proteine eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS), die die Einschleusung des Proteins in den Nukleus vermittelt. Beispiele für solche NLS sind bestimmte basische Aminosäurereste am N-Terminus der PYHIN-Proteine p203, p204, p205 und IFIX (Ludlow et al., 2004). Darüber hinaus können manche PYHIN-Proteine eindeutig bestimmten nukleären Subkompartimenten zugeordnet werden. So wurde p204 in den Nukleoli und im Nukleoplasma nachgewiesen (Choubey et al., 1992). Des Weiteren liegen Hinweise vor, dass die Lokalisation der PYHIN-Proteine durch posttranslationale Modifikationen gesteuert werden kann. Beispielsweise führt die Acetylierung der NLS von IFI16 zur Akkumulation des Proteins im Zytosol (Li T et al., 2012). Darüber hinaus wird auch angenommen, dass manche der PYHIN-Proteine Kernexportsequenzen besitzen und sie sozusagen zwischen Nukleus und Zytoplasma hin- und herpendeln (Liu et al., 2000).

Im Gegensatz dazu besitzen p202 und AIM2 keinerlei NLS und liegen in unstimulierten Zellen im Zytoplasma vor, was indirekt ihre Bedeutung für die Erkennung von zytosolischer DNA unterstreicht. Auch p206 wurde eine rein zytosolische Lokalisation zugeschrieben (Ludlow et al., 2008).

Bisher ist es noch nicht gelungen, die funktionelle Bedeutung der nukleären Lokalisation der PYHIN-Proteine zu entschlüsseln. Eine Hypothese ist, dass die PYHIN-Proteine an der Modulation von Transkriptionsprozessen beteiligt sind. Sollte sich dies bewahrheiten, wäre die nukleäre Lokalisation der PYHIN-Proteine von essentieller Bedeutung für ihre biologische Funktion (Ludlow et al., 2005).

2.6.2 Orthologien zwischen den PYHIN-Proteinen unterschiedlicher Spezies

Das PYHIN-Gencluster unterscheidet sich erheblich hinsichtlich seiner Größe als auch hinsichtlich der genetischen Sequenz zwischen den verschiedenen Säugetierarten. Diese Diversität ist dabei auf Duplikationen und Deletionen innerhalb der entsprechenden Abstammungslinie zurückzuführen. Während das PYHIN-Gencluster der Maus für 13 verschiedene Proteine codiert, besitzt das des Pferds nur sechs, Ratten und Menschen

jeweils vier PYHIN-Gene. Das Genom von Hund und Schwein weist nur zwei PYHIN-Gene auf, während Kühe nur ein einziges PYHIN-Gen besitzen (Brunette et al., 2012; Cridland et al., 2012). Stammbaumanalysen der PYHIN-Proteine, wie sie z.B. in Abb. 5 zu sehen sind, offenbaren weiterhin eine bemerkenswerte evolutionäre Diversität über verschiedene Spezies hinweg. So findet man nur wenige Orthologien zwischen den PYHIN-Genen unterschiedlicher Spezies, selbst wenn es sich um so nah verwandte Gattungen wie Maus und Ratte handelt. Eine Ausnahme stellt AIM2 dar, von dem homologe Entsprechungen im Genom von Mensch, Maus, Ratte und Pferd existieren (Brunette et al., 2012; Cridland et al., 2012). Die Proteindomänen der PYHIN-Gene innerhalb einer Spezies sind daher einander oft ähnlicher als den orthologen PYHIN-Genen anderer Spezies. Phylogenetische Untersuchungen demonstrieren, dass diese Tatsache vorrangig von zahlreichen Genkonversionen oder Genduplikationen innerhalb einer Spezies resultiert (s. Abb. 5). Die Vielzahl an artspezifischen Genexpansionen spricht für eine enorme Plastizität des PYHIN-Genclusters und weist zusätzlich auf artspezifische Spezialisierungen der einzelnen PYHIN-Proteine hin. Sie ist vermutlich Ausdruck des hohen Adaptionsdrucks, dem das Immunsystem der jeweiligen Spezies ausgesetzt ist.

Die enorme Diversität der PYHIN-Gene erschwert die Identifikation von Orthologien zwischen humanem und murinem Genom und somit die Etablierung von aussagekräftigen Mausmodellen, die wichtig für die Charakterisierung der Proteine wären. Bisher konnten phylogenetische Untersuchungen der Pyrin- und HIN-Domänen bestätigen, dass das menschliche und murine AIM2 ortholog zueinander sind (Brunette et al., 2012; Cridland et al., 2012). Für alle anderen humanen PYHIN-Mitglieder konnten kein direktes Maus-Ortholog charakterisiert werden. Gleiches gilt für das murine Ifi203. Dennoch ist auf Grund der gemeinsamen Herkunft auch von Parallelen zwischen den PYHIN-Proteinen unterschiedlicher Spezies auszugehen, sodass die Untersuchung von Ifi203 auch genauere Einblicke in die Funktion der humanen PYHIN-Proteine liefern kann.

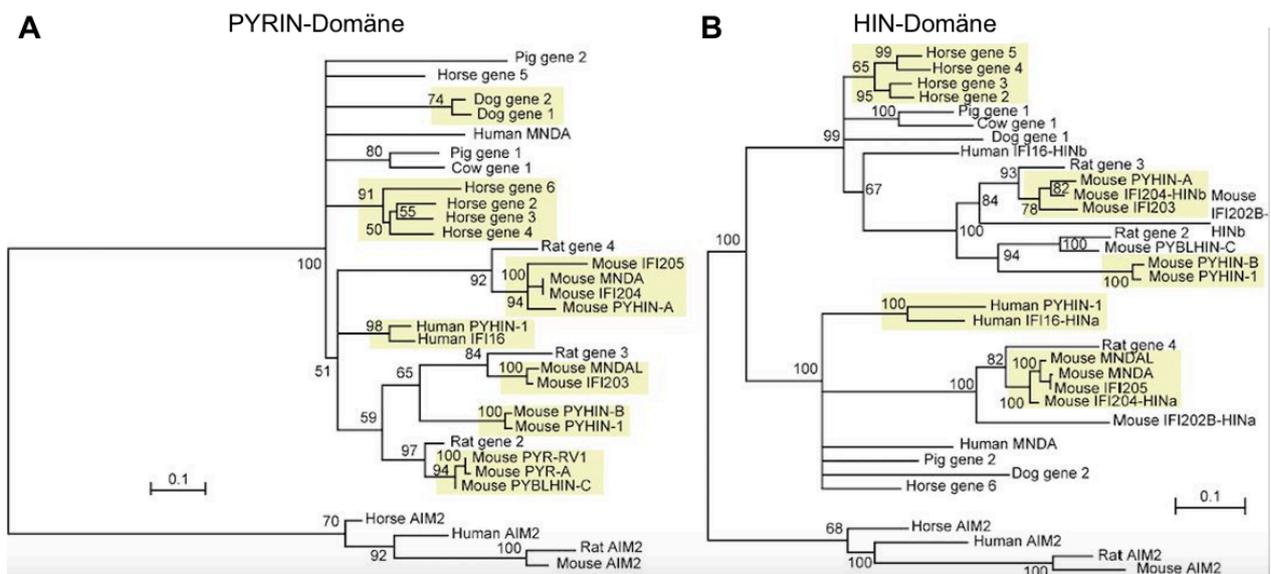


Abb. 5: Phylogenetische Entwicklung der PYHIN-Familie

(Quelle: Brunette et al., Extensive evolutionary and functional diversity among mammalian AIM2-like receptors. J Exp Med 2012; 209: 1969-1983)

(A) Phylogenetischer Stammbaum der PYHIN-Proteine nach ihrer PYRIN-Domäne

(B) Phylogenetischer Stammbaum der PYHIN-Proteine nach ihrer HIN-Domäne

Die Wissenschaft der Phylogenetik beschäftigt sich mit der Rekonstruktion von evolutionären Stammbäumen aus unterscheidbaren Merkmalen (z. Bsp. DNA-Sequenzen). Sie dient der Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen zwischen Genen. Arten, die einander ähneln, sind in einem solchen Stammbaum näher beieinander angeordnet, als Arten, die sich voneinander unterscheiden. Verzweigungen der Äste repräsentieren dabei jeweils evolutionäre Ereignisse wie Genmutationen, Genduplikationen bis hin zu Speziationen. Die Achsenlänge repräsentiert meist die geschätzte Zeit, in der sich die Arten separiert haben, oder die Anzahl der Mutationen während dieser Entwicklung (https://de.wikipedia.org/wiki/Phylogenetischer_Baum).

In den hier gezeigten Stammbäumen stehen ganz rechts Sequenzen von Proteindomänen, keine Spezies. Die Achsenlänge entspricht dabei der relativen Anzahl an Substitutionen pro Nukleotid. Art-spezifische Genexpansionen sind gelb hinterlegt. An jedem Knotenpunkt ist der zugehörige *Bootstrap value* angegeben, berechnet als Prozent aus 1000 Versuchen. (Zur Erklärung: Beim *Bootstrapping* handelt es sich um ein statistisches Verfahren, welches misst, wie stark die einzelnen Verzweigungen auf der Grundlage des vorliegenden Datensatzes abgesichert sind.)

2.6.3 Zielsetzung

Die Effizienz des angeborenen Immunsystems beruht auf der präzisen Detektion mikrobieller Pathogene durch spezifische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Diese sogenannten PRRs registrieren die Anwesenheit von Krankheitserregern anhand bestimmter molekularer Strukturen, die als MAMPS bezeichnet werden. Durch Bindung eines MAMP durch den entsprechenden Rezeptor werden in der Zelle des angeborenen Immunsystems konsekutiv bestimmte Signalwege getriggert, welche schließlich in einer protektiven Zytokinantwort münden.

In Anbetracht der überwältigenden Komplexität der PRR-vermittelten Immunabwehr schien ein systematische, gesamtgenomische Herangehensweise erfolgsversprechend. So wurde ein genomweiter RNAi-Screen konzipiert, dessen Ziel es war, die molekularen Grundlagen der Induktion der Typ-I-Interferon-Gene aufzuklären. Dank dieser Strategie konnten wir das murine Protein IFI203 als funktionelle Komponente der Erkennung zyklischer Dinukleotide identifizieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es somit sein, die Regulation der Interferoninduktion durch IFI203 im Falle einer Pathogeninvasion präzise zu untersuchen. Konkret sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- (1) Welche Eigenschaften zeichnen IFI203 als Interferon-induzierbares Protein aus?
- (2) Welchen Stellenwert hat IFI203 für die PRR-vermittelte Interferoninduktion in Anwesenheit verschiedener mikrobieller Pathogene? Ist IFI203 ein essentieller Bestandteil der Signalkaskade, die zur Induktion von Interferon führt?
- (3) Nimmt IFI203 spezifisch Einfluss auf die cdG-STING-Interferonachse oder lässt sich auch für andere PRRs eine IFI203-abhängige Modifikation der Interferonantwort demonstrieren?
- (4) Lässt sich die Relevanz von IFI203 für die antimikrobielle Immunantwort auch *in vivo* nachweisen?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

<u>Verwendete Geräte</u>	<u>Herstellerangaben</u>
ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System	Fa. Applied Biosystems (Forster City, CA, USA)
Analysewaage TE 601	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav Vx-150	Fa. Systec (Wettenberg)
Eismaschine AF-20	Scotsman Ice Systems (Mailand, Italien)
ELISA-Reader Apollo LB912	Berthold (Bergisch Gladbach)
2104 EnVision® Multilabel Reader	Fa. PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Gefrierschrank (-80 °C)	Fa. Hettich (Tuttlingen)
Gefrierschrank (-20 °C)	Fa. AEG-Elektrolux (Nürnberg)
Heizschüttler Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Kolbenhubpipetten Pipet Lite	Fa. Rainin Mettler Toledo (Gießen)
Kühlschrank (4 °C)	Fa. Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
LC480 Lightcycler	Fa. Roche (Mannheim)
Mikroskop Eclipse TS100	Fa. Nikon (Düsseldorf)
Mr. Frosty® Cryo 1 °C Freezing Container	Fa. Nalgene (Roskilde, Denmark)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Fa. Integra Biosciences (Fernwald)
QIAcube	Fa. Qiagen (Hilden)
Reinstwasseranlage Purelab Classic	Fa. ELGA (Celle)
Sterilbank MSC-Advantage	Fa. Thermo Scientific (Bonn)
Spektralphotometer NanoDrop ND-1000	Fa. Peqlab (Erlangen)
Thermalcycler FlexCycler	Fa. Analytik Jena (Jena)
Ultrazentrifuge Beckman Coulter L-80	Fa. Beckman Coulter (Krefeld)
Vertikales Blotting System	Fa. BioRad (München)
Wasserbad Julabo TW 20	Fa. Julabo (Seelbach)
Western-Blot Entwickler CAWOMAT 2000 IR	Fa. CAWO (Schrobenhausen)
Zählkammer nach Neubauer	Fa. Brand (Wertheim)
Zellkulturinkubator Heracell 240/Herasafe KS-15	Fa. Heraeus Instruments (Hanau)
Zentrifugen 5415 R /5810 R	Fa. Eppendorf (Hamburg)

3.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die benutzten Chemikalien bei AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim),

Braun (Melsungen), Fermentas (St. Leon-Roth) und der Biochrom AG (Berlin) bezogen. Die Lösungen wurden je nach Herstellerangaben mit Millipore-Wasser, Ethanol oder DMSO angesetzt.

3.1.3 Reagenziensätze

- RNA-Isolation, reverse Transkription und PCR

<u>Verwendete Reagenzien</u>	<u>Herstellerangaben</u>
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fa. Fermentas (St. Leon-Rot)
EvaGreen® QPCR-Mix II (ROX)	Fa. Bio-Budget Technologies (Krefeld)

- Bestimmung von Zytokinen mittels der ELISA-Methode

<u>Verwendete Kits/Zubehör</u>	<u>Herstellerangaben</u>
IP-10 ELISA, murin	Fa. R&D Systems (Wiesbaden)
Costar ELISA-Platten	Fa. Biomedical Diagnostic (Marnes Valeé, Frankreich)

3.1.4 Materialien für die Zellkultur

<u>Verwendete Materialien</u>	<u>Herstellerangaben</u>
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Fetal Calf Serum (FCS)	Fa. Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Ciprofloxacin	Fa. Bayer Schering Pharma (Leverkusen)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fa. Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
L-Glutamin	Fa. Biochrom, Berlin
β-Mercaptoethanol	Fa. PAN-Biotech, Aidenbach
Natriumpyruvat	Fa. Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Penicillin Streptomycin (PenStrep)	Fa. Biochrom, Berlin
Phosphate-buffered saline (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Falcon (Heidelberg), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

3.1.5 Stimuli für die *in vitro* Zellaktivierung

Verwendete Stimuli

10-Carboxymethyl-9-acridanone (CMA)
 Cyclic di-AMP
 Cyclic di-GMP, cdGMP
 DNA-Oligonukleotide analog zu ISD
 HSV1(17+)LOX-PMCMVGFP

Herstellerangaben

Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim)
 Fa. BioLog (Bremen)
 Fa. BioLog (Bremen)
 Fa. Metabion (Planegg-Martinsried)
 Beate Sodeik, Medizinische Hochschule
 Hannover

3.1.6 Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenzien

GeneJuice® Transfection Reagent
 Lipofectamine 2000

Herstellerangaben

Fa. Novagen (Darmstadt)
 Fa. Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

3.1.7.1 Zellkultur

- Kalzium-Phosphat-Transfektion

2,5 M CaCl₂:

13,5 g Kalziumchlorid
 20 ml Wasser
 Sterilfiltrieren

2x HBS:

13 g/l (w/v) HEPES
 16 g/l (w/v) NaCl
 0,4 g/l Na₂HPO₄
 pH 7,0

3.1.7.2 Molekularbiologie

- SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

	<u>Trenngel (10 %)</u>	<u>Sammelgel (5 %)</u>
Acrylamid 30 %	2,68 ml	0,68 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,52 ml
10 % SDS	80 µl	40 µl
H ₂ O (destilliert)	3,16 ml	2,72 ml
10 % APS	80 µl	40 µl
TEMED	8 µl	4 µl

- 5x Lämmli-Ladepuffer

10 % SDS
 125 mM TrisHCl pH 6,8
 50 % Glyzerin
 4 % Dithioerythrit (DTE)
 0,05 % Bromphenolblau

- *Western Blot*

<u>10x SDSLaufpuffer</u>	<u>10x Tris-Glycin</u>	<u>1x Transferpuffer</u>
29 g Tris	29 g Tris	100 ml 10x Tris-Glycine
144 g Glycin	144 g Glycin	200 ml Ethanol (vergällt)
10 g SDS	- auf 1 Liter auffüllen	700 ml H ₂ O
- auf 1 Liter auffüllen		

- DNA-Isolierung und Genotypisierung

Lyse-Puffer
 20 mM Tris-Cl (pH 8,0)
 5 mM EDTA (pH 8,0)
 400 mM NaCl
 1 % SDS

3.1.8 Primer für Taq-PCR

ZFN fwd: TGAGAGATGATGGCTGAATACG

ZFN rev: ACACAATGGATATGGGGCAT

3.1.9 Primer für die real-time-PCR

IFN β fwd: ATAAGCAGCTCCAGCTCCAAIFN β rev: CTGTCTGCTGGTGGAGTTCA

mmHPRT fwd: CTGGTGAAAAGGACCTCTCG

mmHPRT rev: TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCA

Ifi203 fwd: CCTGTGTGTCCGATGTGAAC

Ifi203 rev: CACCTGACATTGGTGAGTCG

3.1.10 Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Herkunft</u>
anti- β Aktin-IgG- <i>horseradish-peroxidase</i> (HRP)	anti- β Aktin	Fa. Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Goat Anti-interferon-activable protein 203 (mouse isoform 1) Antibody	iFi203 (Mouse)	Fa. Everest Biotech Ltd. (Upper Heyford, Oxfordshire, UK)

3.1.11 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Kulturmedium</u>
HEK 293T (humane embryonale Nierenzellen)	DMEM + 10 % FCS + Natriumpyruvat + 10 μ g/ml Ciprofloxacin
J774-Makrophagen	DMEM + 10 % FCS + Natriumpyruvat + 10 μ g/ml Ciprofloxacin
L929-Fibroblasten	DMEM + 10 % FCS + Natriumpyruvat + 10 μ g/ml Ciprofloxacin
BMDMs (Primärmakrophagen)	DMEM-Medium + 30 % L929-Überstand

3.2 Methoden

3.2.1 Zellulär-immunologische Methoden

3.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5 % CO₂ in der Atmosphäre vorgenommen. Sämtliche Experimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit einem Laminar-Air-Flow-System durchgeführt.

3.2.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Quantifizierung von Zellen wurde eine Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Tote Zellen lassen sich mit Trypanblaulösung anfärben und sich so von vitalen Zellen differenzieren. Je nach erwarteter Zelldichte wurden die Zellen 1:10 – 1:100 in 0,01 % Trypanblaulösung verdünnt und die nicht blauen Zellen in den vier Großquadraten gezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich durch Multiplikation von gezählter Zellzahl (Durchschnitt pro Großquadrat) x Verdünnung x Kammerfaktor. Der Kammerfaktor der Neubauer Zählkammer entspricht 4×10^4 .

3.2.1.3 Transfektion und Stimulation von Zellen

Für die Transfektionsexperimente wurden die Zellen in folgender Dichte ausgesät: HEK 293T-Zellen: $0,33 \times 10^6$ /ml, J774-Makrophagen: 1×10^6 /ml, BMDMs: 1×10^6 /ml und bei ausreichender Adhärenz mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben transfiziert. cdGMP wurde in einer finalen Konzentration von 2 µg/ml, IVT4 und ISD in einer finalen Konzentration von 1,33 µg/ml, LPS in 100 ng/ml Endkonzentration, R848 in 1 µg/ml Endkonzentration transfiziert. Hierzu wurden zunächst 200 ng RNA o.ä. in 0,25 µl Opti-MEM (GIBCO BRL, Eggenstein) vorgelegt und parallel 0,5 µl Lipofectamine in 0,25 µl Opti-MEM für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Reaktionsansätze vermengt und die Mischung für weitere 20 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Im Abschluss der Zeit wurden die Lipokomplexe zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank weiterkultiviert. Für die Zytokinassays wurde der Überstand nach 18-20 h geerntet. Für die Westernblots wurden die Zellen nach 3 h lysiert. Zur Untersuchung der Ifi-mRNA-Expression im zeitlichen Verlauf wurden die Zellen entsprechend der angegebenen Zeitpunkte (nach 0, 2, 4, 6, 8 Stunden) in RLT-Buffer lysiert.

3.2.1.4 Überexpressionsexperimente

3.2.1.4.1 Überexpression von Ifi203 mit *stimulatory shRNA* vs. *non-stimulatory shRNA*

HEK 293T-Zellen wurden in einer Dichte von $0,33 \times 10^6/\text{ml}$ im 96-well-Format ausplattiert. Bei suffizienter Adhärenz der Zellen wurden pro 96-well 175 ng, 87,5 ng und 43,75 ng Ifi-Expressionsplasmid sowie zusätzlich 25 ng pIFN β -GLuc-Reporterplasmid transfiziert. Als Füllplasmid verwendeten wir GFP. Nach 36 h wurde die Interferon-induktion im Luciferase-Assay gemessen. In der zweiten Variante wurden HEK 293T-Zellen in einer Dichte von $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ im 96-well-Format ausplattiert und nach Adhäsion mit 100 ng und 50 ng Ifi-Expressionsplasmid transfiziert. Als Füllplasmid wurde erneut GFP verwendet. 24 h später wurden pro 96-well 25 ng pIFN β -GLucReporterplasmid plus 20 ng bzw. 10 ng *stimulatory shRNA* mittels Lipofektion durch Lipofectamine 2000 (invitrogen, Karlsruhe) in die Zellen eingebracht. Als Füllplasmid wurde *non-stimulatory shRNA* eingesetzt. Zur Kontrolle wurde zusammen mit 25 ng pIFN β -GLuc-Reporterplasmid 175 ng *non-stimulatory shRNA* lipofiziert. Der Luciferase-read out erfolgte weitere 36 h später.

3.2.1.4.2 Überexpression zusammen mit STING bzw. STING + cdGMP-Synthetase

HEK 293T-Zellen wurden in einer Dichte von $0,33 \times 10^6/\text{ml}$ im 96-well-Format aus-plattiert. Im selben Reaktionsansatz wurden pro 96-well 25ng pIFN β -GLuc-Reporter plus 25 ng STING-Expressionsplasmid sowie 50 ng und 25 ng Ifi203- respektive Ifi204-

Expressionsplasmid in die Zellen transfiziert. Als Füllplasmid und als Negativkontrolle diente eGFP. Die Auslesung des Luciferase-Assays erfolgte 36 h später.

Für die Experimente, in denen parallel zu STING auch noch eine cdGMP-Synthetase transfiziert wurde, wurden HEK 293T-Zellen am ersten Tag in einer Dichte von $0,22 \times 10^6$ /ml im 96-well-Format ausplattiert. In die adhärenenten Zellen wurden schließlich jeweils 200 ng bzw. 100 ng Ifi203 oder Ifi204 transfiziert. Als Füllplasmid sowie als Negativkontrolle diente eGFP. 24 h später wurden pro 96-well 25 ng pIFN β -GLuc-Reporterplasmid sowie 12,5 ng STING und 12,5 ng cdGMP-Synthetase transfiziert. Nach 36 h wurde die Reporteraktivität im Luciferase-Assay bestimmt.

3.2.1.5 Präparation von *bone marrow-derived macrophages* (primäre Knochenmarksmakrophagen, BMDMs)

Zur Gewinnung von murinen Knochenmarksmakrophagen wurden 7-8 Wochen alte Mäuse, die unter SPF-Bedingungen („spezifisch pathogenfrei“) gehalten worden waren, durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Femur und Tibia freigelegt, entnommen und in sterilen Petrischalen mittels Sezierbesteck gesäubert. Zur Desinfektion wurden die Knochen für eine Minute in 70 %-igem Ethanol eingelegt und anschließend mit PBS gewaschen. Mit Hilfe einer Schere wurden die Knochen dann eröffnet und das Knochenmark mit PBS ausgespült. Dieses wurde im Anschluss mit einem Spritzenkolben durch ein Zellsieb (\emptyset 70 μ m, BD Falcon Cell Strainers, Fa. BD Biosciences, San Diego, CA, USA) gerieben. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 400 g für 5-10 min zentrifugiert. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde das erhaltene Zellpellet in 2 ml Erylyse-Puffer (BD PharmLyse, Fa. BD Biosciences, San Diego, CA, USA) resuspendiert. Nach Inkubation für 1-2 min wurde die Lysereaktion mit PBS abgestoppt und die Zellsuspension erneut bei 400 g für 5-10 min zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde anschließend in 10 ml DMEM-Medium resuspendiert. Um eine homogene Population reifer Makrophagen zu erhalten, wurden die Zellen bei 37 °C / 5 % CO $_2$ / 95 % Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen) in DMEM-Medium mit einem 30%igen Anteil an L929-Überstand kultiviert. Der Überstand von L292-Zellen enthält Wachstumsfaktoren, welche die Differenzierung der Knochenmarkszellen in

Makrophagen bewirkt. Je nach Zelldichte wurde am dritten oder vierten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen. Optimalerweise sollten die Zellen am sechsten Tag ausreichend konfluent sein, um einem Experiment zugeführt zu werden.

3.2.1.6 Luciferase-Assay

Ziel des Luciferase-Assays war es, die IFN β -Produktion in Zellen nach Aktivierung mit verschiedenen Stimuli zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines IFN β -Promotors in die Zellen eingebracht. Dies hat zur Folge, dass bei Induktion von Interferon nun Luciferase transkribiert wird. Luciferasen sind Enzyme, die Reaktionen katalysieren, in denen Lichtsignale freigesetzt werden. Diese Lumineszenz können wir messen und sie dient uns als Maß für die Interferonaktivität der Zelle. In Abb. 6 ist schematisch die von der Luciferase katalysierte Reaktion abgebildet.

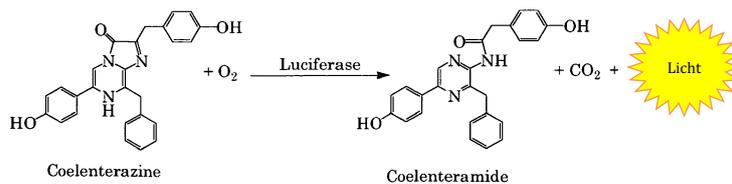


Abb. 6: Von der Luciferase katalysierte Reaktion

In unserem Falle wurde das Luciferase-Assay in HEK 293T-Zellen durchgeführt. Das verwendete Reporterplasmid pIFN β -GLuc codiert für die Gaussia-Luciferase. Die Gaussia-Luciferase setzt in Anwesenheit von O₂ Coelenterazine zu Coelenteramide und CO₂ um, wobei es ebenfalls zu einer messbaren Lichtreaktion kommt. Gleichzeitig zeichnet sich die Gaussia-Luciferase dadurch aus, dass sie sezerniert wird; das bedeutet, dass ihre Aktivität im Überstand der Zellen gemessen werden kann. 36 h nach Stimulation wurden 25 μ l Zellüberstand in weiße 96-well-Platten überführt. Je nach erwarteter Signalstärke wurde die Coelenterazin-Stocklösung (1 mg/ml) 1:2000-1:10000 verdünnt und 25 μ l zu den Proben gegeben. Das Auslesen erfolgte im Multilabel Reader von Perkin Elmer.

3.2.1.7 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine gängige Methode, mit der zu untersuchende Strukturen innerhalb der Zelle oder an der Zelloberfläche sichtbar gemacht werden können. Sie basiert im Wesentlichen auf der Markierung von Proteinen durch Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorochrome. Fluorochrome zeichnen sich durch ihre Eigenschaft aus, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und mit veränderter Wellenlänge wieder abzugeben. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird Licht aus einer geeigneten Lichtquelle zunächst durch einen Anregungsfilter gesandt, der die benötigte Anregungswellenlänge herausfiltert. Das kurzwelligere Anregungslicht fällt durch das Objektiv, das den Lichtstrahl konzentriert, auf das Zellpräparat. Die sich im Präparat befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe werden angeregt und gehen in einen energetisch höheren Zustand über. Unter Emission eines Photons fallen die Moleküle dann wieder in den Grundzustand zurück. Das dabei freiwerdende Licht ist energieärmer und daher langwelliger. Diese Wellenlängenverschiebung zwischen Absorptions- und Emissionslicht wird nach ihrem Entdecker als *Stokes Shift* bezeichnet. Das Emissionslicht wird durch einen Farbteiler vom Anregungslicht getrennt und in das Okular des Mikroskops weitergeleitet, wo es über eine Fotokamera oder einen Photomultiplier detektiert werden kann. Bei Mehrfachfärbungen können die verschiedenfarbigen Fluorochrome nacheinander beleuchtet werden. Ein internes Berechnungsprogramm fusioniert dann die einzelnen Aufnahmen zu einem Gesamtbild. Der erste Fluoreszenzfarbstoff, den sich die Wissenschaft zu Nutzen machte, war GFP. GFP steht für *green fluorescent protein*. Dieses aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende, grün fluoreszierende Protein wurde 1961 von Osamu Shimomura beschrieben (Shimomura, 2005). Bei Anregung mit blauem (oder UV-)Licht fluoresziert dieses Protein grün. Das Gen für GFP kann an das Gen eines anderen Proteins fusioniert werden. Zellen, in die diese rekombinante DNA eingeschleust wurde, synthetisieren das entsprechende Fusionsprotein. So ist es möglich, die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins anhand der grünen Fluoreszenz zu detektieren.

In unserem Fall wurden HEK 293T-Zellen in einer Dichte von $0,33 \times 10^6/\text{ml}$ im 96-well-Format ausplattiert. Nach 12 h wurden die Zellen bei ausreichender Adhärenz mit 200 ng eines GFP-markierten Ifi203-Expressionsplasmids bzw. mit 200 ng GFP-markiertem Ifi202-Plasmid transfiziert. Nach 8-10 h bei 37°C wurden die lebenden Zellen unter einem Axio Observer.Z1-Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit einem $\times 20$ LD-Objektiv (*long distance*) betrachtet. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Zellen 30 min vor der Aufnahme mit Hoechst 34580 (Invitrogen, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 10 mg/ml inkubiert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukleotiden

Die Konzentration von RNA, DNA und Oligonukleotiden wurde photometrisch unter Verwendung eines Spektrometers bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bestimmt.

3.2.2.2 RNA-Extraktion und Reverse Transkription

Um über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden zu können, muss RNA zunächst revers transkribiert und in einen cDNA-Einzelstrang (*copy-DNA*) umgeschrieben werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die gesamte RNA aus Zielzellen extrahiert. Dafür wurden bis 5×10^6 Zellen in 350 μl RLT-Puffer (Quiagen) aufgenommen, resuspendiert und für mindestens 30 min bei -80°C eingefroren. Die Aufreinigung der RNA erfolgte vollautomatisiert in einem QIAcube (Fa. Quiagen, Hilden) unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Quiagen).

Im Anschluss wurde ein DNaseI-Verdau (Fermentas) durchgeführt, um kontaminierende DNA-Fragmente aus dem gewonnenen RNA-Eluat zu entfernen. Gemäß Herstellerangaben wurden 1 μg RNA mit 1 U DNaseI sowie 1 μl 10xReaction Buffer und 0,25 μl RiboLock (RNase Inhibitor, Thermo Scientific) versetzt und das Volumen des Reaktionsansatzes mit H_2O auf 10 μl aufgefüllt. Der DNaseI-Verdau erfolgte für 30 min bei 37°C . Danach wurde 1 μl 50 mM EDTA zugegeben und die DNaseI in 10 min bei 65°C inaktiviert.

Zur Synthese der cDNA wurde das First Strand cDNA Synthesis-Kit von Thermo Scientific genutzt.

- cDNA-Synthese

Oligo(dT)18 primer (0.5 µg/µl)	0,5 µl	}	4,25 µl	+ 5,75 µl RNA
5x Reaction Buffer	2 µl			
dNTP Mix, 10 mM	1 µl			
RevertAid™(Reverse Transcriptase)	0,5 µl			
RiboLock™ (RNAse Inhibitor)	0,25 µl			

3.2.2.3 DNA-Extraktion zur Genotypisierung von Mäusen

Als Ausgangsgewebe zur Genotypisierung der Versuchstiere wurden Schwanzspitzen benutzt. Diese wurden mit 500 µl Lyse-Buffer und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml, Proteinase K 7528.2 Carl Roth) bei 55 °C über Nacht lysiert.

Am Folgetag wurden die Lysate bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden 450 µl des Überstandes abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden dann zunächst 50 µl 3 M Natriumacetat(ph 4,8)-Lösung und schließlich 500 µl Isopropanol zwecks Fällung der DNA hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung für 15 min bei 4 °C und 21.000 g zentrifugiert.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die verbleibende DNA wurde mit 500 µl 70 % Ethanol p.a. gewaschen. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4 °C und 21.000 g für 5 min.

Schließlich wurde der gewonnene Überstand erneut abgenommen und verworfen. Das verbleibende Pellet ließ man bei Raumluft trocknen und löste es zuletzt je nach Dichte in 50-100 µl destilliertem Wasser.

3.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Allgemeines Funktionsprinzip:

Mit Hilfe der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (oder kurz: PCR) ist es möglich, einen bestimmten DNA-Abschnitt aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch zu diagnostischen Zwecken zu amplifizieren. Diese spezifische, zu amplifizierende DNA-Matrize wird auch als Template bezeichnet. Die Vervielfältigungsreaktion wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert. Darüber hinaus benötigt man ein Primerpaar, wobei jeder Primer das Template an einer Seite flankiert.

Die PCR setzt sich aus drei Reaktionsschritten zusammen, welche in Abb. 7 skizziert sind:

- 1) Denaturierung: Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94-96 °C, um die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelhelix aufzubrechen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt (Initialisierung), um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen. Danach erfolgt eine rasche Abkühlung auf 65 °C, um eine erneute Aneinanderlagerung der Doppelstränge zu verhindern.
- 2) Hybridisierung: Spezifische Anlagerung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA. Hierzu wird die Temperatur für ca. 30 Sekunden auf einem für die spezifische Bindung der Primer an die DNA ermöglicht. Die optimale Temperatur liegt normalerweise ca. 5-10 °C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenzen; dies entspricht meist einer Temperatur von ca. 55-65 °C und wird maßgeblich durch Sequenz und Länge der Primer beeinflusst. Eine zu niedrig gewählte Temperatur hätte unspezifische Bindungen der Primer an DNA-Abschnitte mit nur unzulänglicher Komplementarität zur Folge. Umgekehrt bewirken zu hohe Temperaturen eine starke thermische Bewegung der Primer, was eine ausreichende Bindung an die Zielsequenz verhindern könnte.
- 3) Elongation: Die DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend vom 3'-Ende des angelagerten Primers einen neuen DNA-Doppelstrang. Dieser kann in der nächsten Amplifikationsrunde selbst als Matrize für den anderen Primer dienen. Die zu wählende Temperatur ist hier abhängig vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-

Polymerase (68-72 °C).

Im ersten Zyklus entstehen pro eingesetztem DNA-Doppelstrang zwei DNA-Stränge, die jeweils im Bereich der Zielsequenz doppelsträngig sind. Nach der Denaturierung zu Beginn des zweiten Zyklus liegen dann also die beiden ursprünglichen DNA-Einzelstränge sowie zwei am 3'-Ende überlange Einzelstränge vor. Dies kommt so zu Stande, dass durch die Primer lediglich ein Startpunkt für die Synthese, jedoch kein Endpunkt definiert ist. Dieses Problem wird allerdings bereits im nächsten Zyklus behoben. An den Einzelsträngen der Ausgangs-DNA erfolgt die Doppelstrang-Synthese wie im ersten Zyklus. Die Einzelstränge der neu gebildeten DNA enden am 5'-Ende bereits an der durch den Primer definierten Stelle, am 3'-Ende lagert sich nun der andere Primer an und komplettiert den DNA-Doppelstrang in der Gegenrichtung. So entstehen am Ende des zweiten Zyklus erstmalig DNA-Fragmente in der gewünschten Länge.

In den folgenden Zyklen vermehren sich diese DNA-Fragmente exponentiell, da sie jeweils wieder als Matrize für die erneute Synthese dienen. Die Anzahl der unerwünschten DNA-Stränge mit Überhängen am 3'-Ende steigt währenddessen nur linear an, da hier nur die Ausgangs-DNA als Template zur Verfügung steht. In der Praxis entstehen bei der PCR allerdings auch kürzere DNA-Fragmente als die gewünschte Ziel-DNA. Da sich diese kurzen Fragmente besonders in späten Zyklen häufen, begrenzt man in der Regel die Anzahl der zu durchlaufenden Amplifikationsrunden auf etwa 30.

Am Ablauf dieser vorgegebenen Zyklen wird das Reaktionsgemisch auf 4 °C heruntergekühlt um die Reaktion abzustoppen und gleichzeitig die erhaltenen Produkte zu konservieren.

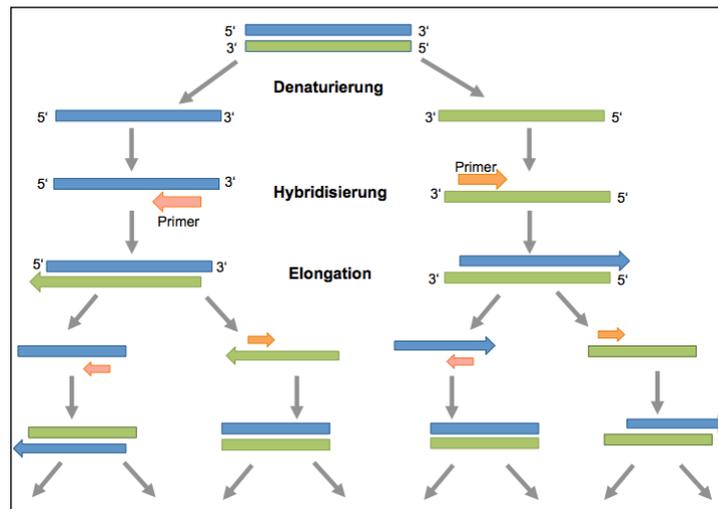


Abb. 7: Prinzip PCR

- *Real time*-quantitative PCR

Ein Nachteil der konventionellen PCR ist, dass eine Quantifizierung des zu untersuchenden DNA-Fragments nur möglich ist, solange sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet, d.h. wenn pro Zyklus eine Verdopplung der DNA-Abschnitts stattfindet. Sobald die Plateauphase der Reaktion erreicht wird, lassen sich diskrete Mengenunterschiede nicht mehr differenzieren. Daher wurde die sogenannte *Real time*-PCR entwickelt, um die synthetisierte DNA-Menge direkt im Reaktionsansatz zu messen. Die einfachste Möglichkeit zur Quantifizierung der DNA-Produkte mittels Real-time-PCR ist die Nutzung von fluoreszierenden DNA-Farbstoffen, die in den DNA-Doppelstrang interkalieren. Dabei ist die Fluoreszenz proportional zur Menge der synthetisierten Doppelstrang-DNA. Am Ende jeder Elongationsphase werden die Proben mittels eines Lasers angeregt. Das emittierte Signal wird von einem Computer aufgezeichnet und gegen die Zykluszahl aufgetragen.

Zur Quantifizierung des zu untersuchenden Templates bestimmt man den sogenannten *threshold*. Dieser Schwellenwert entspricht der Zykluszahl, bei der die Fluoreszenzemission die basale Fluoreszenz signifikant übersteigt, und wird auch als C_T -Wert bezeichnet. Der C_T -Wert ist abhängig von der Menge der ursprünglich in der Probe enthaltenen mRNA: Je mehr mRNA eine Probe enthält, desto weniger PCR-Zyklen sind

notwendig, damit das Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA das Hintergrundrauschen übersteigt.

Die ermittelten C_t -Werte können nun relativ quantifiziert werden, indem man die Expression des Zielgenes in der betrachteten Probe in Relation zu einer Referenzgruppe (unbehandelte Mediumkontrolle) setzt. Durch diese relative Quantifizierung kann eine Steigerung oder Reduzierung einer Genexpression durch spezielle Maßnahmen, wie z. Bsp. die Behandlung mit bestimmten Stimulantien, erfasst werden. Zusätzlich wird die Expression mit einem sogenannten *housekeeping* oder Referenzgen normalisiert, dessen Expression möglichst unabhängig vom Experimentaufbau in den verschiedenen Proben konstant sein sollte.

Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich schließlich auf die ursprüngliche Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe zurückschließen. Um letztlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines sogenannten Referenzgens bezogen, welche in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Referenzgen wird hierbei so gewählt, dass dessen Expression nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird.

- qPCR-Ansatz

Zur Durchführung der qPCR wurde der EvaGreen® qPCR Master Mix von Bio-Budget Technologies (Krefeld) verwendet.

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen pro Reaktionsansatz</u>	<u>Endkonzentration</u>
cDNA	5 µl	1-50 ng
EvaGreen® qPCR Master Mix	4 µl	1 x
Primer 1 (forward sense)	0,4 µl	0,2-0,4 µM
Primer 2 (reverse sense)	0,4 µl	0,2-0,4 µM
H ₂ O	10,2 µl	

- Standard-qPCR-Protokoll

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
Denaturierung	95 °C	10 min
	95 °C	10 sec
Amplifikation (50x)	57 °C	30 sec
	72 °C	1 sec
Abkühlen	4 °C	30 sec

- PCR mit Taq-DNA-Polymerase zur Genotypisierung

1) Taq-PCR-Ansatz

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen pro Reaktionsansatz</u>	<u>Herstellerangaben</u>
DNA	1 µl	
10x Buffer	2,5 µl	ThermoFisher Scientific DreamTaq 10x Buffer
Taq Polymerase	0,125 µl	ThermoFisher Scientific DreamTaq DNA- Polymerase
dNTP	0,5 µl	5prime dNTP-Set (100mM), VWR
Primer 1 (forward sense)	0,5 µl	
Primer 2 (reverse sense)	0,5 µl	
H ₂ O	19,875 µl	

2) Taq-PCR-Protokoll

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
Denaturierung	95 °C	3 min
	95 °C	30 sec
Amplifikation (30 x)	60 °C	30 sec
	72 °C	1 min
Abkühlen	4 °C	30 sec

3.2.2.5 Funktioneller Gen-Knockdown mittels ZINKFINGER-Nukleasen

Ein wichtiger Ansatz bei der Untersuchung der Funktionen von Proteinen ist der Knockout oder Knockdown des entsprechenden Gens. Eine relativ junge Technologie, das

sogenannte *Gene Editing*, hat die Effizienz des Knockdowns erheblich gesteigert, indem sie es ermöglicht, gezielt Veränderungen ins Genom einzubringen. Dabei bedient sich das *Gene Editing* im Wesentlichen dreier neuartiger Werkzeuge: CRISPR/Cas9, TAL-Effektornukleasen (TALEN) sowie Zinkfinger-Nukleasen (ZFN), wobei es sich jeweils um künstlich hergestellte Restriktionsenzyme handelt (Gaj et al., 2013; Kim und Kim, 2014).

Der Name der ZFN-Nukleasen leitet sich ab von dem Motiv der Zinkfinger, welches in der Lage ist, DNA zu binden, und dementsprechend vor allem in Transkriptionsfaktoren gehäuft vorkommt. Ein einzelnes Zinkfinger-Motiv umfasst etwa 20-30 Aminosäuren und ist gekennzeichnet durch ein zentrales Zink-Atom, welches meist über Histidin und/oder Cystein-Reste koordinativ gebunden wird. Die ZFN-Nukleasen, die beim *Gene Editing* eingesetzt werden, enthalten meist drei oder vier Zinkfinger; jeder einzelne davon bindet drei aufeinander folgende Basen der Zielsequenz. So kann der anvisierte DNA-Abschnitt hochspezifisch gebunden werden. Diese drei Zinkfinger sind in ZFN mit der Nukleasedomäne des TypII-S-Restriktionsenzym FokI fusioniert. FokI schneidet, wenn es dimerisiert vorliegt, die DNA unspezifisch. Zur Aktivierung der ZFN werden also zwei unterschiedlich gebaute ZFN-Monomere benötigt, die jeweils einen anderen DNA-Strang binden. Die ZFN-Technologie macht es sich im Weiteren zunutze, dass die endogene Zellmaschinerie versucht, die von den ZFN erzeugten Doppelstrangbrüche in der DNA zu reparieren. Es kommen hier zwei verschiedene Reparaturmechanismen zum Einsatz: die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous endjoining*) oder die Reparatur über eine homologe Matrize (Urnov, 2010; Carrol, 2011).

Ohne Zugabe einer exogenen DNA-Vorlage findet an dem entstandenen Doppelstrangbruch also eine nicht-homologe Endverknüpfung statt, das bedeutet, die DNA wird ohne Rücksicht auf die Sequenz ligiert. Dabei entstehen folglich meist kleinere Insertionen und Deletionen. Hat man die Zinkfinger also so gewählt, dass die Zielsequenzen in einem der vorderen Exons des zu modifizierenden Gens liegen, kommt es häufig zu einer Inaktivierung des Gens. So ist es möglich Gene auszuschalten, ohne dabei im Genom Spuren von Selektionskassetten zu hinterlassen.

Für die Untersuchung von Ifi203 haben wir uns der ZFN-Technologie bedient, um ein Ifi203-Gen zu kreieren, das eine Deletion in der Pyrimidindomäne trägt. IFI203 wird also noch

translatiert, ist aber durch die Mutation funktionell inaktiv. Dieser Zinkfinger-basierte Gen-Knockdown ist in Abb. 8 veranschaulicht.

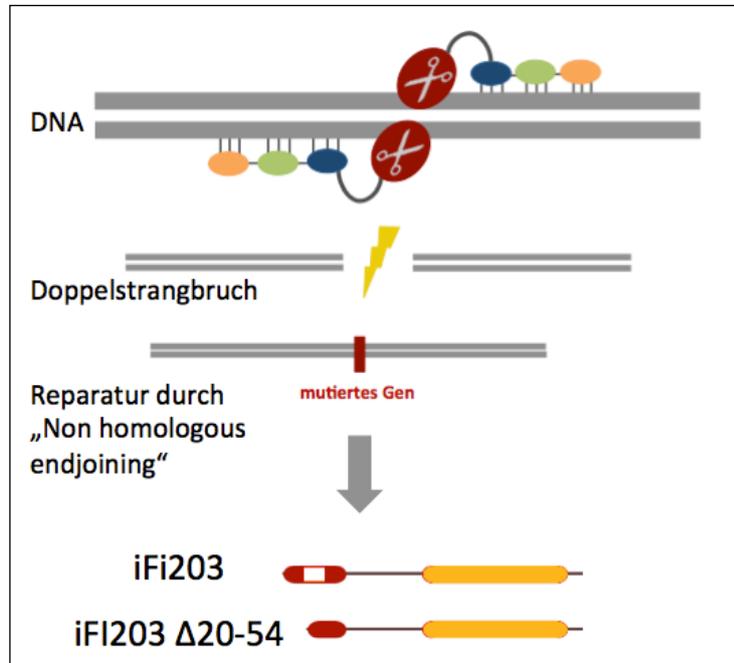


Abb. 8: Schema des Gen-Knockdowns via ZFN

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 ELISA

Zur Quantifizierung bestimmter Proteine in Lösungen wird die Methode des *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) angewandt. Es handelt sich hierbei um ein antikörperbasiertes Verfahren. In unserem Fall kam dabei die sogenannte Sandwich-Methode zum Einsatz, die in Abb. 9 zu sehen ist. Dabei bedient man sich zweier Antikörper, die verschiedene Epitope des Zielproteins erkennen. Zum Nachweis von murinem IP-10 wurde das Mouse IP-10/CXCL10/CRG-2-ELISA von R&D Systems (Wiesbaden) verwendet.

Dafür wird zunächst der Primärantikörper, der sogenannte Capture-Antikörper, gemäß Herstellerangaben in PBS verdünnt. Von dieser Lösung werden je 100 µl in die Vertiefungen einer 96-well-Platte einpipettiert. Der Capture-Antikörper dient als Gerüst für die Nachweisreaktion und fixiert das nachzuweisende Antigen auf der

Plattenoberfläche. Die Beschichtung erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht. Am nächsten Tag werden die Wells geleert und gemäß Herstellerangaben mit 150 µl Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween 20) drei Mal gewaschen. Im Anschluss werden die Platten in 1 %-iger BSA-Lösung für 1 h geblockt. Das Blocken dient der Absättigung unspezifischer Bindestellen, um ungewollte Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend werden die Platten erneut drei Mal gewaschen. Dann werden pro Well 100 µl der zu untersuchenden Proben in geeigneten Verdünnungen aufgetragen. Zusätzlich wird eine IP-10-Standardreihe angelegt. Diese enthält bekannte Mengen des zu untersuchenden Proteins und kann so später zur Quantifizierung als Kalkulationsgrundlage herangezogen werden. Es folgt eine Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur, während derer das nachzuweisende Zytokin an den Primärkörper bindet. Im Anschluss werden die Platten erneut drei Mal gewaschen. Als nächstes werden pro Vertiefung 100 µl einer Verdünnung des Sekundärantikörper (in 1 %-iger BSA-Lösung) aufgetragen. Den Sekundärantikörper, welcher der Detektion der an den Primärantikörper gebundenen Proteine dient, lässt man für weitere 2 h einwirken. Nach erneutem dreimaligem Waschen gibt man in jedes Well 100 µl einer Lösung, die Streptavidin-HRP in reaktionskinetisch optimaler Konzentration enthält. Diese Lösung lässt man 20 Minuten einwirken. In dieser Zeit bindet Streptavidin an den Biotin-Rest, den der Detektionsantikörper trägt. Im Anschluss wird die Platte zwei Mal gewaschen und danach 100 µl der Substratlösung hinzugegeben. Die Substratlösung besteht aus einer 1:1-Mischung aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin. Dieses Substrat wird von HRP zu einem optisch aktiven Produkt umgesetzt. Nach ungefähr 20 min Einwirkzeit wird die enzymatische Reaktion durch Zufügen der Stopplösung aus 2 N H₂SO₄ terminiert. Die Farbintensität, die proportional zur Enzym- und somit zur Protein-Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines ELISA-Readers photometrisch bestimmt. Die Standardreihe ermöglicht die genaue Berechnung der in der Probe enthaltenen Protein-Konzentration.

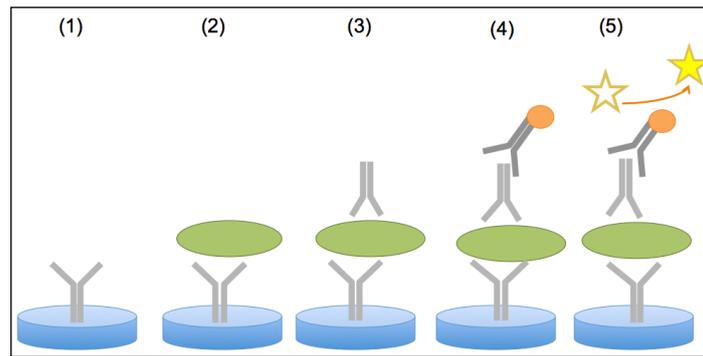


Abb. 9: Prinzip Elisa-Sandwich-Methode

- (1) Capture-Antikörper bindet an den Boden der Assayplatte
- (2) Zugabe der Probe und Inkubation
- (3) Zugabe des Detektions-Antikörpers
- (4) Zugabe und Komplexbildung mit einem Antikörper der an ein Reporterenzym gekoppelt ist
- (5) Zugabe des Substrats, das vom Reporterenzym zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird

3.2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Molekülen, insbesondere von Nukleinsäuren und Proteinen.

PAGE von Proteinen:

Für die PAGE von Proteinen wird die denaturierende Variante der SDS-PAGE angewendet. SDS-PAGE steht für *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Es handelt sich hierbei um ein Verfahren zur Analyse von Proteinen, welche gemäß Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis als Trennmedium. Zusätzlich kommt das Detergent SDS (=Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. SDS bindet an die zu untersuchenden Proteine und maskiert deren Eigenladung, sodass diese eine konstant negative Ladungsverteilung aufweisen. Nachdem die Denaturierung durch Erhitzen bereits eine Auflösung der Sekundärstrukturen der Proteine bewirkt hat, führen die negative Ladungen des SDS, welche sich gegenseitig abstoßen, zu einer Linearisierung der Proteine im Gel. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach Kettenlänge (proportional zur

Molekülmasse), da längere (und damit schwerere) Proteine im Gel stärker zurückgehalten werden und dadurch im elektrischen Feld langsamer laufen. Die Laufrichtung aller Proteine ist durch SDS vermittelte Negativladungen stets von der Kathode zur Anode. In unserem Falle haben wir ein diskontinuierliches SDS-PAGE verwendet. Hier durchlaufen die Proteine zunächst ein Sammelgel mit neutralem pH, in dem sie konzentriert werden, und anschließend durchlaufen sie ein Trenngel mit basischem pH, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich neben dem pH-Wert auch in der Porengröße. Diese beiden Komponenten sind für die Filtereigenschaft des Trenngels verantwortlich. Als Elektrolytlösung wurde hier ein SDS-haltiges TRIS-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Dieses von Ulrich Laemmli entwickelte System ermöglicht eine sehr gute Trennung von Proteinen zwischen 5 und 250 kDa (Laemmli, 1970). Für diese Methode wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst mit 1x Lämmli-Puffer lysiert, danach bei 95 °C für 5 min denaturiert und im Anschluss auf ein SDS-PA-Gel geladen. Als Proteinstandard wurde die *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet. Der Lauf wurde für 2 h bei 30 mA pro Gel durchgeführt. Die Gele wurden danach zur Analyse einem Western Blot zugeführt.

3.2.4 Virologische Methoden

3.2.4.1 Allgemeines Prinzip der RNA-Interferenz mittels *small interfering* RNAs (siRNAs) und *small hairpin* RNAs (shRNAs)

Eine Vielzahl der Experimente, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, ist das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi). RNA-Interferenz bedeutet, dass man in die Zielzelle doppelsträngige RNA (dsRNA)-Moleküle einbringt. Diese sogenannten siRNAs führen dann zum sequenzspezifischen Abbau der komplementären mRNA, was für die Zelle den Verlust des entsprechenden Proteins bedeutet. Letztendlich macht man sich dazu die natürliche Zellmaschinerie zu Nutze, die eigentlich die Replikation viraler Nukleinsäuren in eukaryotischen Zellen verhindern soll.

Die Technik der RNA-Interferenz wurde erstmals im Jahre 1998 von Fire und Mello angewandt. Sie konnten zeigen, dass das Einbringen langer Doppelstrang-RNA in den

Fadenwurm *C. elegans* im Abbau der endogenen mRNA und somit in der Reduktion des korrespondierenden Proteins resultiert (Fire et al., 2008).

In höheren Organismen wurde der Einsatz von RNA-Interferenz zur Unterdrückung von mRNA-Transkripten lange Zeit durch das Problem limitiert, dass die langen dsRNA-Moleküle eine unspezifische Interferonantwort induzieren. Abhilfe schuf dann der Einsatz kürzerer, ca. 19-22 Basenpaare (bp) langer dsRNA-Moleküle, der *small interfering RNAs* (siRNAs), die keine ungewollte Interferonantwort induzieren (Elbashir, 2001).

Eine weitere RNA-Form, die zur RNA-Interferenz eingesetzt wird, sind sogenannte shRNAs (*small hairpin RNAs*) (Paddison, 2002). Dabei handelt es sich um haarnadelförmige RNA-Moleküle, deren Expression meist durch Plasmide oder virale Vektoren vermittelt wird.

Für die Herstellung dieser kürzeren endogenen siRNAs ist die zelleigene Ribonuklease Dicer aus der Familie der RNase III-Proteinfamilie verantwortlich. In den meisten Spezies resultiert die Verarbeitung langer dsRNA durch Dicer in dsRNAs, die ca. 21 Basenpaare lang sind. Diese funktionalen siRNAs zeichnen sich durch einen Überhang zweier ungepaarter Nukleotide am 3'-Ende sowie eine Hydroxylgruppe am 3'-Ende aus. Zusätzlich werden sie mit einer Phosphatgruppe am 5'-Ende versehen. Die funktionalen siRNAs assoziieren mit zellulären Proteinen und bilden den sogenannten RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*). Zum RISC-Komplex gehören unter anderem noch eine Helikase, die die siRNA entwindet, sowie eine Ribonuklease, die für den Abbau der Zielsequenzen verantwortlich ist. Der RISC-Komplex wird durch den antisense-Strang zur entsprechenden komplementären mRNA geleitet, die nachfolgend abgebaut wird. Eine Übersicht zum Prinzip der RNA-Interferenz liefert Abb. 10.

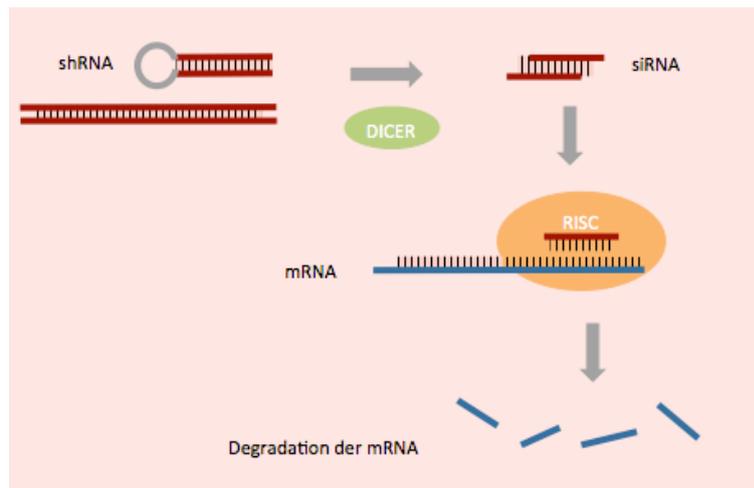


Abb. 10: Prinzip der RNA-Interferenz

3.2.4.2 Herstellung und Konzentration lentiviraler shRNA-Vektoren

Der entscheidende Vorzug der shRNAs bildet ihre dauerhafte Expression, die in der stabilen Suppression des Genprodukts, also in einem funktionellen Knockdown resultiert. Für diese Arbeit wurden die shRNA-Expressionskassetten durch lentivirale Vektoren in die Zielzellen eingebracht. Diese lentiviralen Vektoren bestanden in unserem Fall aus einem Transferplasmid, einem Verpackungsplasmid und einem Hüllplasmid. Das Transferplasmid enthält die Expressionskassette, die in das Genom der Zielzelle integriert werden soll. Das hier verwendete pLKO1-puro-Plasmid trägt einen Marker für Puromycin-Resistenz, der eine stabile Selektion der Zielzellen ermöglicht. Um größtmögliche Sicherheit zu erreichen, enthält das pLKO1-Genomplasmid mutierte *long terminal-repeats* (LTRs). Eine virale LTR besteht normalerweise aus der U3-, der R- und der U5-Region. Die U3-Regionen dienen in funktionalen Viruspartikeln als Promotor und sind für die virale Replikation essentiell. Im Fall des Vektors pLKO1 tragen die LTR-Sequenzen eine Deletion in der U3-Region am 3'-Ende. Die 5'-LTR wurde hingegen durch einen CMV-Promotor ersetzt. Das Verpackungsplasmid $\Delta 8.9$ codiert für die HIV 1-Gene gag, pol und rev. Dieser Aufbau aus multiplen Plasmiden führt dazu, dass die resultierenden Viruspartikel nicht zur Replikation fähig sind und in der Zielzelle nicht vermehrt werden können (Dull et al., 1998). Die Pseudotypisierung mit dem Hüllprotein VSV-G, das

Hüllprotein G des vesikulären Stomatitis-Virus, erhöht den Tropismus der Viruspartikel und vergrößert das Wirtsspektrum der zu transfizierenden Zellen.

3.2.4.3 Kalzium-Phosphat-Transfektion

Zur Herstellung der lentiviralen Vektoren wandte man die Kalzium-Phosphat-Methode an. Als Produktionszellen dienten HEK 293T-Zellen. Dazu wurden zunächst $3-4 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm-Petrischale ausplattiert. Nach 6-18 h sollten die Zellen gut adhären und bereit für die Transfektion sein. Pro 10 cm-Schale wurden 20 µg Transferplasmid, 15 µg Verpackungsplasmid und 6 µg Hüllplasmid in einem Volumen von 500 µl H₂O mit 500 µl 2xHBS versetzt und gut vermengt. Im Anschluss wurden 62,5 µl 2 M CaCl₂ hinzugegeben, die Mischung gründlich durchmischt und für 20-25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine ebene Präzipitatverteilung zu erreichen, wurde die Lösung tropfenweise unter kontinuierlichem Schwenken auf die Platten pipettiert. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel auf DMEM mit 30 % FCS durchgeführt. Nach weiteren 24 h wurde der Zellüberstand geerntet. Um eine Kontamination mit HEK-Zellen zu vermeiden, wurde der Überstand zunächst zentrifugiert und im Anschluss durch ein Zellsieb mit Ø 0,45 µm gefiltert, aliquotiert und dann bei -80 °C eingefroren. Zwecks Konzentration der Vektoren wurde der Überstand 2 h bei 10 °C und 82.000 g zentrifugiert. Die pelletierten Viruspartikel wurden durch einstündiges Schwenken auf dem Horizontalschüttler bei 80 rpm vorsichtig resuspendiert und dann aliquotiert eingefroren.

3.2.4.4 Herstellung von transduzierten Zelllinien

Um nun mit Hilfe der generierten viralen Vektoren Zelllinien herzustellen, wurden J774-Makrophagen in einer Konzentration von $0,33 \times 10^6/\mu\text{l}$ ausplattiert. Bei ausreichender Adhärenz der Zellen wurden diese mit einer geeigneten Menge Virusüberstand versetzt, über Nacht inkubiert und am folgenden Tag einem Mediumwechsel zugeführt. 48-72 h nach der Transduktion wurden die Zellen mit Puromycin in einer Konzentration von 5 µg/ml der Selektion auf positiv transduzierte Zellen unterzogen. Die Zellen wurden unter Selektion weiter expandiert und entweder direkt weiteren Experimenten zugeführt oder bei -150 °C langzeitgelagert.

3.2.4.5 Genomweiter siRNA-Screen als effizientes Werkzeug für *loss of function*-Analysen potentieller Modulatoren des cdGMP-STING-Interferon-Signalweges

Ein weiterer Vorteil der Methode der RNA-Interferenz ist neben den oben genannten, dass sie nach entsprechender Automatisierung (z.B. durch den Einsatz von Pipettierrobotern) auch im Hochdurchsatzverfahren anwendbar sind und es so erlauben, schnell und systematisch eine große Anzahl an Genen gleichzeitig hinsichtlich ihrer Funktion zu untersuchen (Moffat und Sabatini, 2006). Zu diesem Zwecke wurden von akademischen Forschungsgruppen und auch von kommerziellen Anbietern umfangreiche Bibliotheken an siRNAs mit zufällig generierten Sequenzen geschaffen, die der Wissenschaft für die unterschiedlichsten Fragestellungen zur Verfügung stehen.

Bei dem hier vorgestellten siRNA-Screen von Ablasser et al. handelt es sich um einen wellbasierten Versuchsaufbau. In einem solchen Entwurf enthält jedes Well einer Multiwell-Platte eine andere siRNA. Durchgeführt wurde der Screen in murinen L929-Fibroblasten, Zellen, die sich mit siRNAs relativ leicht transient transfizieren lassen (Paddison et al., 2002). Mit Hilfe eines Laborautomationssystems wurden die Zellen im 384-well-Format ausplattiert und pro Well mit spezifischen siRNAs transfiziert, die jeweils auf die Ausschaltung eines bestimmten Gens ausgerichtet waren. Nach 48 h wurden die Zellen mit cdGMP stimuliert und weitere 24 h später erfolgte die Auslesung im Luciferase-Assay. Dank dieses wellbasierten Versuchsaufbaus konnte für jede siRNA der Funktionsverlust des korrespondierenden Gens einer entsprechenden Änderung des Interferonsignals zugeordnet werden.

3.2.5 Statistische Analyse

Bei multiplen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (standard error of mean, SEM) dargestellt werden. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Corporation, CA, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Ifi203

4.1.1 Untersuchung der zellulären Lokalisation des murinen IFI203 mittels Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte in einem ersten Versuch die zelluläre Lokalisation des IFI203-Proteins bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde die Ifi203-spezifische cDNA in den pEF-Bos-basierten Expressionsvektor kloniert, der zusätzlich für das *green fluorescent protein* (GFP) codiert. Die Expression des Vektors führt zur Expression von IFI203, das ein GFP-Protein am N-Terminus trägt. Dieses Fusionsprotein erlaubt die Detektion der Lokalisation mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Als Kontrolle wurde eine Ifi202-codierende cDNA ebenfalls in den pEF-Bos-basierten Expressionsvektor kloniert. Von dem IFI202-Protein ist bereits bekannt, dass es im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist (Roberts et al., 2009). Die GFP-markierten IFI-Proteine wurden in grün farbcodiert dargestellt, die Zellkerne entsprechend in rot. In Abb. 11 ist deutlich zu erkennen, dass sich IFI203 im Zellkern befindet, während IFI202 im Zytosol lokalisiert ist.

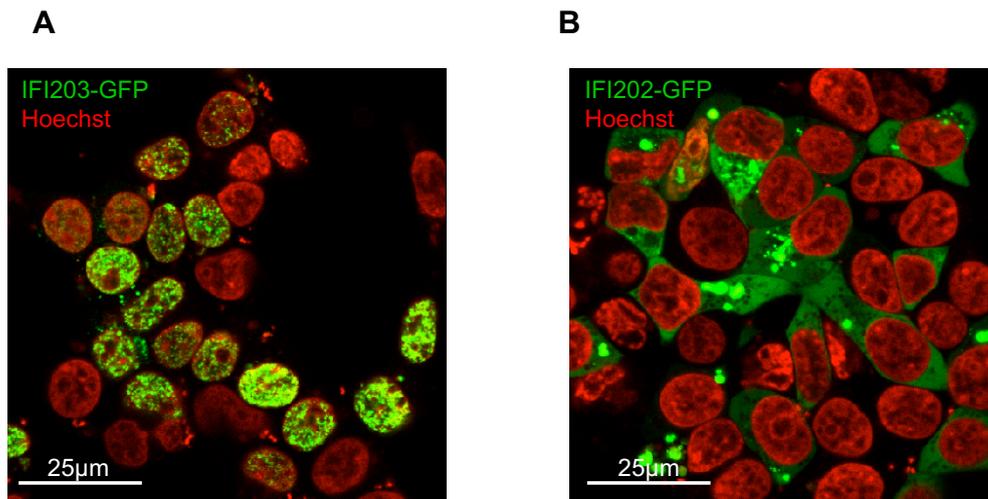


Abb. 11: IFI203 lokalisiert im Zellkern

- (A)** Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation der IFI-Proteine wurden HEK 293T-Zellen mit GFP-markiertem Ifi203-Expressionsplasmids transfiziert. Nach 8-10 h Inkubationszeit zeigt sich die eindeutige nukleäre Lokalisation von IFI203.
- (B)** Unter gleichen Bedingungen wie unter (A) wurden HEK 293T-Zellen mit GFP-markiertem Ifi202-Plasmid transfiziert. Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Experiment von 3.

4.1.2 Bestimmung der Ifi203-Expression vor und nach IFN-Stimulation

Die Ifi-Familie wird, wie oben beschrieben, zu den ISGs gezählt, die sich durch ihre Induzierbarkeit durch Interferon auszeichnen. Zur funktionalen Analyse von IFI203 zielten die weiteren Versuche darauf ab, die Hochregulation des Proteins in Abhängigkeit von Interferon genauer zu untersuchen. Um eine Interferoninduktion zu bewirken, wurden verschiedene Zelllinien (repräsentativ in Abb. 12 gezeigt: Primäre Makrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDMs) und J774-Makrophagen) sowohl mit dem STING-Aktivator cdGMP als auch mit dem RIG-I-Liganden IVT4 aktiviert. Zur Erstellung einer Kinetik der Expression von IFI203 wurden die stimulierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert und zur Messung der Expressionslevel von Ifi203 eine qPCR durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass das Expressionsniveau der Ifi203-mRNA in ruhenden Zellen unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Stimulation mit cdGMP führt ebenso wie die Stimulation mit IVT4 zu einer deutlichen Hochregulation von Ifi203, wobei sich jeweils ein linearer Anstieg der Ifi203-mRNA in Abhängigkeit von der Zeit beobachten

lässt. Diese Ergebnisse demonstrieren die Induzierbarkeit von Ifi203 durch Interferon-beta, unabhängig davon, über welchen Signalweg Interferon aktiviert wird.

Da bereits vier Stunden nach Stimulation ein signifikanter Anstieg der Ifi203-Expression zu beobachten ist, wählten wir diesen Zeitpunkt als Kontrollpunkt für alle weiteren Versuche.

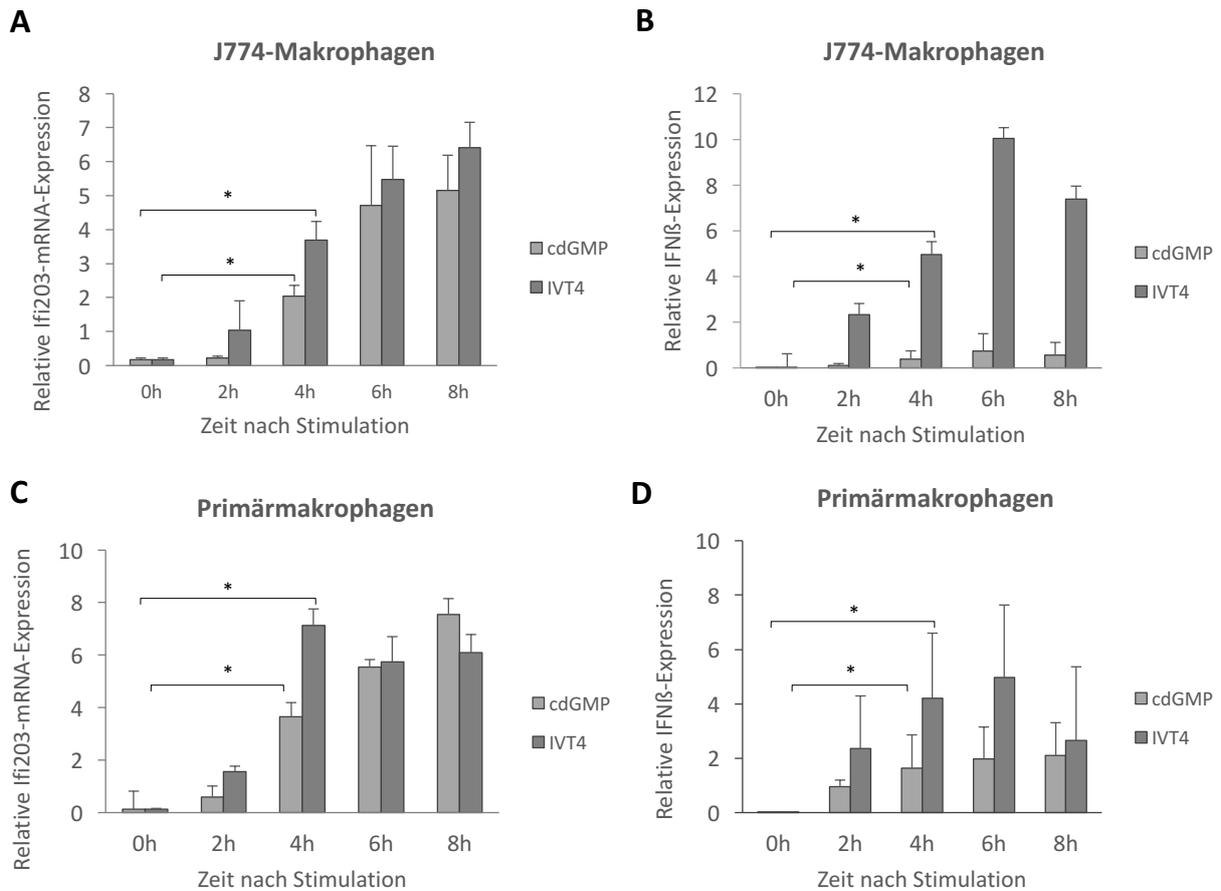


Abb. 12: Stimulation mit Interferon-Aktivatoren führt zur gesteigerten Ifi203-Expression

- (A)** J774-Makrophagen wurden mit zyklischem di-GMP und IVT4 transfiziert. Nach 0, 2, 4, 6 und 8 h wurde die Expression von Ifi203 mittels qPCR gemessen. Es zeigt sich eine lineare Zunahme der Ifi203-mRNA in Abhängigkeit von der Zeit.
- (B)** Zur Veranschaulichung, dass die Expression von Ifi203 unmittelbarem Zusammenhang mit der Expression von Interferon steht, wurde in den cDNA-Proben aus (A) die IFNβ-mRNA gemessen.
- (C)+(D)** Im selben Versuchsaufbau wie unter (A) wurden Primärmakrophagen mit cdGMP und IVT4 stimuliert und im Anschluss die Expression von Ifi203 und IFNβ mittels qPCR gemessen.

Die dargestellte relative Expression Ifi203 bzw. IFNβ bezieht sich jeweils auf die Expression des konstitutiv exprimierten Gens HPRT. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert + SEM aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,01$

4.2 Funktionsanalyse des Ifi203 Proteins

4.2.1 Untersuchungen zum Funktionsverlust von Ifi203

4.2.2 Die Induktion von Interferon bei Stimulation mit STING-Liganden wie zyklischem di-GMP und Doppelstrang-DNA ist abhängig von Ifi203

Um zu untersuchen, welche Konsequenzen sich aus einem Verlust von Ifi203 für die Interferoninduktion ergeben, wurde in J774-Makrophagen mit Hilfe lentiviraler Transduktion von shRNA-Expressionskassetten ein funktionaler Knockdown von Ifi203 etabliert. Als Kontrolle wurden gegen TLR2 gerichtete shRNAs eingesetzt, die keinen Einfluss auf den zu untersuchenden Effekt haben. Die dabei entstandenen Knockdown-Zelllinien wurden per qPCR auf die Knockdown-Effizienz hin überprüft und erreichten dabei Werte zwischen 70 und 90 % (siehe Abb. 13). Im Anschluss wurden die Zelllinien mit zyklischem di-GMP stimuliert (Abb. 13(A)). Die Auswirkungen der funktionellen Suppression von Ifi203 auf die Interferoninduktion wurden mittels qPCR evaluiert. Dabei zeigt sich in den Zellen, in denen Ifi203 herunterreguliert wurde, eine signifikante Reduktion der reaktiven Interferonantwort im Vergleich zu Zellen, die mit shRNAs gegen TLR2 behandelt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass die Interferoninduktion nach Stimulation mit cdGMP in Makrophagen von der Expression von Ifi203 abhängig ist. Um diese Abhängigkeit für weitere STING-Liganden zu untersuchen, wurden die Knockdown-Zellen mit doppelsträngiger *Interferon stimulatory DNA* (ISD) stimuliert. Wie die anschließende qPCR zeigt, führt die Suppression von Ifi203 auch nach Stimulation mit ISD zu einer reduzierten Interferonantwort (Abb. 13(B)). Ifi203 scheint also für die Induktion von Interferon bei Aktivierung des STING-Signalweges von essentieller Bedeutung zu sein.

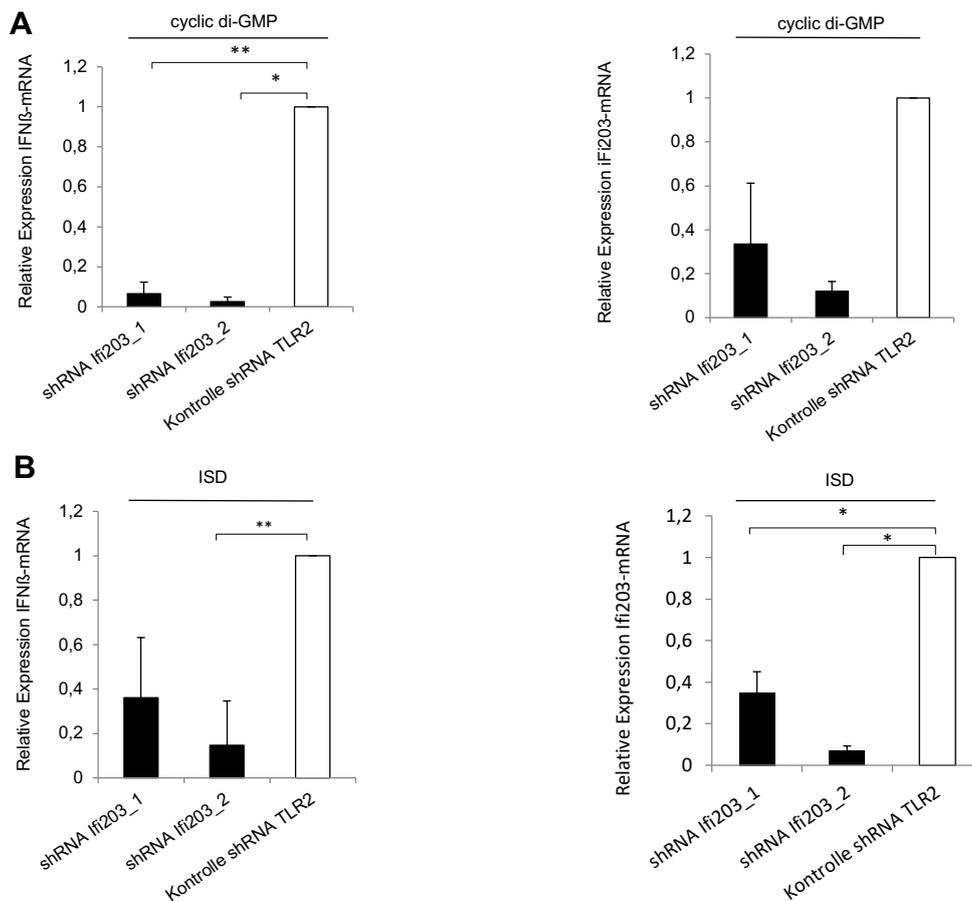


Abb. 13: Der Irf203-spezifische Knockdown in J774-Makrophagen führt zu einer signifikanten Reduktion der Interferon-Expression nach Stimulation mit verschiedenen STING-Liganden

(A) Durch lentiviralen Transfer von shRNA-Expressionskassetten und anschließender Selektion wurden Zelllinien aus J774-Makrophagen hergestellt, die sich durch eine stabile Suppression des Zielgens auszeichnen. Für dieses Experiment wurden die Zellen mit zyklischem di-GMP stimuliert. 4 h nach Stimulation wurden die Proben einer qPCR zugeführt, mittels derer dann die relative Expression von IFNβ sowie Irf203 als Kontrolle bestimmt wurde. Als Normalisierungsgröße diente wiederum das housekeeping-Gen HPRT.

(B) Im analogen Versuchsaufbau wurden die Knockdown-Zellen mit ISD stimuliert.

n=3, * p<0,05, ** p<0,1

Setzt man die Irf203-supprimierten Zellen jedoch Stimuli aus, welche nicht als STING-Liganden fungieren, sondern im Gegenteil Interferon über die RIG-I-Achse induzieren, so

manifestiert sich ebenfalls eine deutlich reduzierte Interferonproduktion in den I*fi*203-Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (s. Abb. 14).

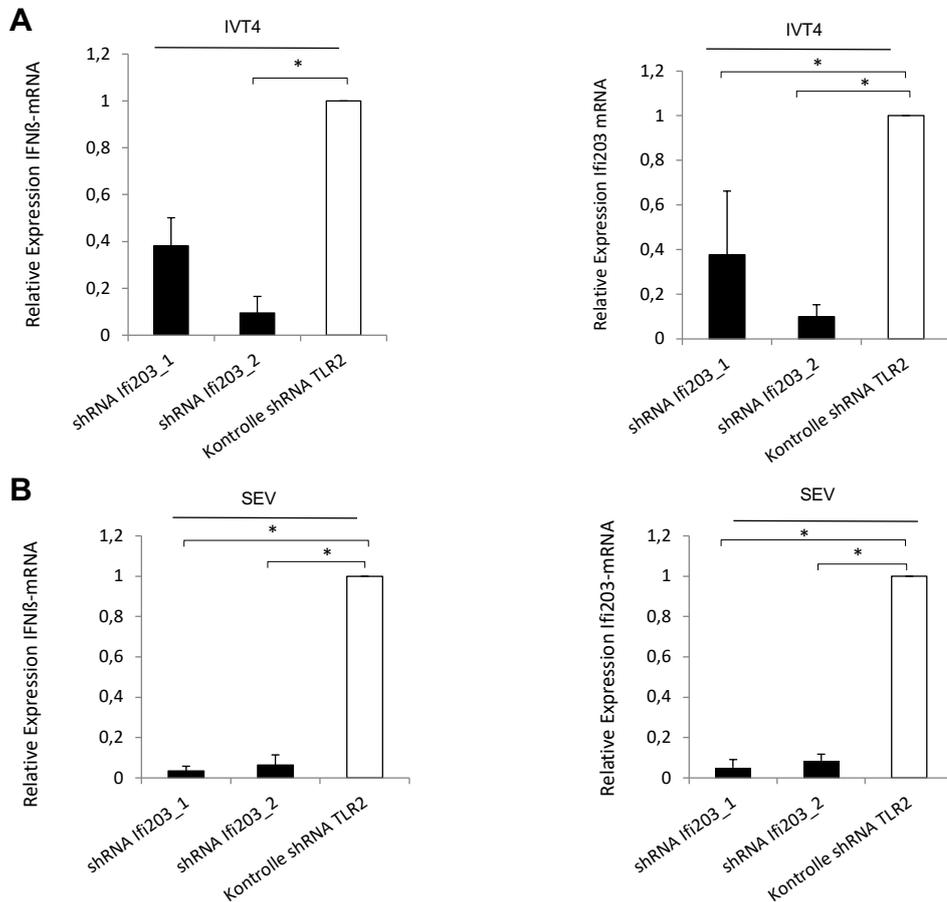


Abb. 14: Der I*fi*203-spezifische Knockdown resultiert auch unabhängig vom STING-Signalweg in einer beeinträchtigten Interferonantwort

(A)+(B) Die J774-Makrophagen, in denen I*fi*203 mittels shRNA supprimiert wurde, wurden mit IVT4 und Sendai-Virus (SEV) stimuliert. Auch hier wurden die Zellen 4 h nach Stimulation lysiert und per qPCR die relative Expression (bezogen auf die Expression des housekeeping-Gens HPRT) von IFNβ und I*fi*203 gemessen.

n=3, * p<0,05, ** p<0,1

4.2.3 Untersuchungen der Funktion von Ifi203 anhand von Überexpressionsexperimenten

4.2.3.1 Bei Überexpression besitzt Ifi203 immunstimulatorische Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung des IFI203-Proteins sollten die Auswirkungen einer Überexpression des Proteins untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HEK (*human embryonic kidney*) 293T-Zellen, die natürlicherweise keines der murinen IFI-Proteine exprimieren, mit Plasmiden transfiziert, die für verschiedene IFI-Proteine codieren. Als Kontrolle diente ein GFP-Plasmid, das keine Rolle bei der Interferon-vermittelten Immunantwort spielt. Zur Quantifizierung der Interferonantwort wurde das pIFN β -GLuc-Reporterplasmid cotransfiziert. In diesem Reporterplasmid treibt der minimale Interferon- β (IFN β)-Promotor die Expression einer Luciferase. Somit lässt sich mittels dieses Reporters die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bestimmen, die physiologischerweise den IFN β -Promotor transaktivieren (z.B. IRF3, AP1, NF- κ B). 36 h nach der Transfektion der Zellen wurde die Transaktivierung des Reporters bestimmt (Abb. 15(A)). Hier zeigte sich, dass die Überexpression des IFI203-Proteins allein bereits zu einer gesteigerten IFN β -Promotoraktivität führte, während dies im Fall der Überexpression des IFI204-Proteins nicht beobachtet werden konnte.

Um die Effizienz der durch die IFI-Proteine induzierten Typ-I-Interferoninduktion auf Proteinebene zu untersuchen, untersuchten wir weiterhin die Produktion des Chemokins IP10 (CXCL10). IP10 ist ein Chemokin, das durch IFN β induziert wird und sich gut auf Proteinebene bestimmen lässt. Hierzu wurden in HEK 293T-Zellen erneut verschiedene Ifi-Plasmide überexprimiert und im Anschluss wurde IP10 per ELISA im Zellüberstand quantifiziert (Abb. 15(B)). Im Vergleich zu den anderen Ifi-Genen führte nur die Überexpression von Ifi203 zu einer messbaren Produktion von IP10.

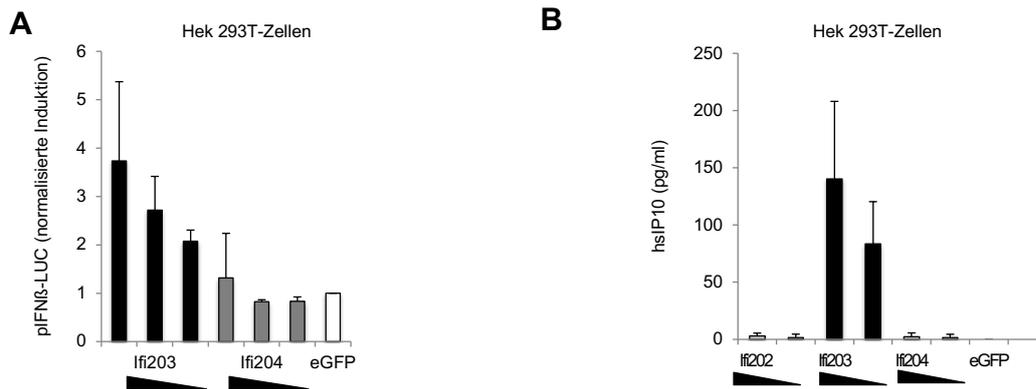
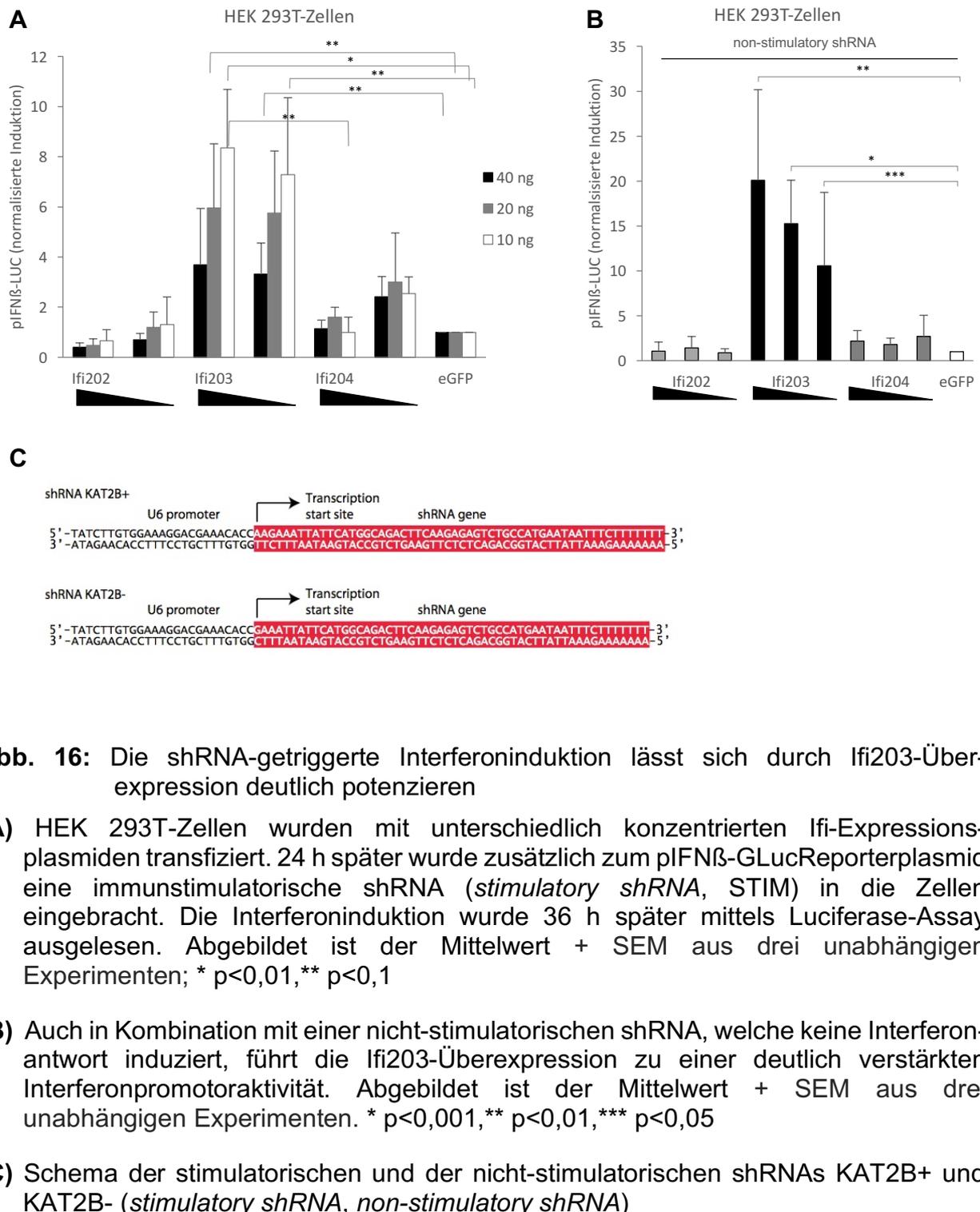


Abb. 15: Überexpression von Irf203 führt im Gegensatz zu anderen Irf-Proteinen zur Induktion von Interferon in HEK 293T-Zellen

- (A)** HEK 293T-Zellen wurden mit verschiedenen Irf-Expressionsplasmiden in unterschiedlichen Konzentrationen sowie einem Interferon-sensiblen Luciferase-Konstrukt (pIFNβ-GLucReporterplasmid) transfiziert. Als Füllplasmid verwendeten wir GFP. Nach 36 h wurde die Interferoninduktion im Luciferase-Assay gemessen. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten.
- (B)** In HEK 293T-Zellen wurden erneut verschiedene Irf-Gene überexprimiert. 12 h nach Transfektion wurde der Überstand abgenommen um mittels ELISA die IP10-Produktion zu messen. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Eine weitere deutliche Steigerung der Interferonantwort konnte beobachtet werden, wenn die Interferonexpression durch einen zusätzlichen PRR-Stimulus induziert wurde. Um diesen Effekt zu erreichen, wurde das Reporterplasmid 24 h nach Transfektion der Irf-Expressionsplasmide zusammen mit einem shRNA-Konstrukt eingebracht, das in der Literatur als potenter RIG-I-Stimulus beschrieben und genutzt wird (*stimulatory shRNA* KAT2B+ shRNA, s. Abb. 16(C), Pebernard und Iggo, 2004; Ablasser et al., 2009). Im Luciferase-Assay zeigte sich, dass die shRNA-getriggerte Interferoninduktion durch die parallele Expression von Irf203 signifikant gesteigert wurde. In Abbildung 16(A) sieht man verschiedene IFI-Proteine, welche mit unterschiedlichen Mengen der *stimulatory shRNA* in HEK 293T-Zellen überexprimiert wurden. Die Abbildung zeigt jeweils die Luciferaseaktivität, welche die Aktivität des Interferonpromotors symbolisiert, normalisiert auf das Kontrollgen eGFP mit derselben Menge an Stimulus. Es wird deutlich, dass durch die zusätzliche Transfektion von Irf203 die Luciferaseaktivität und damit die

Interferonexpression in Reaktion auf den Stimulus erheblich verstärkt wird. Im Vergleich zum Kontrollgen zeigt die Luciferaseaktivität, welche die Aktivität des Interferonpromotors symbolisiert, die etwa zehnfache Induktion der Promotoraktivität nach Transfektion des Ifi203-Plasmids (Abb. 16(A)). Dieser Ifi203-geschuldete Effekt zeichnet sich in den Zellen, die mit weniger *stimulatory shRNA* versetzt wurden, deutlicher ab als in den Zellen, die mit einer größeren Menge stimuliert wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die unphysiologische shRNA eine derart starke Interferonreaktion hervorruft, dass in den Zellen selbst die Apoptose induziert wird. Um diese Verzerrung der Ergebnisse zu umgehen, schlossen wir einen Kontrollversuch mit einer nicht-stimulatorischen shRNA (*non-stimulatory shRNA*, KAT2B- shRNA, s. Abb. 16(C)), die selbst nicht in der Lage ist, Interferon zu induzieren, an. Auch hier wurden verschiedene IFI-Proteine parallel zur besagten shRNA in HEK 293T-Zellen überexprimiert. Wie in Abbildung 16(B) zu sehen, ließ sich in diesem Versuchsaufbau ebenfalls demonstrieren, dass die Überexpression von Ifi203 im Vergleich zum Kontrollgen zu einem signifikanten Anstieg der Interferonexpression führt: Im Gegensatz zu den anderen Ifi-Genen potenzierte die Überexpression von Ifi203 die spontane Interferonpromotoraktivität ca. zwanzigfach (Abb. 16(B)).



Die transiente Überexpression von Ifi203 scheint also in der Lage zu sein, zumindest die RIG-I-vermittelte Interferonantwort zu potenzieren. Zudem hatten die Experimente zum

Funktionsverlust von Ifi203 die Vermutung nahelegt, dass Ifi203 für die Interferoninduktion von essentieller Bedeutung ist, unabhängig davon, über welchen Signalweg die Interferonantwort ausgelöst wurde. Daher galt es nun zu untersuchen, ob die von uns beobachtete Potenzierung der Interferonantwort durch Ifi203 RIG-I-spezifisch ist oder sich auch hinsichtlich anderer Interferoninduktoren nachvollziehen lässt. Die folgenden Experimente zielten darauf ab, eine eventuelle synergistische Wirkung zwischen STING und Ifi203 nachzuweisen.

Es ist bereits bekannt, dass die Überexpression von STING in HEK 293T-Zellen, die kein endogenes STING exprimieren, zur spontanen Interferonaktivierung führt. Um herauszufinden, ob Ifi203 in der Lage ist, diesen STING-vermittelten Effekt zu verstärken, wurden in einem ersten Versuchsansatz STING sowie verschiedene Ifi-Plasmide in HEK 293T-Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde das pIFN β -GLuc Reporterplasmid co-transfiziert. Es zeigte sich, dass die simultane Überexpression von STING und Ifi203 die STING-bedingte Interferoninduktion im Vergleich zum Kontrollgen um ein Fünffaches verstärken konnte (Abb. 17(A)).

Die Intensität der Interferonantwort kann noch weiter gesteigert werden, wenn neben STING die cdGMP-Synthetase überexprimiert wird, welche den STING-Liganden zyklisches di-GMP generiert. Ziel war es nun zu untersuchen, ob die Überexpression von Ifi203 zu einer weiteren Potenzierung dieser Synergie führen kann. Dazu wurden zunächst Ifi203 und entsprechende Kontrollen in HEK 293T-Zellen überexprimiert. 24 h später wurde das Luciferase-Reporterplasmid (pIFN-GLuc), sowie ein STING- und cdGMP-Synthetase-codierendes Plasmid transfiziert. 36 h nach Transfektion des Reporterplasmids wurde dann im Zellüberstand die Luciferaseaktivität gemessen. Es ist deutlich, dass die Luciferaseaktivität im Überstand der Zellen, in denen Ifi203 überexprimiert wurde, doppelt so hoch war wie in den Zellen, in denen Ifi204 oder das Kontrollplasmid überexprimiert wurde (Abb. 17(B)). Dies bedeutet, dass die Überexpression von Ifi203 auch die STING-vermittelte Interferonproduktion signifikant verstärkte.

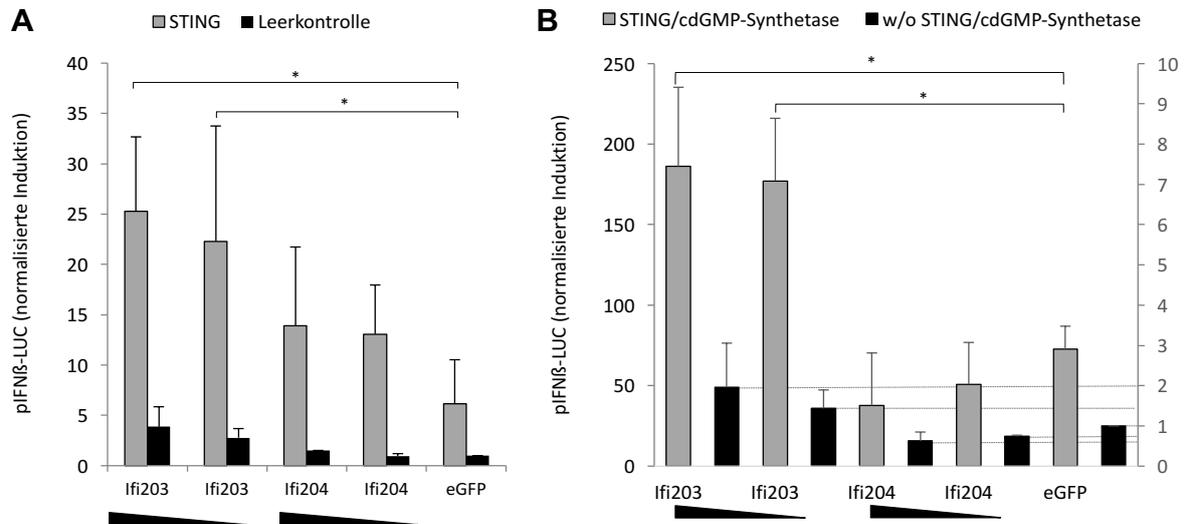


Abb. 17: Überexpression von Ifi203 steigert die über die STING-TBK1-Achse ausgelöste IFN-Induktion

- (A)** HEK 293T-Zellen wurden parallel mit STING-Expressionsplasmid sowie Ifi203-respektive Ifi204-Expressionsplasmid und dem Interferon-Reporterplasmid transfiziert. Als Füllplasmid und als Negativkontrolle diente eGFP. Die Auslesung des Luciferase-Assays erfolgte 36 h später. Gezeigt wird der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$
- (B)** In HEK 293T-Zellen wurde zunächst Ifi203 oder Ifi204 überexprimiert. 24 h später wurden im gleichen Verhältnis STING und cdGMP-Synthetase sowie zusätzlich pIFN β -GLuc-Reporterplasmid in die Zellen eingebracht. Zur besseren Übersicht wurden die Leerkontrollen (ohne STING/cdGMP-Synthetase) vergrößert auf einer Sekundärachse dargestellt. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Überexpression von Ifi203 im Gegensatz zu den anderen Ifi-Genen in einer spontanen Produktion von Typ-I-Interferon resultiert. Zusätzlich scheint die Ifi203-Überexpression als Verstärker einer PRR-vermittelten Immunantwort fungieren zu können.

4.2.4 Generierung einer Ifi203-defizienten Maus

Um die Auswirkungen einer vollständigen Ifi203-Defizienz *in vivo* zu untersuchen, sollte eine Ifi203-Knockout-Maus generiert und analysiert werden. Unter Berücksichtigung der

bisherigen Erkenntnisse zum strukturellen Aufbau von Ifi203 ist davon auszugehen, dass die Fähigkeit Interferon zu induzieren, vorrangig durch die Pyrin-Domäne konstituiert wird. Im Experiment, welches in Abb. 18 dargestellt ist, wurden sowohl das komplette Ifi203 als auch die separierte HIN-Domäne in HEK 293T-Zellen überexprimiert und im Anschluss die relative Interferonexpression im Luciferase-Assay gemessen. Man sieht, dass die HIN-Domäne alleine im Gegensatz zum intakten Ifi203 nicht zu einer relevanten Zunahme des Interferonexpressionsniveaus führt. Dies bestätigt die These, dass die Pyrin-Domäne für die Fähigkeit zur Interferoninduktion essentiell ist. Eine Trunkierung der Pyrin-Domäne resultiert somit in einem kompletten Funktionsverlust des Proteins.

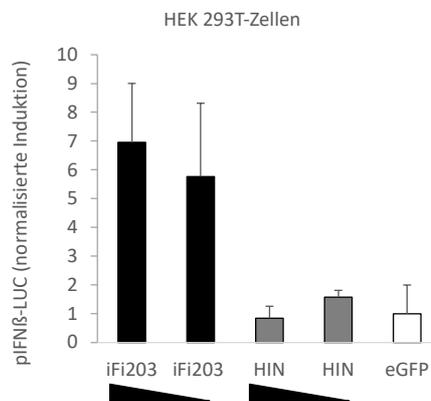


Abb. 18: Ifi203 ohne Pyrin-Domäne ist nicht in der Lage Interferon zu induzieren

HEK 293T-Zellen wurden parallel mit dem Interferon-Reporterplasmid sowie einem Expressionplasmid, welches für das komplette Ifi203 bzw. nur für die einzelne HIN-Domäne codiert, transfiziert. Als Füllplasmid und als Negativkontrolle diente eGFP. Die Auslesung des Luciferase-Assays erfolgte 36 h später. Gezeigt wird der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten.

Dementsprechend sollte zur Generierung einer Ifi203-Knockout-Maus mit Hilfe von Zinkfinger-nukleasen das Ifi203-Gen zielgerichtet ausgeschaltet werden. Hierzu wurde eine Zinkfinger-nuklease (ZNF) von Sigma erworben, die gegen das zweite Exon des Ifi203-Genlokus gerichtet war. Die *target site*, die durch die ZNF gebunden wurde, lautete: GGATTCAGCTGGCGGactggATTGAGGACAAG (Großbuchstaben: Bindungsbereich der einzelnen ZNF, Kleinbuchstaben: *spacer*-Region zwischen den ZFN) (s. Abb. 19).

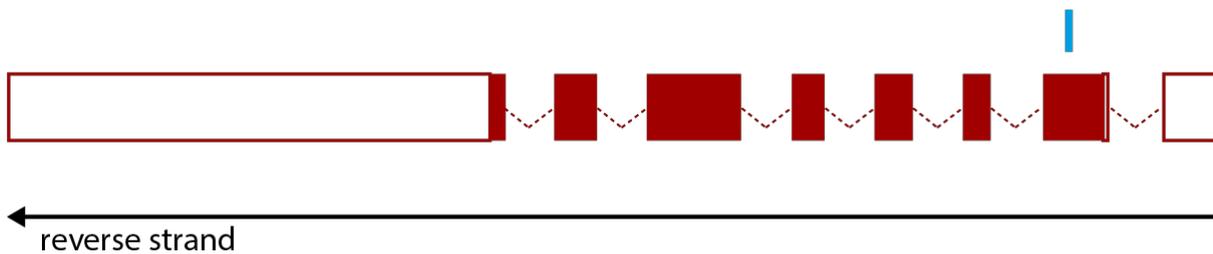


Abb. 19: Angriffspunkt des gegen Ifi203 gerichteten Zinkfingers

Gezeigt ist der Genlokus von Ifi203 auf dem reversen Strang von Chromosom 1, wobei die Transkriptvariante Ifi203-201 verwendet wurde, um exonische und intronische Bereiche zu markieren. Die intronischen Regionen (gestrichelten Linien) sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Exone werden als Kästchen symbolisiert, wobei translatierte Bereiche ausgefüllt sind. Der hellblaue Strich symbolisiert die Targetregion des verwendeten Zinkfingers.

Diese Zinkfingernuklease wurde dann vom transgenen Service des HETs (Haus für Experimentelle Therapie, Universitätsklinikum Bonn) mit einer Vorkerninjektion in Zygoten eingebracht, die dann von scheinchwangeren Ammentieren ausgetragen wurden. Die so erhaltenen *founder*-Tiere wurden dann bezüglich einer möglichen Insertion oder Deletion am entsprechenden ZFN-Target-Genlokus genotypisiert. Aus 113 analysierten *founder*-Tieren konnte lediglich eine Maus identifiziert werden, die eine Mutation im Ifi203-Genlokus aufwies. Diese geringe Ausbeute ist wahrscheinlich der Tatsache geschuldet, dass der ZFN nur eine *in vitro*-Aktivität von ca. 2-5 % aufwies (Angaben von Sigma). Hierbei handelte es sich um eine Deletion von 102 Nukleotiden, die für 34 Aminosäuren in der Pyrimidomäne von Ifi203 codierten. Da es sich um eine *in-frame*-Deletion handelte, wurde die Expression eines trunkierten Ifi203-Proteins erwartet und nicht der komplette Verlust von Ifi203 (z.B. durch ein prämaures Stopcodon). Das mutierte Ifi203-Allel bzw. IFI203-Protein wird im Folgenden als Ifi203^{Δ20-54} respektive IFI203^{Δ20-54} bezeichnet (Abb. 20). In Abb. 20(C) sieht man eine entsprechende Genotypisierung aus Zellen, die Ifi203^{Δ20-54} exprimieren im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, welche physiologisches Ifi203 exprimieren.

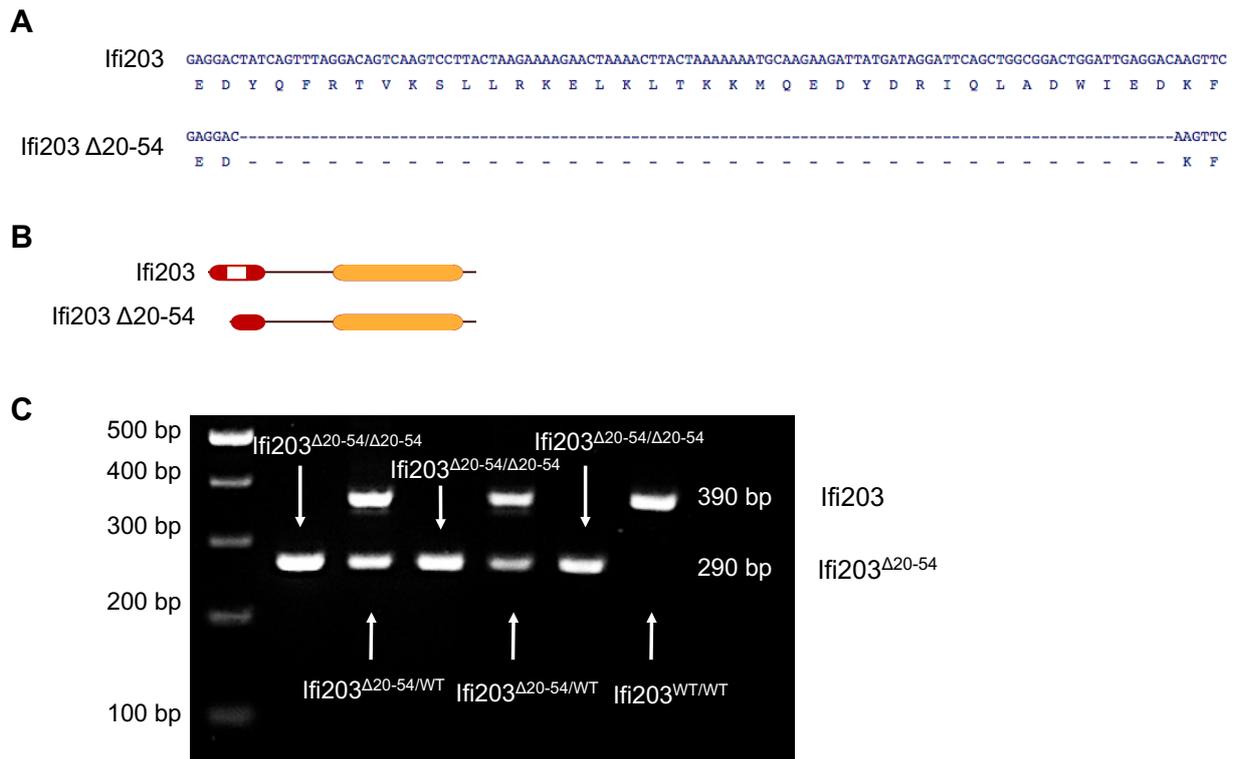


Abb. 20: Charakterisierung der Ifi203 Δ 20-54 Maus

- (A) Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenz des Wildtyp-Ifi203-Allels mit der des mutierten Ifi203 Δ 20-54-Allels.
- (B) Aufgrund der Deletion von 102 bp, welche zum Verlust von 34 AS (AS 21-54) in der Pyrin-Domäne führt, entsteht ein N-terminal-trunkiertes Ifi203-Protein.
- (C) Genotypisierungs-PCR von Primärmakrophagen aus Mäusen, die für das ZFN-mutierte Ifi203 homo-bzw. heterozygot sind. Gezeigt wird die Agarose-Gelelektrophorese nach Ethidiumbromid-Färbung der Proben aus BMDMs von Ifi203 Δ 20-54/WT- und Ifi203 Δ 20-54/ Δ 20-54-Mäusen sowie Wildtypmäusen. Die heterozygoten BMDMs tragen sowohl das ursprüngliche als auch das trunkierte Ifi203 im Genom, während in homozygoten Zellen nur das trunkierte Ifi203 nachweisbar ist.

4.2.4.1 Auswirkungen der Mutation von Ifi203 auf die Induktion von ISGs

Unsere bisherigen Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Ifi203-Defizienz *in vitro* zu einer stark verminderten Expression von Typ-I-Interferon sowie von Typ-I-Interferon-induzierten Genen nach Stimulation mit STING- und RIG-I-Liganden führt. Nun galt es zu überprüfen, ob sich dieser Befund auch *ex vivo* in Ifi203 Δ 20-54-Zellen nachweisen lässt. Hierzu wurden aus den Ifi203-defizienten Mäusen Ifi203 Δ 20-54-Primärmakrophagen

gewonnen. BMDMs bieten sich als Modell insbesondere an, da primäre Zelllinien hinsichtlich ihrer Funktionsweise den nativen Zellen im Mäuseorganismus gleichen.

Zum direkten Vergleich wurden sowohl BMDMs aus Wildtyp-Mäusen als auch Makrophagen aus Mäusen eingesetzt, welche bezüglich des Ifi203-Allels heterozygot sind.

Um nun die Auswirkungen der Ifi203-Mutation auf die Induktion von Interferon zu untersuchen, transfizierten wir die BMDMs mit den bereits zuvor verwendeten STING- und RIG-I-Aktivatoren (ISD und c-diGMP als cGAS bzw. STING- und IVT4 als RIG-I-Liganden) sowie verschiedenen TLR-Rezeptor-Liganden: polyIC für TLR3, Lipopolysaccharid (LPS) für TLR4, Resiquimod (R-848) für TLR8, pCI für cGAS und TLR9.

Im Anschluss wurde die Interferonexpression mittels qPCR gemessen. Wie in Abb. 21 zu sehen, hat die Ifi203-Mutation keinen signifikanten Effekt auf die Interferonexpression: Unabhängig davon, über welchen Signalweg die Interferonantwort angestoßen wird, unterscheiden sich die Ifi203-defizienten Zellen hinsichtlich des Interferonexpressionsniveaus nicht von Wildtyp-Zellen.

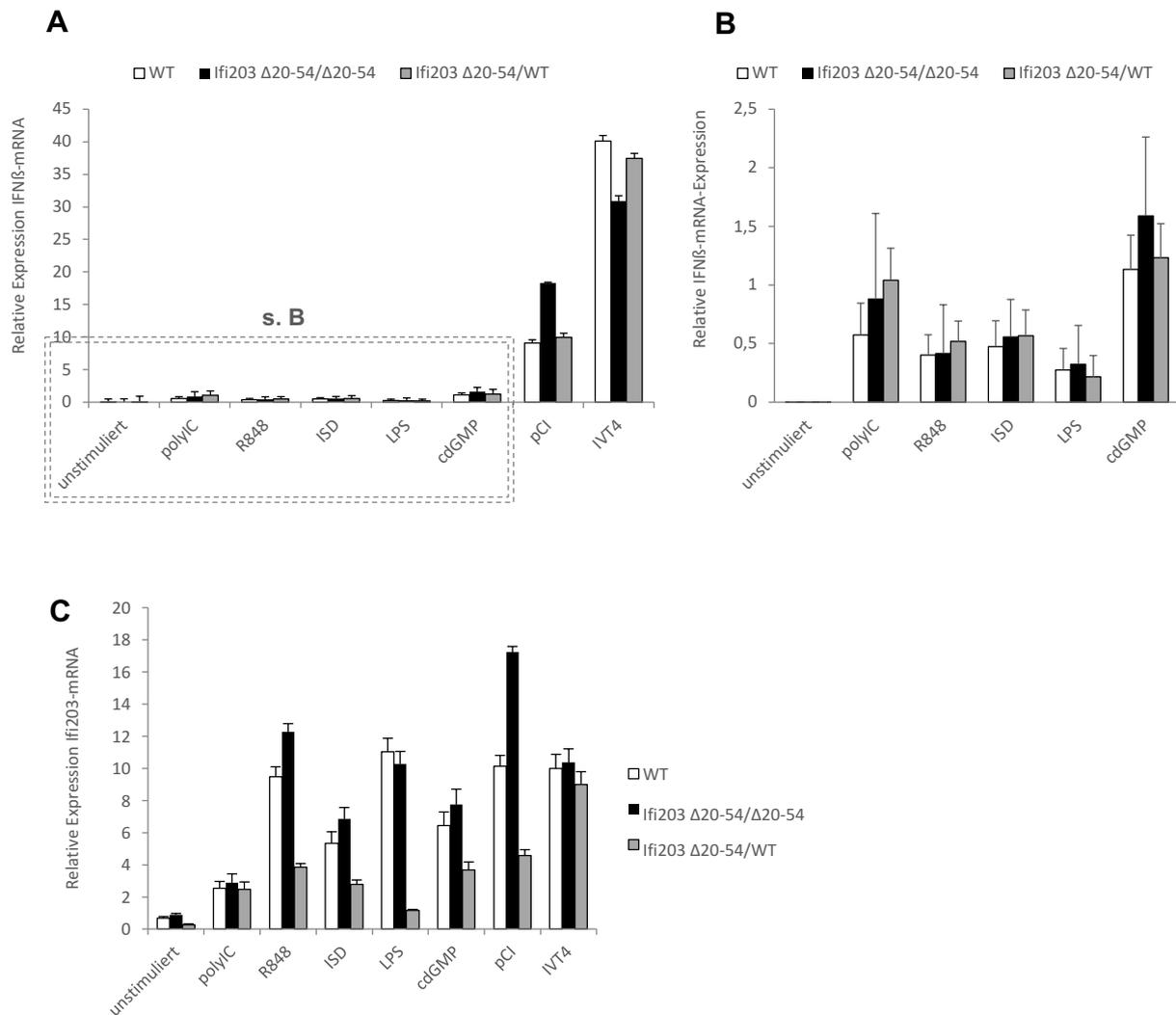


Abb. 21: Die Ifi203-Mutation hat *ex vivo* keine Auswirkung auf die Immunantwort nach Stimulation mit verschiedenen interferoninduzierenden Liganden

- (A) Die aus den Ifi203 Δ 20-54/ Δ 20-54-Mäusen gewonnenen BMDMs und BMDMs aus heterozygoten Mäusen sowie Wildtyp-Zellen wurden mit unterschiedlichen interferoninduzierenden Stimuli transfiziert und 4 h später die Interferonexpression mittels qPCR gemessen. Unabhängig davon, über welchen Signalweg Interferon induziert wird, besteht kein Unterschied in der Interferonexpression der Ifi203-defizienten BMDMs und den Wildtyp-BMDMs. Zur Quantifizierung der relativen Expression wurde wieder das konstitutiv exprimierte Gen HPRT herangezogen. Gezeigt wird der Mittelwert \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.
- (B) Zur besseren Übersicht wurde der in (A) markierte Ausschnitt vergrößert.
- (C) Zur Kontrolle wurde Ifi203-mRNA in den Proben untersucht. Die Zinkfinger-kreierte Deletion im Ifi203-Gen bedingt zwar durch den entstehenden Aminosäureverlust einen Funktionsdefekt des translatierten Proteins; die mRNA ist aber nach wie vor nachweisbar.

4.2.4.2 Die Mutation von Ifi203 hat keine Auswirkung auf die Interferon-bedingte Zytokinantwort

In den vorangegangenen Versuchen hatte sich gezeigt, dass ein Defekt des Ifi203-Gens die Interferonexpression nach Stimulation mit verschiedenen immunostimulatorischen Liganden nicht wesentlich inhibiert. Im nächsten Schritt sollte nun veranschaulicht werden, dass sich diese Beobachtung auch in der Interferon-vermittelten Zytokinexpression widerspiegelt. Hierzu wurden BMDMs aus Ifi203 Δ 20-54/ Δ 20-54-Mäusen sowie aus Wildtypmäusen mit denselben Stimuli wie oben behandelt, um die verschiedenen interferoninduzierenden Signalwege zu aktivieren. 18-20 h nach Stimulation wurde per ELISA IP10 im Zellüberstand quantifiziert (Abb. 22). Wie oben beschrieben, ist IP10 ein Chemokin, dessen Expression an die Interferonexpression gekoppelt ist und daher repräsentativ für Interferon bestimmt werden kann.

Im ELISA lässt sich quantitativ kein Unterschied bezüglich des produzierten IP10 zwischen den Ifi203 Δ 20-54/ Δ 20-54-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen abgrenzen. Damit bestätigt sich die These, dass die Veränderung des Ifi203-Proteins keine signifikante Reduktion der Interferon-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Aktivatoren des angeborenen Immunsystems bewirkt.

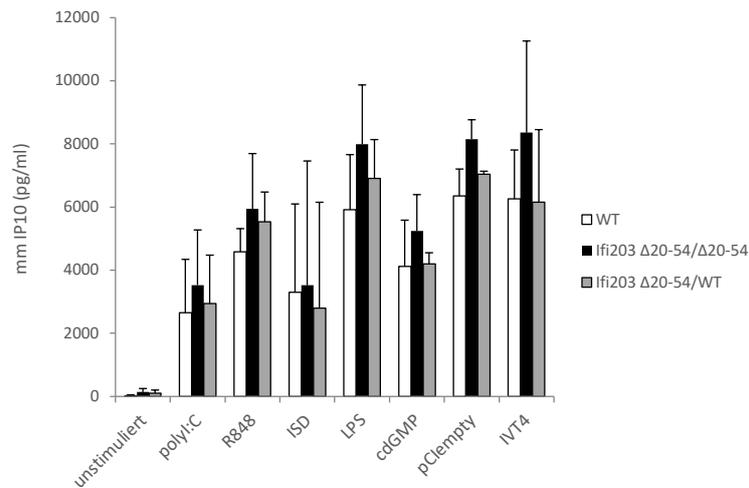


Abb. 22: Die Trunkation in Ifi203 $\Delta 20-54/\Delta 20-54$ -Mäusen bewirkt keinerlei Differenz hinsichtlich der Interferon-abhängigen Zytokinexpression

mmIP10-ELISA aus Überständen von IFI203-trunkierten versus Ifi203-WT-Zellen. Ifi203 $\Delta 20-54/\Delta 20-54$ -, Ifi203 $\Delta 20-54/WT$ -und Ifi203 WT-BMDMs wurden wie o.a. ausplattiert und mit cdGMP transfiziert. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit diene dem Zweck, die Bedeutung von Ifi203 als neu identifizierten Faktor für die STING-vermittelte Interferoninduktion nach Stimulation mit zyklischem di-GMP zu validieren.

5.1 Ifi203 scheint zu den Interferon-stimulierten Genen (ISGs) zu gehören

Wie in der Einleitung beschrieben, gehört Ifi203 der PYHIN-Proteinfamilie an, die sich unter anderem durch ihre Interferoninduzierbarkeit auszeichnet. Zur Bestätigung dieser Eigenschaft als interferoninduzierbares Gen wurden verschiedene Arten von Zellen mit unterschiedlichen Stimuli behandelt, die bekanntermaßen zu einer Produktion von Typ-I-Interferon führen, wobei es sich bei cdGMP um einen robusten STING-Liganden handelt, während IVT4 Interferon über den RIG-I-Signalweg aktiviert. In qPCR-Analysen der Extrakte aus den so stimulierten Zellen beobachtete man einen deutlichen Anstieg der Ifi203-mRNA-Expression. Somit verhält sich Ifi203 in seinem Expressionsmuster wie ein typisches ISG. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass auch andere Arbeitsgruppen die Induzierbarkeit von Ifi203 durch Interferon experimentell bestätigen konnten, so auch Gribaudo et al., die Fibroblasten verschiedener Mausstämme mit Typ-I-IFN behandelten und dann Ifi203 mittels Westernblotting nachwiesen (Gribaudo et al, 1997). Brunette et al. konnten per qPCR ebenfalls eine Zunahme an Ifi203-mRNA 6 h nach Stimulation mit Typ-I-IFN in verschiedenen murinen Zelllinien feststellen (Brunette et al., 2012).

5.2 IFI203 lokalisiert im Zellkern

Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass Ifi203 in ruhenden Zellen im Zellkern lokalisiert ist. Dies entspricht dem bisherigen Wissensstand, da für Ifi203 bereits eine NLS, eine Kernlokalisierungssequenz, beschrieben worden war (Ludlow et al., 2005) und geht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konform: So demonstrieren auch Brunette et al. (ebenfalls mit Hilfe von Immunfluoreszenz) unter stabilen Bedingungen (was in dem Fall nicht stimulierten Zellen entspricht) die vorrangige nukleäre Lokalisation von Ifi203 (Brunette et al., 2012). Auch die Arbeitsgruppe um

Gribaudo konnte, nachdem sie die Expression von Irf1 durch Behandlung mit Interferon induziert hatte, das Protein mit Hilfe von Immunoblots in nukleären Zellfraktionen nachweisen, während sie in den zytoplasmatischen Fraktionen derselben Zellen kein Irf1 finden konnten (Gribaudo et al., 1997).

5.3 Die shRNA-bedingte Repression von Irf1 führt zu einer deutlichen Reduktion der Interferoninduktion, unabhängig welcher Signalweg aktiviert wird

Mit Hilfe von shRNA-Experimente konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Inaktivierung von Irf1 die Induktion von Interferon nach Stimulation mit STING-Liganden wie cdGMP oder ISD signifikant reduzierte. Daraus lässt sich folgern, dass Irf1 für die STING-abhängige Interferoninduktion einen wichtigen Beitrag leistet und die STING-vermittelte Interferonantwort um ein Vielfaches potenziert. Die Theorie einer Synergie zwischen Irf1 und STING wird auch durch die Arbeiten anderer Arbeitsgruppen unterstützt. So wiesen Brunette et al. in Koexpressionsuntersuchungen eine Kolo-kalisation von Irf1 und STING nach. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie zeigten sie, dass beide Proteine bei Überexpression an bestimmten Strukturen im Zytosol assoziieren, die, in Analogie zu früheren Untersuchungen zur Lokalisation von STING, als STING-positive ER-Golgi-Kompartimente interpretiert wurden (Brunette et al., 2012). Auch die Arbeitsgruppe um Susan R. Ross konnte in Immunopräzipitationsversuchen zeigen, dass, wenn Irf1 und STING parallel in Zellen transfiziert werden, die beiden Proteine co-präzipitieren: In der Fraktion von Zelllysaten, die mit gegen Irf1 gerichtete Antikörpern aufgereinigt wurden, konnte die Arbeitsgruppe anschließend auch STING nachweisen. Dies setzt eine Bindung von STING an Irf1 voraus (Stavrou et al., 2015). Bei Aktivierung von STING scheint Irf1 also aus dem Zellkern ins Zytosol zu translozieren, um in direkten Kontakt mit STING zu treten. Diese Assoziation zwischen Irf1 und STING scheint die molekulare Grundlage für den Irf1-bedingten verstärkenden Effekt auf die STING-getriggerte Interferoninduktion darzustellen.

In unseren Experimenten zeigte sich allerdings auch, dass durch shRNA-vermittelte Repression von Irf1 auch die Interferoninduktion nach Stimulation mit RIG-I-Liganden wie IVT4 und Sendai-Virus kompromittiert zu sein scheint (vgl. Abb. 14). Eine Spezifität

von Ifi203 bezüglich des STING-abhängigen Signalweges lässt sich daher aus unseren Ergebnissen nicht ableiten.

5.4 Überexpression von Ifi203 ist in der Lage eine Interferonantwort zu provozieren und potenziert darüber hinaus die PRR-vermittelte Interferonantwort

Eine gängige Methode zur Untersuchung der Funktion von Proteinen ist ihre transiente Überexpression. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten konnten zeigen, dass die Überexpression von Ifi203 zu einer spontanen Produktion von Interferon führt, während die Überexpression anderer Ifi-Proteine, wie Ifi204, im Vergleich zur Kontrolle nicht zu einer verstärkten Interferonausschüttung führt.

Zudem gelang es uns auch zu zeigen, dass Ifi203 im Gegensatz zu den anderen Ifi-Proteinen durch Überexpression eine Potenzierung der Interferonantwort in Reaktion auf verschiedene Stimuli bewirkt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den Ergebnissen der Kolokalisationsstudien anderer Arbeitsgruppen (Brunette et al., 2012; Stavrou et al., 2015), die jeweils begründeten Anhalt für einen Synergismus zwischen Ifi203 und STING boten. Allerdings konnten wir in unseren Versuchen keine PRR-spezifische Funktion für Ifi203 nachweisen: vielmehr deuteten unsere Ergebnisse daraufhin, dass Ifi203 als Verstärker unterschiedlicher von PRRs ausgelösten Signalkaskaden dient und so zu einer optimierten Interferoninduktion führt.

5.5 In dem von uns etablierten Mausmodell lässt sich keine Relevanz von Ifi203 für die Immunabwehr nachweisen

Um zu belegen, dass Ifi203 auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle bei der Aktivierung des STING-Signalweges spielt, etablierten wir ein Modell basierend auf murinen Primärmakrophagen aus Mäusen, die ein mutiertes Ifi203-Allel tragen. Setzt man diese Zellen verschiedenen interferoninduzierende Stimulanzen aus, produzieren sie im Vergleich mit Wildtyp-Zellen, die ein funktionales Ifi203 exprimieren, nicht signifikant weniger Interferon. Die Ifi203-Trunkation scheint demnach keine Auswirkungen auf eine effektive pathogenassoziierte Interferoninduktion zu haben. Dieser fehlende Effekt

manifestierte sich nicht nur nach Stimulation mit STING-Liganden, sondern auch nach Stimulation mit Liganden, die Interferon über Signalwege abseits von STING induzieren. Andere Arbeitsgruppen kommen zum selben Ergebnis: Spyridon Stavrou et al. arbeiteten mit Knochenmarksmakrophagen aus BL/6-Mäusen und DBA/2-Mäusen, wobei sich die DBA/2-Mäuse dadurch auszeichnen, dass ihre BMDMs nur sehr geringe Mengen an Ifi203 exprimieren. Die Gruppe konnte zeigen, dass sich die Interferonantwort der DBA/2-Mäusen nach Stimulation mit LPS, einem TLR-Liganden, im Vergleich zu den BMDMs aus BL/6-Mäusen nicht signifikant unterscheidet (Stavrou et al., 2015).

Eine maßgebende Arbeit zur Evaluation der PYHIN-Proteine hinsichtlich ihrer Bedeutung für die STING-abhängige DNA-induzierte Interferonantwort, die parallel zu unseren Untersuchungen veröffentlicht wurde, stammt aus der Arbeitsgruppe um Daniel B. Stetson (Gray et al., 2016). Um die Funktion der PYHIN-Proteine zu definieren, generierten die Autoren *ALR*^{-/-}-Mäuse, denen der gesamte Genabschnitt auf Chromosom 1, der für alle 13 PYHIN-Gene codiert, fehlt. Die Zellen, die aus diesen Mäusen kultiviert wurden, stimulierte man mit dsDNA. Im Vergleich zur Kontrolle war die gemessene Interferonantwort nach Stimulation mit dsDNA in den *ALR*^{-/-}-Zellen nicht inhibiert. Die Autoren folgern daraus, dass die PYHIN-Proteine im Gegensatz zu cGAS für die Interferoninduktion nach Stimulation mit dsDNA entbehrlich sind.

5.6 Offene Fragen

In der resümierenden Betrachtung unserer Untersuchungen kann keine essentielle Bedeutung von Ifi203 für die STING-abhängige Interferoninduktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind damit kongruent zu denen anderer Arbeitsgruppen, die Ifi203 wie auch andere PYHIN-Proteine als obsolet für die Erkennung von dsDNA beschreiben (Gray et al., 2016).

5.6.1 Mögliche Erklärungen für die diskrepanten Ergebnisse bezüglich Ifi203

Unseren Ergebnissen zufolge scheint Ifi203 im Mausmodell keinen Einfluss auf die Interferonproduktion nach PRR-Stimulation zu haben. Dies wirft allerdings die Frage auf,

wie es sein kann, dass die shRNA-vermittelte Repression des Proteins die Interferonantwort in Mausmakrophagen deutlich reduziert (vgl. Abb. 13). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der transiente Funktionsverlust von Ifi203, wie er durch shRNAs bewirkt wird, einen anderen biologischen Effekt hervorruft als der komplette Verlust des Proteins. Womöglich sind die Zellen in der Lage, diesen dauerhaften Defekt langfristig (durch noch zu klärende Mechanismen) zu kompensieren. Wie bereits in der Einleitung veranschaulicht, zeichnet sich das angeborene Immunsystem, die PYHIN-Proteinfamilie eingeschlossen, durch eine enorme Komplexität aus, welche sich im Laufe der Evolution durch den permanent herrschenden hohen Selektionsdruck entwickelt hat. Es ist denkbar, dass sich dabei auch (sozusagen als Sicherheitsmaßnahme) verschiedene Mechanismen entwickelt haben, welche hinsichtlich ihrer Wirkung redundant sind. Träfe dies zu, kämen im Falle eines defizienten Ifi203s mit einer gewissen Latenzzeit Kompensationsmechanismen in Gang, welche den Ausfall von Ifi203 als Modulator der PRR-assoziierten Interferonantwort ausgleichen sollten. Ein Beispiel für ein solches Phänomen ist eine Studie, in der das Gen *egfl7* im Zebrafisch entweder ausgeknockt oder transient mittels morpholino-Technologie in seiner Translation inhibiert wurde. *Egfl7* ist ein Gen, das für ein endotheliales Protein der extrazellulären Matrix codiert. Während *egfl7*-Knockout-Tiere keine phänotypischen Defekte aufwiesen, zeigten Tiere, bei denen die *egfl7*-Translation transient inhibiert wurde, starke Defekte im vaskulären System (Rossi et al., 2015).

Weiterhin steht die fehlende Relevanz von Ifi203 im Mausmodell im Widerspruch zu unseren Überexpressionsexperimenten, in welchen die transiente Überexpression von Ifi203 in HEK 293T-Zellen (allein oder in Kombination mit interferoninduzierenden Faktoren) zu einer signifikanten Induktion von Interferon führt (vgl. Abb. 15-17).

Es könnte sein, dass diese Diskrepanz darauf zurückzuführen ist, dass die künstliche Überproduktion von Proteinen in HEK 293T-Zellen die realen Signaltransduktionsbedingungen nur unzureichend widerspiegelt. HEK 293T-Zellen, die ja bevorzugt als Modellzelllinie eingesetzt werden, zeichnen sich dadurch aus, dass sie entscheidende Komponenten des innaten Immunsystems physiologischerweise nicht exprimieren. Dies ist von Vorteil, wenn man einzelne Bestandteile der DNA-Erkennung im Detail untersuchen will. Wenn man aber davon ausgeht, dass der STING-Signalweg mit Hilfe

eines komplexen Netzwerkes einander regulierender Faktoren gesteuert wird, mag ein HEK-basiertes Zellmodell nicht ausreichen, um diese Komplexität der STING-abhängigen Interferoninduktion realistisch abzubilden. So beobachteten auch Almine et al., dass in HEK 293T-Zellen STING durch Überexpression von cGAS oder cGAMP alleine oder alternativ auch durch IFI16 alleine aktiviert werden kann. In Keratinozyten hingegen erforderte die Signalweiterleitung von STING die parallele Stimulation sowohl IFI16 als auch von cGAS (Almine et al., 2017). Ähnliches gilt für den Rezeptor RIG-I, wo bereits durch die spezifischen Anforderungen an die passenden Liganden (s.2.3.14) die enorme Komplexität dieser Signalkaskade zum Ausdruck kommt. Auch hier vermag die künstliche parallele Ifi203- und RIG-I-Stimulation der nicht-spezialisierten HEK-Zellen nicht, die hochentwickelten Abläufe in den Zellen des angeborenen Immunsystems wiederzugeben.

5.6.2 Die von uns beobachtete Steigerung der Interferonproduktion durch Ifi203 könnte auf einen Priming-Effekt zurückzuführen sein

Die von uns konstatierte signifikante Potenzierung der Interferonantwort durch die transiente Überexpression von Ifi203 könnte möglicherweise auf einen Priming-Effekt zurückzuführen sein. Unter „*priming*“ versteht man in der Immunologie zweistufige Aktivierungsprozesse, bei denen die Vorbehandlung mit einem ersten Stimulus die nachfolgende Aktivierung mit dem eigentlichen zweiten Stimulus potenziert oder sogar erst ermöglicht. So „primt“ beispielsweise IFN- γ (Signal 1) Makrophagen für eine schnellere und stärkere Reaktion in Antwort auf LPS (Signal 2; Lipopolysaccharid aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, ein TLR-Ligand): durch IFN- γ verschiebt sich die Dosis-Wirkungsbeziehung derart, dass bereits geringere Dosen von LPS ausreichen um die Transduktion bestimmter antimikrobieller Gene zu induzieren (z.Bsp. die Induktion von iNOS durch LPS; Costelloe et al., 1999). Für die Induktion bestimmter anderer Gene ist das IFN- γ -Priming sogar Voraussetzung, wie z.Bsp. für die Induktion von iNOS als Reaktion auf CpG-DNA, dessen Genprodukt durch die Bildung von Stickstoffmonoxid antibakterielle Wirkung hat (Sweet et al., 1998).

Die molekulare Grundlage für diesen Priming-Effekt wird auf mehreren Ebenen gelegt: So führt IFN- γ zunächst zu einer Hochregulation der entsprechenden Rezeptoren und

Korezeptoren für LPS bzw. CpG. Darüber hinaus induziert IFN- γ die Expression von Adaptermolekülen der entsprechenden Signalwege und zuletzt wird auch die Induktion der abhängigen Transkriptionsfaktoren stimuliert (Schroder et al., 2006). Die verstärkte Interferoninduktion nach Überexpression von Ifi203 könnte auf ähnlichen Mechanismen beruhen. Es ist denkbar, dass die Überexpression von Ifi203 die Transkription von Adaptermolekülen des Interferonsignalweges induziert, sodass die Zellen in einen hyperreagiblen Zustand versetzt werden. Die Überexpression von Ifi203 versetzt Zellen also in einen aktivierten Zustand, in dem die Schwelle zur Induktion von Interferon durch einen normalerweise suboptimalen Aktivator deutlich herabgesetzt wird. Wie dieses Ifi203-Priming im Detail vonstattengeht, bliebe im Detail allerdings noch zu klären. Unabhängig davon ist zu klären, wieso dieser mutmaßliche Priming-Effekt nur bei transienter Expression zum Vorschein kommt, wohingegen er im Rahmen der Analyse von WT-Zellen bzw. IFI203-Defizienz nicht in Erscheinung tritt.

5.6.3 Möglicherweise bewirkt die Zinkfinger-basierte Mutation von IFI203 keinen vollständigen Funktionsverlust des Proteins

In Anbetracht der offensichtlichen Diskrepanz zwischen den Ergebnissen unserer Experimente mit transienter Ifi203-Überexpression bzw. transientem Verlust und den Versuchen mit Ifi203-defizienten Mauszellen muss natürlich auch diskutiert werden, ob die Zinkfinger-basierte Mutation in den verwendeten Mausmakrophagen tatsächlich einen Funktionsverlust des Proteins bewirkt. Wie in den qPCR-Daten ersichtlich, führt die Mutation zu keiner verminderten Expression von Ifi203. Das ist bei einer in-frame Deletion zu erwarten, zumal das exprimierte mRNA-Transkript den „Qualitätskriterien“ einer mRNA entspricht und somit nicht über Mechanismen des NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) abgebaut wird. Die durch die Zinkfingernuklease bewirkte Deletion sollte allerdings zu einem nicht-funktionalem Protein führen. So wird die N-terminale Pysin-Domäne, von der wir ausgehen, dass sie für die Funktion von Ifi203 relevant ist, so trunziert, dass die normale *six alpha helical-bundle*-Struktur der Pysin-Domäne zerstört wird.

Um eine eventuelle Restfunktion des kompromittierten Ifi203s hundertprozentig auszuschließen, ist formal allerdings noch die Generierung veritabler Knockout-Mäuse von Nöten. Erst damit wäre die definitive Validierung der Bedeutung von Ifi203 vollständig.

5.7 Obwohl IFI203 für die Interferoninduktion nach Erkennung zytosolischer DNA nicht essentiell ist, sprechen doch einige Punkte für eine Funktion des Proteins für das angeborene Immunsystem

Trotz der Erkenntnis, dass Ifi203 für die Induktion einer potenten Interferonantwort nicht unabdingbar ist, verbleiben Gründe zur Annahme, dass Ifi203 eine Rolle in der Abwehr viraler und bakterieller Erreger spielt, auch wenn diese eher von additivem Charakter sein könnte. Zum einen lässt sich Ifi203, wie auch die anderen PYHIN-Proteine, durch Interferon, welches ja ein zentrales Zytokin des angeborenen Immunsystems darstellt, induzieren (Brunette et al., 2012). Zu dieser potentiellen antiinfektiven Wirkung passt auch das von Cridland et al. demonstrierte Verteilungsmuster der basalen Ifi203-Expression in unterschiedlichen Gewebeproben des murinen Organismus. Im Vergleich zu anderen Geweben wie Niere, Herz, quergestreifter Muskel, Leber, Lunge oder Haut, zeigte sich die stärkste basale Expression von Ifi203 in der Milz. Die Milz (oder genauer gesagt: die weiße Milzpulpa) zählt klassischerweise zu den sekundären lymphatischen Organen, d.h. hier findet die Antigenpräsentation statt, die die Aktivierung immunkompetenter Lymphozyten zur Folge hat. Die Tatsache, dass Ifi203 in der Milz stärker exprimiert wird als in sonst einem der untersuchten Gewebe, unterstreicht seine Bedeutung für die Immunabwehr (Cridland et al., 2012).

Neben der Eigenschaft, Interferon-abhängig exprimiert zu werden, sprechen auch der strukturelle Aufbau sowie die subzelluläre Lokalisation dafür, dass Ifi203 an der Interferoninduktion nach Detektion bakterieller oder viraler DNA beteiligt ist. So besitzt Ifi203, wie oben beschrieben, eine HIN-Domäne, die in Analogie zu den HIN-Domänen anderer Mitglieder der Pyrin-Proteine in der Lage, ist DNA sequenzunabhängig zu binden (Hornung et al., 2009; Jin et al., 2012; Unterholzner et al., 2010). Die Pyrin-Domäne hingegen ist grundsätzlich geeignet für Protein-Protein-Interaktionen.

In ruhenden Zellen siedelt Ifi203 sich im Zellkern an. Diese zelluläre Sublokalisierung von Ifi203 könnte insofern einen Hinweis auf eine mögliche Bedeutung von Ifi203 für die

antivirale Immunabwehr darstellen, da die Replikation vieler DNA-Viren im Zellkern stattfindet, wo sich die Viren der Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle bedienen. Es ist vorstellbar, dass ruhendes Ifi203 im Zellkern lokalisiert ist, um dort beim Auftreten pathogener Intermediate im Rahmen der viralen Replikation zu agieren.

Darüber hinaus konnte durch Immunpräzipitation und Colokalisationsstudien veranschaulicht werden, dass Ifi203 und STING bei Überexpression im Zytosol assoziieren, was auf eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen hindeutet (Brunette et al., 2012; Stavrou et al., 2015). Der genaue Mechanismus, der dieser Interaktion zu Grunde liegt, ist allerdings noch nicht bekannt. Da STING eine offensichtliche Pyriindomäne fehlt, die eine Pyrin-Pyrin-Wechselwirkung ermöglichen würde, muss der Sachverhalt komplexer sein. Zudem weiß man heute auch, dass auf molekularer Ebene eine Vielzahl an Mechanismen existieren, die alle regulierend auf STING einwirken. Neben der Konformationsänderung, die durch die Bindung von cGAMP ausgelöst wird, wird die STING-vermittelte Signalweiterleitung z.B. auch durch Ubiquitinierungen oder Phosphorylierungen durch die *TANK-binding kinase 1* (TBK1) und andere Kinasen positiv oder negativ beeinflusst (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2012; Zhong et al., 2009).

5.7.1 Möglicherweise agiert IFI203 *downstream* der PRRs

In Anbetracht unserer Ergebnisse sowie den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen spricht wenig dafür, dass die PYHIN-Familie überhaupt eine Rolle in der Erkennung von Fremd-DNA und der darauffolgenden Interferonantwort spielt. Es lässt sich jedoch nicht von der Hand weisen, dass mehrere Gruppen gesehen haben, dass die Überexpression von IFI-Proteinen einen positiven Effekt auf die Interferoninduktion ausübt, und zwar unabhängig von der stimulierten PRR-Kaskade. Die PYHIN-Proteine (in unserem Fall IFI203) scheinen demzufolge bei Überexpression einen positiven regulatorischen Effekt auszuüben, der sich *downstream* der bekannten PRRs auswirkt. Zu dieser These passt wiederum die nukleäre Sublokalisierung von IFI203: so könnte IFI203 beispielsweise eine Verstärkung der Interferonantwort dadurch bedingen, dass es im Kern mit anderen

Transkriptionsfaktoren kooperiert, und somit Einfluss auf die antivirale Genexpression nehmen.

Diese These wird auch durch die Ergebnisse von Crow und Cristea bekräftigt, die die antivirale Wirkung des humanen PYHIN-Proteins IFIX untersuchten. Die Autoren erklären, dass IFIX die Expression viraler Gene supprimiert, da erhöhte Expressionslevels von IFIX unmittelbar negative Auswirkungen auf die frühen Stufen des Replikationszyklus von HSV-1 haben. Zudem interagiert IFIX vor allem mit Proteinen, die in Prozesse wie Transkription bzw. Chromatin- oder mRNA-Regulierung involviert sind. IFIX scheint also ebenfalls an der transkriptionellen Regulation viraler Genexpression beteiligt zu sein (Crow und Cristea, 2017).

In diesem Sinne postuliert auch die Arbeit von Ghosh et al., dass den PYHIN-Proteinen eine wichtige Rolle bei der Genregulation des angeborenen Immunsystems zukommt. Ghosh et al. demonstrierten, dass das murine PYHIN-Protein p205 auf Transkriptionsebene die Expression des Inflammasom-Adaptormoleküls Asc (*apoptosis-associated speck-like molecule containing CARD domain*) kontrolliert und somit die Inflammasom-abhängige Spaltung von IL-1 β reguliert (Ghosh et al., 2017).

Es bleibt allerdings unklar, weshalb sich dieser antivirale Effekt in Ifi203-defekten bzw. ALR^{-/-}-Mäusen nicht nachvollziehen lässt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es bestimmte Stimulationsbedingungen gibt, unter denen sich eventuell doch ein quantitativer Unterschied bezüglich der Interferoninduktion in den Ifi203-defizienten Mäusen demarkieren würde. Denkbar wäre, dass das entsprechende Substrat, in dessen Erkennung Ifi203 involviert ist, nicht zu den gängigen, im Labor getesteten Pathogenen gehört. Vielleicht handelt es sich dabei um ein bestimmtes Virus, welches man dann tatsächlich in den angeführten *in vitro*-Assays übersehen würde.

Damit wäre auch zu diskutieren, ob es sich bei Ifi203 und den damit assoziierten Resistenzmechanismen um ein genetisches Überbleibsel handelt, welches ursprünglich gegen ein Virus oder einen anderen pathogenen Erreger gerichtet war, welcher im Laufe der Evolution an Relevanz verloren hat.

5.7.2 Eventuell resultieren die divergierenden Ergebnisse aus zelltypspezifischen Unterschieden der Funktion von Ifi203

Die oben angeführten entwicklungsgeschichtlichen Analysen offenbaren eine enorme Diversität innerhalb der PYHIN-Familie, die Hinweise auf einen hohen Selektionsdruck, welchem die PYHIN-Proteine ausgesetzt sind, liefern (Brunette et al., 2012; Cridland et al., 2012). Dieser Selektionsdruck könnte auf schnell evolvierende DNA-Viren zurückzuführen sein, insbesondere im murinen System (Gray et al., 2016). Unter Berücksichtigung der außerordentlichen Komplexität der Genfamilie ist es durchaus vorstellbar, dass Ifi203 in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Rollen bei der Interferoninduktion übernimmt. Zu dieser Annahme passen auch die oben zitierten Arbeiten von Almine et al. und Jønsson et al.. Während die eine Arbeitsgruppe demonstrierte, dass IFI16 in Makrophagen aktiv zur Produktion von cGAMP durch cGAS beiträgt (Jønsson et al, 2017), nimmt, laut den Ergebnissen von Almine et al., IFI16 in Keratinozyten keinen unmittelbaren Einfluss auf die Produktion von cGAMP (Almine et al., 2017). Parallel zu IFI16 könnte eben auch Ifi203 in Fibroblasten eine andere Funktion übernehmen als in den von uns untersuchten, IFI203-trunkierten Makrophagen. Dies wäre eine potentielle Erklärung dafür, dass in unserem siRNA-Screen Ifi203 als entscheidende Komponente des STING-abhängigen Interferonsignalweges in Fibroblasten erscheint, während in Makrophagen keine Relevanz von Ifi203 nachweisbar ist.

5.7.2.1 Beim Menschen scheint das PYHIN-Mitglied IFI16 als Cofaktor zu cGAS verstärkend auf die Aktivierung von STING und das weitere *downstream signaling* einzuwirken

Die Signalübertragung via STING wird also durch ein komplexes Netzwerk an regulierenden Faktoren gesteuert. Zuletzt veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Leonie Unterholzner Untersuchungen, in denen sie zeigten, dass IFI16, ein humanes Mitglied der PYHIN-Familie, in menschlichen Keratinozyten einen entscheidenden Beitrag für die Interferoninduktion nach Stimulation mit DNA leistet. Gemäß ihren Beobachtungen scheint IFI16 sowohl die Aktivierung von STING durch cGAMP als auch für die

Signaltransmission durch Phosphorylierung und anschließende Translokation von STING erforderlich zu sein (Almine et al, 2017). Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe um M.R. Jakobsen: Sie demonstrierten ebenfalls, dass IFI16 neben cGAS in menschlichen Makrophagen für die Stimulation von STING durch exogene DNA unbedingt essentiell ist, indem es maßgeblich zur optimalen Produktion von cGAMP beiträgt. Zudem zeigten sie, dass IFI16 die Phosphorylierung von STING durch aktive Rekrutierung von TBK1 initiiert (Jønsson et al, 2017). Beide Arbeitsgruppen kommen zu dem Schluss, dass IFI16 als Cofaktor der cGAMP-cGAS-STING-Achse fungiert und damit eine zusätzliche Kontrollinstanz darstellt, um fehlgeleitete Immunantworten zu verhindern.

5.7.2.2 Die Bedeutung von IFI16 für die Erkennung zytosolischer DNA ist in der Literatur umstritten

Es muss allerdings angemerkt werden, dass in der Literatur divergierende Einschätzungen der Bedeutung von IFI16 hinsichtlich der Erkennung zytosolischer DNA existieren.

In der Einleitung wurde das humane PYHIN-Protein IFI16 bereits kurz eingeführt. IFI16 wurde erstmals in einer Arbeit von Leonie Unterholzner als vermeintlicher DNA-Rezeptor vorgestellt. Unterholzner et al. verwendeten ein vom Vaccinia-Virus abgeleitetes, interferoninduzierendes DNA-Motiv, um aus Zellextrakten humaner Monocyten DNA-bindende Proteine aufzureinigen (Unterholzner et al., 2010). Bei Vaccinia-Virus handelt es sich um ein künstlich hergestelltes DNA-Virus mit doppelsträngigem Genom, das eine enge Verwandtschaft zum Variola-Virus (*Orthopoxvirus variola*) und Kuhpockenvirus (*Orthopoxvirus bovis*) aufweist und dementsprechend zur Familie der Pockenviren (*Poxviridae*) gerechnet wird. Neben virologischen Experimenten findet Vaccinia-Virus auch Einsatz bei Pockenschutzimpfungen. Unterholzner et al. konnten in ihrer Arbeit IFI16 als Faktor identifizieren, der nicht nur in der Lage ist, mit der Interferon-stimulierenden DNA zu interagieren, sondern weiterhin auch noch das Adaptermolekül STING zu rekrutieren. Darüber hinaus zeigten Unterholzner et al. in weiteren *in vitro*-Experimenten, dass IFI16 für die Interferoninduktion in humanen Zellen nach Infektion mit HSV-1 von essentieller Bedeutung ist. Als Konsequenz aus diesen Beobachtungen wurde IFI16 als

neuer DNA-Sensor charakterisiert, der in Anwesenheit viraler DNA über den STING-Signalweg zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und anschließender Induktion von Interferon führt. Neben HSV-1 konnten andere Arbeitsgruppen auch eine Beteiligung von IFI16 in der Erkennung anderer DNA-Viren wie Humanes Herpesvirus Typ 8 (HHV-8, oder auch KSHV = Kaposi-Sarkom-Herpesvirus genannt) (Kerur et al., 2011), Epstein-Barr-Virus (EBV) (Ansari et al., 2013) und HIV (Jakobsen et al., 2013) nachweisen.

Im Gegensatz zu diesen Resultaten steht die Arbeit von Gray et al., die zum einen demonstrieren, dass keines der beschriebenen murinen genetischen Korrelate zu IFI16 für die DNA-abhängige Interferoninduktion essentiell ist. Zum anderen konnten Gray et al. nicht bestätigen, dass die Interferonantwort in Reaktion auf eine Infektion mit humanem Cytomegalievirus von IFI16 abhängig ist (Gray et al., 2016).

Andere Arbeiten zeigten, dass IFI16 vielmehr auf transkriptioneller Ebene regulatorisch auf die Produktion von Typ-I-Interferon einwirkt. So demonstrierten Thompson et al., dass Zellen mit stabilem IFI16-Knockdown nicht nur auf die Exposition mit DNA mit einer vergleichsweise reduzierten Interferonantwort reagieren, sondern auch nach Stimulation mit cGAMP und RIG-I-Liganden wie Sendai-Virus. Wie in der Einleitung beschrieben, wird der Botenstoff cGAMP von dem Rezeptor cGAS anlässlich der Erkennung von DNA im Zytosol produziert, um dann STING direkt zu aktivieren. RIG-I hingegen ist für die Erkennung von Triphosphat-RNA und die konsekutive Interferoninduktion verantwortlich. In beiden Fällen hängt die Interferonproduktion also nicht von der Funktion von IFI16 als DNA-Sensor ab, sondern IFI16 muss hier auf andere Weise auf die Induktion von Typ-I-Interferonen einwirken.

Neben einer reduzierten Interferonantwort sah die Arbeitsgruppe um Thompson auch eine deutliche verringerte Expression von ISGs in IFI16-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen. Durch Vorbehandlung mit Interferon konnte in den IFI16-Knockdowns wieder eine ISG-Produktion von normalem Ausmaß hergestellt werden, nicht jedoch durch Stimulation mit RIG-I-Liganden. Dies bedeutet, dass die IFI16-Knockdown-Zellen noch durchaus in der Lage sind, auf Interferon zu reagieren, aber in Abwesenheit von IFI16 keine robuste Interferonantwort mit resultierender Induktion von ISGs produzieren können. Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten Thompson et al., dass im Gegenzug

die ektope Expression von IFI16 in HEK 293T-Zellen zu einer signifikant höheren Expression von Typ-I-Interferonen führt. Da HEK 293T-Zellen natürlicherweise kein STING exprimieren, spricht auch dieses Ergebnis, im Gegensatz zu denen früherer Arbeiten, dafür, dass IFI16 unabhängig vom STING-Signalweg zur Induktion von Typ-I-Interferonen führen kann. Basierend auf weiteren Versuchen entwerfen Thompson et al. ein Modell, das besagt, dass IFI16 regulierend auf die Transkription von Typ-I-Interferonen einwirkt, indem es (wahrscheinlich zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren und Co-Regulatoren) an die Promotor-Region von Interferon-alpha bindet. ChIP-Analysen (Chromatin-Immunopräzipitation) der Arbeitsgruppe um Thompson lieferten Hinweise, dass IFI16 für die Positionierung der RNA Polymerase II (POL II) an der Promotorregion von Interferon-alpha sorgt.

Die Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Funktion von IFI16 könnte der Tatsache geschuldet sein, dass das Protein in Abhängigkeit vom Zelltyp in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird und zusätzlich in unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen vorkommt. Die durch IFI16-bewirkten Effekte hinsichtlich der Interferoninduktion scheinen maßgeblich sowohl vom Expressionslevel als auch von der jeweiligen Lokalisation (nukleär oder zytoplasmatisch) abzuhängen. So kann scheinbar die Immunantwort in Reaktion auf virale DNA über Induktion und Translokation von IFI16 feinjustiert werden, wodurch auch überschießende Reaktionen verhindert werden könnten. In Analogie zu diesen Erkenntnissen könnte auch Ifi203 in Abhängigkeit vom Zelltyp durchaus differentielle Eigenschaften und Funktionen innehaben. Zur Klärung dieser Fragen sind noch weitere Untersuchungen nötig.

5.7.2.3 Es gibt begründeten Anhalt zur Annahme, dass Ifi203 das murine Äquivalent zu IFI16 ist

Auf Grund des gleichartigen strukturellen Aufbaus schien es zunächst naheliegend, dass Ifi204 das murine Äquivalent zum humanen DNA-Sensor IFI16 darstellt. Beide Proteine besitzen eine einzelne Pyrin-Domäne, sowie eine HINA- und eine HINB-Domäne. Diese Annahme wurde noch durch die Tatsache gestützt, dass IFI16 das einzige humane PYHIN-Protein ist, das eine HINB-Domäne aufweist. Unterholzner et al. konnten dann

auch zeigen, dass der Knockdown von Ifi204 durch siRNA eine signifikante Abnahme der IFN- β -Produktion nach Stimulation mit von HSV-1 und Vaccinia-Virus abstammenden DNA-Motiven bewirkt. Diese Tatsache bestätigte Unterholzner und Kollegen in der Annahme, Ifi204 sei das murine Pendant zum DNA-Sensor IFI16 (Unterholzner et al., 2010).

Allerdings brachten neue phylogenetische Untersuchungen durch Abgleich der Gensequenzen der HIN-Domänen zutage, dass Ifi204 und IFI16 nicht direkt ortholog sind. Die Verdopplung der HIN-Domänen in beiden Spezies ist vielmehr auf jeweils unabhängige Expansionen zurückzuführen (Cridland et al., 2012; Brunette et al., 2012). So lassen sich in keiner anderen Säugerart ein solches Tandem aus HIN-Domänen finden, was eher für zufällige Ereignisse bei Mensch und Maus als für eine Abstammung von einem gemeinsamen Vorfahren spricht. Überhaupt ergibt sich aus den phylogenetischen Analysen der PYHIN-Proteine, dass mit Ausnahme von Aim2 generell die Verwandtschaft zwischen den PYHIN-Genen einer Spezies enger ist als zu den potentiell orthologen Genen anderer Arten.

Unter dem Eindruck dieser Erkenntnisse müssen bisherige Mutmaßungen bezüglich Orthologien unter den PYHIN-Mitgliedern und insbesondere zwischen IFI16 und Ifi204 neu überdacht werden. Zusätzlich kamen Brunette et al. in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass Ifi204 zwar als Cofaktor zur antiviralen Immunantwort beitragen kann, aber für die Aktivierung des STING-abhängigen Signalweges keinesfalls essentiell ist.

Selbst wenn, abgesehen von Aim2, direkte Orthologien zwischen den einzelnen PYHIN-Genen fehlen, ist doch davon auszugehen, dass sie, zumindest teilweise, nach demselben Prinzip funktionieren und dass durch die genauere Untersuchung eines PYHIN-Vertreters auch Einblicke in die Funktionsweise der anderen gewonnen werden können. Angesichts der fundamentalen Bedeutung, die Ifi203 laut den Ergebnissen dieser Arbeit für die STING-vermittelte Interferonantwort offenbar hat, scheint ein Vergleich möglicher Analogien zwischen Ifi203 und IFI16 lohnenswert. Dafür spräche auch der Umstand, dass die HINB-Domäne von IFI16 eine höhere Affinität zu DNA aufweist als die HINA-Domäne, die alleine nicht im Stande war, DNA effektiv zu binden, und Ifi203 ebenfalls eine HINB-Domäne besitzt. Allerdings zeigte dieselbe Arbeit auch, dass das

Tandem aus HINA und HINB-Domäne noch effektiver an DNA bindet als die HINB-Domäne alleine (Unterholzner et al., 2010).

6. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem ist für die erste und schnelle Reaktion des Organismus auf bakterielle, virale und mukoide Pathogenitätsfaktoren verantwortlich. Eine effektive Immunantwort erfordert die konzertierte Aktion diverser Zellen und löslicher Botenstoffe, wobei der Zytokinfamilie der Typ-I-Interferone eine zentrale Rolle zukommt. Ausgangspunkt jeder Immunantwort, die zur Ausschüttung von Interferon führt, ist dabei die zuverlässige und spezifische Erkennung von Pathogenen durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Diese sogenannten *Pattern recognition receptors* detektieren die Anwesenheit bakterieller oder viraler Organismen anhand bestimmter mikrobieller Antigene, den MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*). Vertreter dieser heterogenen Gruppe, die als Liganden für PRRs fungieren können, sind beispielsweise zytosolische Nukleinsäuren oder auch zyklische Dinukleotide.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war ein genomweiter RNAi-Screen mit dem Zweck, die molekularen Grundlagen der defensiven Immunantwort nach Detektion zyklischer Dinukleotide zu entschlüsseln. Mit Hilfe dieser Screeningmethode gelang es uns, das Interferon-induzierbare Protein IFI203 als potentiellen Regulator der PRR-vermittelten Interferoninduktion zu identifizieren. Vor diesem Hintergrund sollte es Zielsetzung dieser Arbeit sein, die Bedeutung von Ifi203 für die angeborene Immunabwehr von Pathogenen zu validieren.

Hierzu sollten zunächst die Eigenschaften von IFI203 als interferon-induzierbares Protein dargelegt werden. In einem ersten Schritt wurde demonstriert, dass IFI203 im Zellkern lokalisiert ist. Weiterhin konnten wir die Induzierbarkeit des Ifi203-Gens durch Interferon in Zellen des angeborenen Immunsystems veranschaulichen, indem wir zeigten, dass die Stimulation von Makrophagen mit Interferonaktivatoren zu einer gesteigerten Ifi203-Expression führt.

Im Anschluss galt es die eigentliche Funktion von Ifi203 als Komponente des angeborenen Immunsystems zu präzisieren sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzudecken. In mehreren *in vitro*-Experimenten konnte dargelegt werden, dass der Knockdown von Ifi203 zu einer signifikanten Reduktion der Interferonexpression nach Stimulation mit verschiedenen STING-Liganden führt. Darüber hinaus konnten wir

demonstrieren, dass die Überexpression von Ifi203 *in vitro* sowohl eine spontane Interferoninduktion triggert als auch die Interferonantwort nach Stimulation mit Interferonaktivatoren deutlich potenziert. Außerdem konnten wir veranschaulichen, dass diese immunstimulatorische Aktivität des IFI203-Proteins von der Pyrimidomäne abhängig zu sein scheint.

Um die Relevanz von Ifi203 auch *in vivo* demonstrieren, wurde mit Hilfe der ZFN-Technologie eine Ifi203-defiziente Maus generiert. In den *ex vivo* durchgeführten Zellversuchen konnte allerdings kein signifikanter Effekt eines Ifi203-Verlustes auf die Induktion von Interferon nachgewiesen werden.

Zusammenfassend scheint Ifi203 für den Aufbau einer potenten Interferonantwort in der Gegenwart von Krankheitserregern obsolet zu sein. Obwohl sich in unseren Überexpressionsexperimenten zunächst eine Relevanz des Proteins für die Induktion von Interferon in Reaktion auf bestimmte Pathogensurrogate abzeichnete, hat der Verlust des funktionstüchtigen Proteins im Mausmodell keinerlei Effekt auf die Immunantwort.

In Zukunft muss es ein vorrangiges Anliegen sein, eine Stimulations- oder Infektionsbedingung in Ifi203-defizienten oder ALR^{-/-}-Mäusen zu identifizieren, in der sich in Abhängigkeit der Anwesenheit einzelner Ifi-Proteine eine Differenz in der antimikrobiellen Aktivität beobachten lässt. Erst dann erscheint es sinnvoll, weitere biochemische oder zellbiologische Untersuchungen anzustellen, die die Rolle von Ifi203 genauer beleuchten.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der STING-Ligand zyklisches di-GMP	35
Abb. 2: Sequenz und Sekundärstruktur von IVT4	38
Abb. 3: Genomweiter siRNA-Screen identifiziert Ifi203 als Faktor, dessen Funktionsverlust die Interferonantwort nach Stimulation mit zyklischem di-GMP ähnlich stark inhibiert wie das Adaptermolekül TBK1 und der Transkriptionsfaktor IRF3	40
Abb. 4: Übersicht über die Mitglieder der murinen PYHIN-Proteinfamilie	43
Abb. 5: Phylogenetische Entwicklung der PYHIN-Familie	46
Abb. 6: Von der Luciferase katalysierte Reaktion	56
Abb. 7: Prinzip PCR	62
Abb. 8: Schema des Gen-Knockdowns via ZFN	66
Abb. 9: Prinzip Elisa-Sandwich-Methode	68
Abb. 10: Prinzip der RNA-Interferenz	71
Abb. 11: IFI203 lokalisiert im Zellkern	76
Abb. 12: Stimulation mit Interferon-Aktivatoren führt zur gesteigerten Ifi203-Expression	78
Abb. 13: Der Ifi203-spezifische Knockdown in J774-Makrophagen führt zu einer signifikanten Reduktion der Interferon-Expression nach Stimulation mit verschiedenen STING-Liganden	80
Abb. 14: Der Ifi203-spezifische Knockdown resultiert auch unabhängig vom STING-Signalweg in einer beeinträchtigten Interferonantwort	81
Abb. 15: Überexpression von Ifi203 führt im Gegensatz zu anderen Ifi-Proteinen zur Induktion von Interferon in HEK 293T-Zellen	83
Abb. 16: Die shRNA-getriggerte Interferoninduktion lässt sich durch Ifi203-Überexpression deutlich potenzieren	85

Abb. 17: Überexpression von Ifi203 steigert die über die STING-TBK1-Achse ausgelöste IFN-Induktion	87
Abb. 18: Ifi203 ohne Pyrin-Domäne ist nicht in der Lage Interferon zu induzieren	88
Abb. 19: Angriffspunkt des gegen Ifi203 gerichteten Zinkfingers	89
Abb. 20: Charakterisierung der Ifi203 Δ 20-54 Maus	90
Abb. 21: Die Ifi203-Mutation hat <i>ex vivo</i> keine Auswirkung auf die Immunantwort nach Stimulation mit verschiedenen interferoninduzierenden Liganden	92
Abb. 22: Die Trunkation in Ifi203 Δ 20-54/ Δ 20-54-Mäusen bewirkt keinerlei Differenz hinsichtlich der Interferon-abhängigen Zytokinexpression	94

8. Literaturverzeichnis

- Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol.* 2009; 10: 1065-1072
- Ablasser A, Hertrich C, Waßermann R, Hornung V. Nucleic acid driven sterile inflammation. *Clin Immunol* 2013; 147: 207-215
- Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Röhl I, Hopfner KP, Ludwig J, Hornung V. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 2013; 498: 380-384
- Ahn J, Gutman D, Saijo S, Barber GN. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 19386-19391
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801
- Albrecht M, Choubey D, Lengauer T. The HIN domain of IFI-200 proteins consists of two OB folds. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 679-687
- Almine JF, O'Hare CAJ, Dunphy G, Haga IR, Naik RJ, Atrih A, Connolly DJ, Taylor J, Kelsall IR, Bowie AG, Beard PM, Unterholzner L. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat Commun* 2017; 8: 14392
- 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* 1985; 42: 779-789
- Ansari MA, Singh VV, Dutta S, Veetil MV, Dutta D, Chikoti L, et al. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *J Virol* 2013; 87: 8606-8623
- Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, Saw RP, Thompson JF. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2678-2683
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 563-591
- Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10976-10980
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5

- Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*. 2011; 19: 447-459
- Bowie A, O'Neill, LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 508-514
- Brunette RL, Young JM, Whitley DG, Brodsky IE, Malik HS, Stetson, DB. Extensive evolutionary and functional diversity among mammalian AIM2-like receptors. *J Exp Med* 2012; 209: 1969-1983
- Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 2011; 478: 515-518
- Burdette DL, Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol*. 2013; 14: 19-26
- Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 2011; 188: 773-782
- Cavlar T, Deimling T, Ablasser A, Hopfner KP, Hornung V. Species-specific detection of the antiviral small-molecule compound CMA by STING. *EMBO J* 2013; 32: 1440-1450
- Chandra D, Quispe-Tintaya W, Jahangir A, Asafu-Adjei D, Ramos I, Sintim HO, Zhou J, Hayakawa Y, Karaolis DK, Gravekamp C. STING ligand c-di-GMP improves cancer vaccination against metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 901-910
- Cheng G, Zhong J, Chung J, Chisari FV. Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 9035-9040
- Chiu YH, MacMillan JB, Chen ZJ. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell* 2009; 138: 576-591
- Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 2005; 309: 581-585
- Choubey D, Lengyel P. Interferon action: nucleolar and nucleoplasmic localization of the interferon-inducible 72-kD protein that is encoded by the Irf 204 gene from the gene 200 cluster. *J Cell Biol* 1992; 116: 1333-1341
- Connolly DJ, Bowie AG. The emerging role of human PYHIN proteins in innate immunity: implications for health and disease. *Biochem Pharmacol* 2014; 92: 405-414
- Corrales L, Gajewski TF. Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 4774-4779
- Costelloe EO, Stacey KJ, Antalis TM, Hume DA. Regulation of the plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) gene in murine macrophages. Demonstration of a novel pattern of responsiveness to bacterial endotoxin. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 172-182

Cridland JA, Curley EZ, Wykes MN, Schroder K, Sweet MJ, Roberts TL, Ragan MA, Kassahn KS, Stacey KJ. The mammalian PYHIN gene family: phylogeny, evolution and expression. *BMC Evol Biol.* 2012; 12: 140

Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J, Szykiewicz M, Forte GM, Gornall HL, Oojageer A, Anderson B, Pizzino A, Helman G, Abdel-Hamid MS, Abdel-Salam GM, Ackroyd S, Aeby A, Agosta G, Albin C, Allon-Shalev S, Arellano M, Ariaudo G, Aswani V, Babul-Hirji R, Baildam EM, Bahi-Buisson N, Bailey KM, Barnerias C, Barth M, Battini R, Beresford MW, Bernard G, Bianchi M, Billette de Villemeur T, Blair EM, Bloom M, Burlina AB, Carpanelli ML, Carvalho DR, Castro-Gago M, Cavallini A, Cereda C, Chandler KE, Chitayat DA, Collins AE, Sierra Corcoles C, Cordeiro NJ, Crichiutti G, Dabydeen L, Dale RC, D'Arrigo S, De Goede CG, De Laet C, De Waele LM, Denzler I, Desguerre I, Devriendt K, Di Rocco M, Fahey MC, Fazzi E, Ferrie CD, Figueiredo A, Gener B, Goizet C, Gowrinathan NR, Gowrishankar K, Hanrahan D, Isidor B, Kara B, Khan N, King MD, Kirk EP, Kumar R, Lagae L, Landrieu P, Lauffer H, Laugel V, La Piana R, Lim MJ, Lin JP, Linnankivi T, Mackay MT, Marom DR, Marques Lourenço C, McKee SA, Moroni I, Morton JE, Moutard ML, Murray K, Nabbout R, Nampoothiri S, Nunez-Enamorado N, Oades PJ, Olivieri I, Ostergaard JR, Pérez-Dueñas B, Prendiville JS, Ramesh V, Rasmussen M, Régál L, Ricci F, Rio M, Rodriguez D, Roubertie A, Salvatici E, Segers KA, Sinha GP, Soler D, Spiegel R, Stöberg TI, Straussberg R, Swoboda KJ, Suri M, Tacke U, Tan TY, te Water Naude J, Wee Teik K, Thomas MM, Till M, Tonduti D, Valente EM, Van Coster RN, van der Knaap MS, Vassallo G, Vijzelaar R, Vogt J, Wallace GB, Wassmer E, Webb HJ, Whitehouse WP, Whitney RN, Zaki MS, Zuberi SM, Livingston JH, Rozenberg F, Lebon P, Vanderver A, Orcesi S, Rice GI. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am J Med Genet A* 2015; 167: 296-312

Crow MS, Cristea IM. Human Antiviral Protein IFIX Suppresses Viral Gene Expression during Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Infection and Is Counteracted by Virus-induced Proteasomal Degradation. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16: 200-214

Cuadrado E, Jansen MH, Anink J, De Filippis L, Vescovi AL, Watts C, Aronica E, Hol EM, Kuijpers TW. Chronic exposure of astrocytes to interferon- α reveals molecular changes related to Aicardi-Goutieres syndrome. *Brain* 2013; 136: 245-258

Diner EJ, Burdette DL, Wilson SC, Monroe KM, Kellenberger CA, Hyodo M, Hayakawa Y, Hammond MC, Vance RE. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep* 2013; 3: 1355-1361

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; 72: 8463-8471

Ebensen T, Schulze K, Riese P, Morr M, Guzmán CA. The bacterial second messenger cdiGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 952-958

Ebensen T, Schulze K, Riese P, Link C, Morr M, Guzmán CA. The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. *Vaccine* 2007; 1464-1469

- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- Fang FC. Perspectives series, host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997; 99: 2818-2825
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP, Alnemri ES. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 2010; 11: 385-393
- Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 2011; 208: 2005-2016
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013; 31: 397-405
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-1964
- Gao P, Ascano M, Wu Y, Barchet W, Gaffney BL, Zillinger T, Serganov AA, Liu Y, Jones RA, Hartmann G, Tuschl T, Patel DJ. Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase. *Cell* 2013; 153: 1094-1107
- Ghosh S, Wallerath C, Covarrubias S, Hornung V, Carpenter S, Fitzgerald KA. The PYHIN Protein p205 Regulates the Inflammasome by Controlling Asc Expression. *J Immunol.* 2017; 199: 3249-3260
- Goldeck M, Schlee M, Hartmann G, Hornung V. Enzymatic synthesis and purification of a defined RIG-I ligand. *Methods Mol Biol.* 2014; 1169: 15-25
- Gray EE, Winship D, Snyder JM, Child SJ, Geballe AP, Stetson DB. The AIM2-like Receptors Are Dispensable for the Interferon Response to Intracellular DNA. *Immunity* 2016; 45: 255-266
- Gribaudo G, Ravaglia S, Guandalini L, Riera L, Gariglio M, Landolfo S. Molecular cloning and expression of an interferon-inducible protein encoded by gene 203 from the gene 200 cluster. *Eur J Biochem* 1997; 249: 258-264

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745

Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M, Lin R. Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 1-13

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway, CA Jr, Ezekowitz, RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science* 1999; 284: 1313-1318

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458: 514-518

Hornung V, Hartmann R, Ablasser A, Hopfner KP. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol*. 2014;14: 521-528

Hornung V, Latz E. Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 123-130

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K and Akira S. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162: 3749-3752

Huang YH, Liu XY, Du XX, Jiang ZF, Su XD. The structural basis for the sensing and binding of cyclic di-GMP by STING. *Nature Struct Mol Biol* 2012; 19: 728-730

Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015; 16: 448-457

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Journal of Interferon Research* 1987; 7: 429-438

Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F, Ludwig H, Sutter G, Suzuki K, Hemmi H, Sato S, Yamamoto M, Uematsu S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 2006; 7: 40-48

Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008; 455: 674-678

Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 2009; 461: 788-792

Jakobsen MR, Bak RO, Andersen A, Berg RK, Jensen SB, Tengchuan J, et al. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 4571-4580

Janeway, CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1989; 54: 1-3

Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; 13: 11-16

Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol.* 2017; 15: 271-284

Jin L, Hill KK, Filak H, Mogan J, Knowles H, Zhang B, Perraud AL, Cambier JC, Lenz LL. MPYS is required for IFN response factor 3 activation and type I IFN production in the response of cultured phagocytes to bacterial second messengers cyclic-di-AMP and cyclic-di-GMP. *J Immunol* 2011; 187: 2595-2601

Jin T, Perry A, Jiang J, Smith P, Curry JA, Unterholzner L, Jiang Z, Horvath G, Rathinam VA, Johnstone RW, Hornung V, Latz E, Bowie AG, Fitzgerald KA, Xiao TS. Structures of the HIN domain: DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* 2012; 36: 561-571

Jones JW, Kayagaki N, Broz P, Henry T, Newton K, O'Rourke K, Chan S, Dong J, Qu Y, Roose-Girma M, Dixit VM, Monack DM. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 9771-9776

Jønsson KL, Laustsen A, Krapp C, Skipper KA, Thavachelvam K, Hotter D, Egedal JH, Kjolby M, Mohammadi P, Prabakaran T, Sørensen LK, Sun C, Jensen SB, Holm CK, Lebbink RJ, Johannsen M, Nyegaard M, Mikkelsen JG, Kirchhoff F, Paludan SR, Jakobsen MR. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nat Commun* 2017; 8: 14391

Karaolis DK, Means TK, Yang D, Takahashi M, Yoshimura T, Muraille E, Philpott D, Schroeder JT, Hyodo M, Hayakawa Y, Talbot BG, Brouillette E, Malouin F. Bacterial c-di-GMP Is an Immunostimulatory Molecule. *J Immunol* 2007; 178: 2171-2181

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-825

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-384

Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, et al. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Mi- crobe* 2011; 9: 363-375

Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet.* 2014; 15: 321-334

Kolakofsky D, Kowalinski E, Cusack S. A structure-based model of RIG-I activation. *RNA* 2012; 18: 2118-2127

Kotenko, SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003; 4: 69-77

Kramer MJ, Cleeland R, Grunberg E. Antiviral activity of 10- carboxymethyl-9-acridanone. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 9: 233-238

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 33-48

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

Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109: 10558-10563

Liao JC, Lam R, Brazda V, Duan S, Ravichandran M, Ma J, Xiao T, Tempel W, Zuo X, Wang YX, et al. Interferon-Inducible Protein 16: Insight into the Interaction with Tumor Suppressor p53. *Structure* 2011; 19: 418-429

Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 2986-2996

Liu C, Wang H, Zhao Z, Yu S, Lu YB, Meyer J, Chatterjee G, Deschamps S, Roe BA, Lengyel P. MyoD-dependent induction during myoblast differentiation of p204, a protein also inducible by interferon. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7024-7036

Lowenstein CJ, Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci* 2004; 117: 2865-2867

Ludlow LE, Johnstone RW, Clarke CJ. The HIN-200 family: more than interferon-inducible genes? *Exp Cell Res* 2005; 308: 1-17

Ludlow LE, Hii LL, Thorpe J, Newbold A, Tainton KM, Trapani JA, Clarke CJ, Johnstone RW: Cloning and characterisation of Ifi206: a new murine HIN-200 family member. *J Cell Biochem* 2008, 103: 1270-1282

Luo D, Ding SC, Vela A, Kohlway A, Lindenbach BD, Pyle AM. Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* 2011; 147: 409-422

- Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1949-1955
- Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe* 2012; 11: 469-480
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-344
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397
- Medzhitov R. Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 2009; 30: 766-775
- Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010; 11: 1136-1142
- Minamitani T, Iwakiri D, Takada K. Adenovirus Virus-Associated RNAs Induce Type I Interferon Expression through a RIG-I-Mediated Pathway. *J Virol* 2011; 85: 4035-4040
- Moffat J, Sabatini DM. Building mammalian signalling pathways with RNAi screens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 177-187
- Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag 2009
- Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8841-8848
- Opitz B, Vinzing M, van Laak V, Schmeck B, Heine G, Günther S, Preissner R, Slevogt H, N'Guessan PD, Eitel J, Goldmann T, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S. *Legionella pneumophila* induces IFN β in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *J Bio Chem* 2006; 281: 36173-36179
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Concklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002; 16: 948-958
- Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 561-586
- Pebernard S, Iggo, RD. Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation* 2004; 72: 103-111
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202: 8-32

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 and Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

Ramachandra L, Simmons D, Harding CV. MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 98-104

Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA: The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 2010; 11: 395-402

Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, Hardy LL, Garceau V, Sweet MJ, Ross IL, Hume DA, Stacey KJ. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 2009; 323: 1057-1060

Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier DY. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 2015; 524: 230-233

Rusakiewicz S, Semeraro M, Sarabi M, Desbois M, Locher C, Mendez R, Vimond N, Concha A, Garrido F, Isambert N, Chaigneau L, Le Brun-Ly V, Dubreuil P, Cremer I, Caignard A, Poirier-Colame V, Chaba K, Flament C, Halama N, Jäger D, Eggermont A, Bonvalot S, Commo F, Terrier P, Opolon P, Emile JF, Coindre JM, Kroemer G, Chaput N, Le Cesne A, Blay JY, Zitvogel L. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2013; 73: 3499-3510

Ryan RP. Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiology* 2013; 159: 1286-1297

Saka HA, Valdivia R. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28: 411-437

Sauer JD, Sotelo-Troha K, von Moltke J, Monroe KM, Rae CS, Brubaker SW, Hyodo M, Hayakawa Y, Woodward JJ, Portnoy DA, Vance RE. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect Immun* 2011; 79, 688-694

Schattgen SA, Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunol Rev* 2011; 243: 109-118

Schlee M. Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology* 2013; 218: 1322-1335

Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 2006; 211: 511-524

Schroder K, Tschopp J: The inflammasomes. *Cell* 2010, 140: 821-832

Sharma S, DeOliveira RB, Kalantari P, Parroche P, Goutagny N, Jiang Z, Chan J, Bartholomeu DC, Lauw F, Hall JP, Barber GN, Gazzinelli RT, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate immune recognition of an AT-rich stem-loop DNA motif in the *Plasmodium falciparum* genome. *Immunity* 2011; 35: 194-207

Sharp TV, Schwemmle M, Jeffrey I, Laing K, Mellor H, Proud CG, Hilse K, Clemens MJ. Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 4483-4490

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526: 660-665

Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 2005; 217: 1-15

Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3- dependent innate immune response. *Immunity* 2006; 24: 93-103

Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type-I interferon pathway. *Science* 2013; 339: 786-791

Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, Zhou Y, Zhai Z, Chen D, Jiang Z. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8653-8658

Sweet MJ, Stacey KJ, Kakuda DK, Markovich D, Hume DA. IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *J. Interferon Cytokine Res* 1998; 18: 263-271

Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 2006; 8: 907-922

Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 17-22

Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-820

Thompson MR, Sharma S, Atianand M, Jensen SB, Carpenter S, Knipe DM, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA. Interferon γ -inducible protein (IFI) 16 transcriptionally regulates type I interferons and other interferon-stimulated genes and controls the interferon response to both DNA and RNA viruses. *J Biol Chem* 2014; 289: 23568-23581

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl Cancer Inst* 1984; 72: 955-962

Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71: 4027-4031

Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-581

Tsuchiya K, Hara H, Kawamura I, Nomura T, Yamamoto T, Daim S, Dewamitta SR, Shen Y, Fang R, Mitsuyama M. Involvement of absent in melanoma 2 in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2010; 185: 1186-1195

Tüngler V, Lee-Kirsch M. Typ-1-Interferonopathien. *Kinderrheumatologie. arthritis und rheuma* 2014; 43: 225-233

Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 2010; 11: 997-1004

Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 636-646

Vance RE, Isberg RR, Portnoy DA. Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe* 2009; 6: 10-21

Wang Q, Liu X, Cui Y, Tang Y, Chen W, Li S, Yu H, Pan Y, Wang C. The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING. *Immunity* 2014; 41: 919-933

Wijshake T, Baker DJ, van de Sluis B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 1942-1950

Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, Duggan R, Wang Y, Barber GN, Fitzgerald KA, Alegre ML, Gajewski TF. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* 2014; 41: 830-842

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433

Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 461-488

- Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013; 339: 826-830
- Xiao TS, Fitzgerald KA. The cGAS-STING pathway for DNA sensing. *Mol Cell* 2013; 51: 135-139
- Yoneyama M, Fujita T. RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 545-551
- Zhang J, Hu MM, Wang YY, Shu HB. TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. *J Biol Chem*. 2012; 287: 28646-28655
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 203-213
- Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol* 2011; 12: 959-965
- Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, Lei C, He X, Zhang L, Tien P, Shu HB. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 2008; 29: 538-550
- Zhong B1, Zhang L, Lei C, Li Y, Mao AP, Yang Y, Wang YY, Zhang XL, Shu HB. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* 2009; 30: 397-407

9. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei all denen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Prof. Dr. Veit Hornung, der mir die Durchführung meiner Doktorarbeit in einem hoch wissenschaftlichen und motivierenden Arbeitsumfeld ermöglicht hat. Sein unermüdlicher Ansporn sowie seine ständige Bereitschaft zur kritischen und ideenreichen Reflexion haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus gebührt mein besonderer Dank meiner Betreuerin, Prof. Dr. Andrea Ablasser, für ihre anhaltende Förderung und hervorragende Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten. Nicht zuletzt bin ich ihr auch für die geduldige Einarbeitung in die verschiedenen praktischen Methoden sehr dankbar.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Pharmakologie für die stete Hilfsbereitschaft sowie die gute Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danke ich Christina Wallerath und Maximilian Rothe für die tatkräftige Unterstützung.

Zudem möchte ich mich bei BONFOR für die ideelle und materielle Bezuschussung meines Forschungsvorhabens bedanken.

Zu guter Letzt danke ich vor allem meiner Familie für ewiges Verständnis und immerwährenden Beistand.