

Die Rolle der RNasen T2 und 2 bei der Aktivierung des Toll-like Rezeptors 8

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

Thomas Ostendorf

aus Lohne (Oldenburg)

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Schlee
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Heinz Beck

Tag der Mündlichen Prüfung: 21. März 2022

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

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	8
2.	Material und Methoden	10
2.1	Aufreinigung PBMC	10
2.2	Klonierung von RNase T2 und 2	11
2.3	Generierung von CRISPR-Cas9 knock-out Zellen	12
2.4	Synthese rekombinanter RNase 2 und T2	13
2.5	In-vitro Versuche mit RNase T2 und RNase 2	14
2.6	Lentivirale Transduktion	14
2.7	Zellkultur	14
2.8	Stimulation von Zellen mit RNA	15
2.9	Lebendstimulation mit Bakterien und <i>P. falciparum</i>	17
2.10	Darstellung lysosomaler RNA-Degradation	17
2.11	ELISA zur Quantifizierung der Zytokine	18
2.12	Bakterienkultur und RNA-Isolierung	18
3.	Ergebnisse	19
3.1	RNase T2 und 2 sind lysosomale RNasen	19
3.2	Degradationsprofil von RNase T2 und 2	20
3.3	Einfluss von RNase T2 und 2 auf beschriebene TLR-Agonisten	22
3.4	Einfluss von Chloroquin auf beschriebene TLR-Agonisten	24
3.5	TLR8-Immunantwort auf Bakterien und <i>P. falciparum</i>	25
4.	Diskussion	28
5.	Zusammenfassung	31
6.	Literaturverzeichnis	33
7.	Veröffentlichung	39
8.	Danksagung	61

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Cas	CRISPR-associated
cDNA	komplementäre DNA
C	Cytosin
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
DMARD	Disease modifying antirheumatic drug
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsRNA	doppelsträngige RNA
EF1 α	Translation Elongation Factor 1 α
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS/FCS	Fetales Rinderserum
G	Guanosin
gRNA	guide RNA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iRBC	infizierte Erythrozyten
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
IVT	in-vitro-Transkript
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MOI	multiplicity of infection
N	Beliebiges Nukleotid
ORN	Oligoribonukleotid
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBND	PCR buffer with non-ionic detergents
PBS	Phosphatpuffer

PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiester
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Pattern Recognition Receptors
PTO	Phosphothioat
r	Ribonukleotid
r*	Ribonukleotid, PTO-verknüpft
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
ssRNA	einzelsträngige RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Uridin

1. Einleitung

Ein fundamentaler Teil des angeborenen Immunsystems sind die sogenannten *pattern-recognition receptors* (PRR), eine Gruppe pleomorpher, aber in Teilen phylogenetisch hochgradig konservierter Rezeptoren. Diese PRR sind in der Lage, biochemische Strukturen zu erkennen und dadurch eine spezifische Kaskade einer anti-inflammatorischen Antwort zu initiieren.

Die endolysosomal lokalisierten PRR erkennen bei der hydrolytischen Degradation von Pathogenen freigesetzte Liganden (Brubaker et al., 2015), darunter auch RNA und DNA (Schlee & Hartmann, 2016). Einer dieser PRR ist der im Jahre 2000 erstbeschriebene, insbesondere in Monozyten und Makrophagen exprimierte Toll-like receptor 8 (TLR8) (Du et al., 2000), dem die Erkennung einzelsträngiger, GU-reicher RNA zugeschrieben wurde (Heil et al., 2004). Die bloße Präsenz von GU-Sequenzen innerhalb einer einzelsträngigen RNA (ssRNA) genügt jedoch nicht, um eine Aktivierung von TLR8 zu erwirken (Zhang et al., 2016). Andere Studien konnten zeigen, dass endolysosomal freigesetzte RNA von Viren, Bakterien und Protozoen eine Aktivierung von TLR8 und die damit verbundene Freisetzung des Zytokins IL12p70, das für die Aktivierung von TLR8 spezifisch ist, zur Folge hat (Bergström, 2015; Coch et al., 2019; Eigenbrod et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Vor der Entdeckung von CRISPR/Cas9 als effektives Mittel zur genomischen Editierung humaner Zellen (Doudna et al., 2014) fanden die meisten Studien unter Verwendung von transgenen Mäusen statt. TLR8 ist in Mäusen jedoch funktionslos (Alexopoulou et al., 2012), sodass es bisher kaum Studien zur Rolle, Funktion und Aktivierung von TLR8 gibt. Zwar wurde eine Vielzahl an TLR8-aktivierenden Liganden, darunter bakterielle, ribosomale RNA und kurze, einzelsträngige Oligoribonukleotide (ORN) (Ablasser et al., 2009; Forsbach et al., 2008; Heil et al., 2004) sowie sogenannte *small molecules* wie das Imidazoquinolin-Derivat R848 (Jurk et al., 2002) und der TLR8 spezifische Agonist VTX-2337 (Lu H. et al., 2012) und dessen Derivate, gefunden, das exakte strukturelle Äquivalent, das für die Aktivierung notwendig ist, blieb jedoch weiterhin unklar. Hinweise auf einen möglichen Aktivierungsmechanismus von TLR8 liefert eine Studie, die TLR8 mit zwei zuvor als aktivierend beschriebenen, einzelsträngigen RNAs (ssRNA) ORN006 (Forsbach et al., 2008) und ssRNA40 (Heil et al., 2004) ko-kristallisiert haben. Diese Studie konnte für TLR8 zwei Bindungstaschen zeigen, wovon eine Uridin, die

andere ein kurzes RNA Fragment aus 2-3 Nukleotiden bindet (UG, NUG, UGN) (Tanji et al., 2015). Diese Studie liefert also Hinweise darauf, dass die zuvor beschriebenen TLR8 Agonisten zunächst eine RNase-vermittelte Degradation durchlaufen, sodass die generierten Nukleotide und Oligonukleotide eine Rezeptorbindung eingehen können und zu einer Aktivierung führen. Da viele der beschriebenen, synthetischen TLR8-Agonisten ein Phosphothioatester (PTO)-Rückgrat haben und die ribosomale RNA von Bakterien und Protozoen starke Sekundärstrukturen aufweist und somit partiell basengepaart vorliegt, sollte eine hierin involvierte RNase in der Lage sein, sowohl basengepaarte RNA als auch solche mit PTO-Bindungen zu schneiden. Zu Beginn meiner Arbeit wurde keine RNase, die in Zusammenhang mit der Aktivierung von TLR8 steht, beschrieben.

Menschen exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher RNasen, darunter die der RNase A Superfamilie und die der RNase T2 Familie. Letztere wird beim Menschen lediglich durch RNase T2 repräsentiert.

Bei der Suche nach potentiellen Kandidaten für die endolysosomale Degradation von RNA konnten wir die beiden RNasen T2 und 2 als potentiell relevante RNasen identifizieren (Ostendorf et al., 2020).

RNase T2 ist phylogenetisch hochgradig konserviert (MacIntosh, 2011), wird ubiquitär in allen kernhaltigen Zellen endolysosomal exprimiert und extrazellulär sezerniert (Lu L. et al., 2018). Es wurde ein pH-Optimum zwischen pH4 und pH5 beschrieben (Luhtala & Parker, 2010). Das passt zur vermuteten endolysosomalen Lokalisation und der beschriebenen Funktion, die durch Autophagie freiwerdende RNA, insbesondere die mitochondriale, zu degradieren (Fujiwara et al., 2016). Interessanterweise führt eine kongenitale, homozygote RNase T2-Defizienz zu einem Krankheitsbild mit schwerer geistiger und motorischer Retardierung, das sowohl klinisch als auch hirnmorphologisch sehr stark an die Krankheitsbilder vertikaler Infektionen durch STORCH-Pathogene erinnert (Henneke et al., 2009; Tonduti et al., 2016) und deshalb zur Gruppe der als *zystische Leukoencephalopathie ohne Megaloencephalopathie* (CLWM) bezeichneten Krankheiten gerechnet wird. In einer Studie mit Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass eine RNase T2-Defizienz zur endolysosomalen RNA-Akkumulation führt (Haud et al., 2011). Die genaue Pathogenese dieses auf der RNase T2-Defizienz beruhenden Phänotyps

blieb jedoch trotz dieser klinisch-morphologischen Ähnlichkeit und der Hinweise auf eine endolysosomale RNA-Akkumulation bisher im Wesentlichen ungeklärt.

Eine zuvor erschienene Studie (Greulich et al., 2019) zeigte einen Einfluss von RNase T2 auf die Aktivierung von TLR8 durch ssRNA40. Es wurde jedoch nicht der Einfluss anderer RNasen und die RNase-Abhängigkeit der anderen bereits beschriebenen TLR8-Liganden untersucht.

Die Expression von RNase 2 als Teil der RNase A Superfamilie ist im Wesentlichen auf die myeloische Zellreihe restringiert. Analog zur RNase T2, ist RNase 2 lysosomal (Lübke et al., 2009) und extrazellulär (Lu L. et al., 2018) lokalisiert. Für RNase 2 wurde bisher eine direkte antivirale Aktivität durch Degradation viraler RNA beschrieben jedoch keine eindeutige Rolle in der Aktivierung von PRR gezeigt (Lu L. et al., 2018; Rosenberg, 2015). Neben der lysosomalen Aktivität wird die RNase-Aktivität des Serums im Wesentlichen durch Mitglieder der RNase A Superfamilie erzeugt (Sorrentino & Libonati, 1994).

Diese Publikationsdissertation stellt die Ergebnisse unserer Studie zusammenfassend dar. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den durch mich durchgeführten Versuchen und deren Ergebnissen.

Die detaillierten Ergebnisse können in unserer Publikation eingesehen werden (Ostendorf T *et al.*: Immune Sensing of Synthetic, Bacterial, and Protozoan RNA by Toll-like Receptor 8 Requires Coordinated Processing by RNase T2 und RNase 2, *Immunity*. 2020; 52: 591-605).

2. Material und Methoden

2.1 Aufreinigung PBMC

Die Aufreinigung von PBMC erfolgte entweder aus dem sogenannten *buffy coat*, der leukozytären Grenzschicht zwischen Plasma und Erythrozyten nach Zentrifugation von Spenderblut (Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Universität Bonn) oder direkt aus Spendervollblut (Blutentnahme im eigenen Institut im Rahmen des Ethikantrages von Prof. Dr. Eva Bartok, 031/18) durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Biocoll® Trennlösung (Biochrom) bei 800 x g für 30min. Die aufgereinigten Zellen wurden mit NaCl gewaschen und in RPMI Medium (Thermo Fisher Scientific) bei 37°C und 5% v/v CO₂ kultiviert.

2.2 Klonierung von RNase T2 und 2

Für die rekombinante Synthese sowie für die lentivirale Transduktion von RNase T2 und 2 war es notwendig, die cDNA beider Gene in einen Vektor zu klonieren. Hierfür wurde RNA aus Monozyten isoliert (RNeasy Kit, Qiagen), revers transkribiert (RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific) und anschließend die gewünschte cDNA mittels PCR (Q5 Polymerase, New England Biolabs) amplifiziert. Dafür wurden Primer mit einem Schnittstellenüberhang für bakterielle Restriktionsendonukleasen verwendet, um sie hinterher in einen Vektor zu klonieren.

Für die Synthese rekombinanter RNase T2 und 2 wurde das Plasmid pEF-Bos mit C-terminalem FLAG-tag sowie 6x His-Tag (zur Verfügung gestellt von Prof. E. Latz, Institut für angeborene Immunität, Universität Bonn) genutzt. Das mit den entsprechenden Nukleotiden für die Schnittstellen BamHI und XhoI versehene Amplifikat von RNase T2 und RNase 2 wurde nach einem Restriktionsverdau (BamHI und XhoI, Thermo Fisher Scientific) mit dem ebenfalls durch diese Nukleasen verdauten Plasmid ligiert (T4 Ligase, Thermo Fisher Scientific) und anschließend mittels Hitzeschock in chemokompetente *E. coli*-Bakterien transformiert. Analog wurde mit dem Plasmid pLenti6-EF1alpha-IRES-EGFP ∨ mCherry (Dr. Jonas Doerr, Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn) mit einem EGFP- oder mCherry-Tag mit den Restriktionsstellen Sall und NotI (Thermo Fisher Scientific) verfahren. In beiden Plasmiden wurde zur Expression des entsprechenden Gens der humane EF1 α -Promoter verwendet, um eine starke Expression des Gens zu erwirken.

Die Selektion erfolgreich transformierter *E. coli*-Klone erfolgte mittels Ampicillin auf LB-Agar, die Präparation der Plasmide mithilfe des PureLink™ HiPure Plasmid MaxiPrep Kit (Thermo Fisher Scientific).

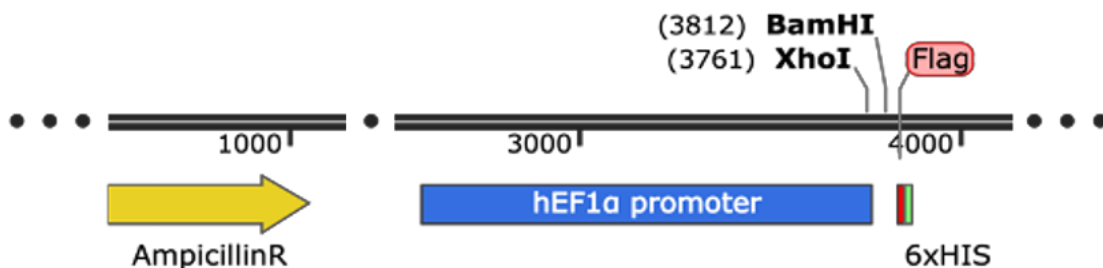


Abb. 1 Auszug des schematischen Aufbaus des pEF-Bos-Plasmids

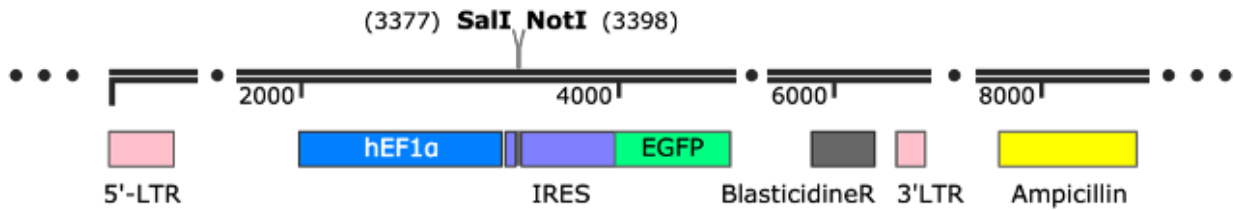


Abb. 2 Auszug des schematischen Aufbaus des pLenti6-EF1alpha-IRES-EGFP-Plasmids

2.3 Generierung von CRISPR-Cas9 knock-out Zellen

Die passenden guide RNAs (gRNA) für die entsprechenden Genloci wurden mithilfe des *CRISPR design tool* (Zhang Lab, Massachusetts Institute of Technology, MA, USA) identifiziert (Tab. 1) und mittels Gibson Assembly in das Plasmid pMax-CRISPR mit U6-Promoter für die gRNA und EF1 α -Promoter für hCas9 mit EGFP- bzw. tdTomato-Tag kloniert. Die Notwendigkeit der Verwendung zweier Fluoreszenz-Tags ergab sich aus dem Vorhaben, RNase T2^{-/-} RNase 2^{-/-} knock-out Zellen zu generieren. Das klonierte Plasmid wurde in chemokompetente *E. coli* transformiert und transformierte Klone mittels Kanamycin selektiert. Die Aufreinigung der Plasmide aus *E. coli* erfolgte analog wie in 2.2 beschrieben.

Tab. 1: Verwendete gRNA-Sequenzen

Gen	gRNA-Sequenz mit (PAM)
RNase T2	5' GTTGCTTTGCCTGGGCGGTG(CGG) 3'
	5' GCGGTGCGGACAAGCGCCTG(CGG) 3'
RNase 2	5' GTTCAAACCATTGAGCCC(AGG) 3'
	5' GCATTGCATTGGTGCATTGC(TGG) 3'

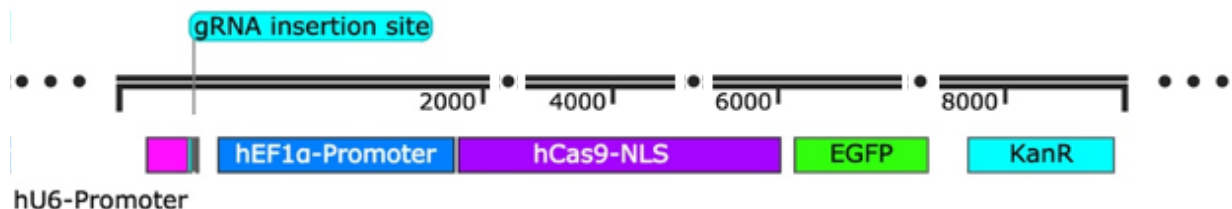


Abb. 3 Auszug des schematischen Aufbaus des pMAX-CRISPR-Plasmids (hier beispielhaft mit EGFP)

Das nun sowohl die kodierende Sequenz für die notwendige gRNA als auch die kodierende Sequenz für die Nuklease Cas9 enthaltene Plasmid wurde dann durch Elektroporation (Neon Transfection System, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt – 1250 V, 50 ms, 1 Puls) in THP-1 (Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universität Bonn) und BLaER-1 (Thomas Graf, Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain) Zellen transfiziert. Um einen Hintergrundeffekt durch TLR 7 (ein ebenfalls an der Erkennung von und Immunantwort auf RNA beteiligter Rezeptor) auszuschließen, verwendeten wir als TLR7-defiziente THP1- Zellen (Coch et al., 2019).

Nach 16h wurden die Zellen anhand des GFP- und/oder tdTomato-Signals sortiert und dann als Einzelzellklone ausplattiert (0,3 Zellen pro well). Klone mit entsprechender *non-* oder *missense*-Mutation wurden per Sanger-Sequenzierung (Microsynth SeqLab GmbH, Göttingen) identifiziert. Hierfür wurden die klonalen Zellen vorher in PBDN-Puffer mit zugesetzter Proteinase K (Thermo Fisher Scientific) für 1 h bei 55°C lysiert, die Proteinase K anschließend bei 95 °C inaktiviert und der entsprechende Locus um die *guide sequence* herum mittels PCR (DreamTaq, Thermo Fisher Scientific) amplifiziert.

2.4 Synthese rekombinanter RNase 2 und T2

Für die Überexpression wurde das Plasmid pEF-Bos-RNASET2-FLAG sowie pEF-Bos-RNASE2-FLAG mittels Calciumphosphat in DNase II^{-/-} HEK 293 FT-Zellen transfiziert. Nach 36h wurden die Zellen in Lysepuffer mit Proteaseinhibitor (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100 (Sigma Aldrich), Protease Inhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)) aufgenommen und für 30 min inkubiert. Nach 10 min Elimination der Zellkerne durch Zentrifugation bei 10000 x g wurde das Lysat auf an Agarose gebundene Anti-FLAG-IgG-Antikörper (Anti-FLAG M2 Agarose Beads, Sigma Aldrich) gegeben und für 3 h bei 4°C inkubiert. Durch die Bindung an Agarose konnte der Agarose-Antikörper-Protein-Komplex abzentrifugiert und isoliert werden. Abschließend erfolgte die Elution mittels FLAG-Peptids (Sigma Aldrich) durch kompetitive Verdrängung des RNase-FLAG-Fusionsproteins von den Anti-Flag-Antikörpern. Die quantitative Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung mit BSA als Referenzprotein. Die qualitative Analyse wurde durch Western Blot mit Anti-FLAG M2 Antikörper durchgeführt.

2.5 In-vitro Versuche mit RNase T2 und RNase 2

Zur Identifizierung des jeweiligen pH-Optimums wurden 20 ng/ μ l einer definierten 19bp ssRNA (9.2S, Tab. 2; Hornung et al., 2005) mit jeweils 200 ng/ml RNase T2 und RNase 2 bei verschiedenen pH-Werten im Reaktionspuffer (50 mM NaAc, 100 mM NaCl, pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt) inkubiert. Für die Versuche mit dsRNA wurde die jeweilige ssRNA mit ihrem komplementären Strang in 10 mM Tris (pH 7.5 - 8.0), 50 mM NaCl und 1 mM EDTA (Carl Roth GmbH + Co. KG) für 2 min auf 95°C erhitzt und langsam abgekühlt (-1,5 K/min). Die verwendeten Oligoribonukleotide sowie deren Komplementärstränge sind in Tab. 2 aufgeführt.

Die nachfolgenden Versuche zur Charakterisierung des Schneideverhaltens wurden bei dem ermittelten pH-Optimum unter sonst gleichen Versuchsbedingungen, jedoch absteigenden RNase-Konzentrationen durchgeführt (Verdünnungsstufen in den Ergebnissen angegeben).

Anschließend erfolgte jeweils die Auftrennung mittels Gelelektrophorese in einem Gel aus 7 M Harnstoff, 18% Acrylamid (29:1) in TBE-Puffer sowie die Färbung mit Methylenblau (Carl Roth GmbH + Co. KG).

2.6 Lentivirale Transduktion

Die Produktion von Lentiviren geschah analog zu (Kutner et al., 2009). Es erfolgte die Transfektion von DNase II^{-/-} HEK 293 FT Zellen mit dem jeweiligen Lentivektor-Plasmid (siehe 2.2) sowie den für die virale Verpackung kodierenden Plasmide psPAX2 und VSV-G mittels Calciumphosphat-Transfektion (20 μ g/ml pLenti, 15 μ g/ml psPAX2, 6 μ g/ml VSV-G, 125 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES).

Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden mittels Ultrazentrifugation bei 21000 rpm für 2 h konzentriert (Beckman Coulter SW32-TI Rotor). Die Viruspellets wurden in DMEM Medium (Thermo Fisher Scientific) resuspendiert und auf die zu transduzierenden Zellen (THP-1, BLaER-1) gegeben. Die erfolgreich transduzierten Zellen wurden anhand des EGFP- oder mCherry-Signals mittels Durchflusszytometrie sortiert und kultiviert.

2.7 Zellkultur

Für die Kultur von THP-1, BLaER-1 und PBMC wurde RPMI-1640 mit 100 IU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren,

10% v/v FCS (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Für HEK-293 FT wurde DMEM (Thermo Fisher Scientific) mit gleichen Zusätzen wie in RPMI-1640 genutzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ v/v inkubiert.

2.8 Stimulation von Zellen mit RNA

THP-1 und BLaER-1 Zellen sowie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden mit verschiedenen TLR-Agonisten, Oligonukleotiden (Tab. 2) und RNA von Pathogenen stimuliert. Als TLR-Agonisten kamen der TLR7/8-Ligand R848 (1 mg/ml), das bakterielle Endotoxin LPS (100 ng/ml) als TLR4-Ligand, der TLR8 spezifische Ligand TL8-506 (120 ng/ml) sowie Uridin (200 mM) zum Einsatz. Für die endolysosomale Aufnahme von RNA wurde diese 10 min mit poly-L-Arginin (im Massenverhältnis poly-L-Arginin:RNA = 1:1) (Sigma Aldrich) in PBS komplexiert und danach auf die Zellen gegeben (für THP-1 und BLaER-1 jeweils 8 ng/μl RNA, für PBMC 1,6 ng/μl RNA). Die BLaER-1 Zellen wurden vor der Stimulation zu Makrophagen-ähnlichen Zellen transdifferenziert (5 Tage unter 100 nM 17-Estradiol, 10 ng/ml hIL-3 und 10 ng/mL M-CSF; Rapino et al., 2013). Die Stimulation des zytosolischen RNA-Rezeptors RIG-I wurde durch liposomale Transfektion von IVT4 (200 ng/ml; Schlee et al., 2009) mittels Lipofectamine 2000 (0,5 μg/ml, Thermo Fisher) erreicht. Zur Inhibition des durch LPS aktivierten Rezeptors TLR4 bei der Verwendung von bakterieller RNA wurde 1 μg/ml CLI-095 (Invivo-gen) 1h vor der eigentlichen Transfektion hinzugegeben. Zur Inhibition von TLR2 steht bis dato kein geeigneter Inhibitor zur Verfügung. Unter Verwendung von nur CLI-095 war jedoch bereits kein Hintergrundsignal mehr messbar. Als Zellkulturmedium wurde in allen Versuchen RPMI-1640, wie in 2.7 beschrieben, verwendet. Lediglich für die serumfreien Versuche wurde das FCS durch HL-1 FBS Substitut (Lonza) ersetzt. Die Überstände der Stimulationsversuche wurden 16 h nach Stimulation abgenommen. Für die Versuche mit Chloroquin wurde dieses 1 h vor der eigentlichen Stimulation in absteigender Konzentration von 100 μM bis 0,1 μM (in Schritten mit einer jeweils 1:10 Verdünnung) zu den Zellen gegeben.

2.9 Lebendstimulation mit Bakterien und *P. falciparum*

Für die Stimulation mit lebenden Bakterien wurden diese wie in 2.12 beschrieben kultiviert, zentrifugiert, dreimal in PBS gewaschen und darin aufgenommen. Nach Verdünnung auf die gewünschte Konzentration von Bakterienzellen wurden diese direkt auf die THP-1 Zellen mit dem in 2.7 angegebenen Medium gegeben. Das hierin enthaltene Antibiotikum führte zu einer Bakteriostase, verhinderte das weitere Wachstum der Bakterien und stellte somit eine konstante MOI über den gesamten Versuch hinweg sicher.

Für die Stimulation mit *P. falciparum* wurden infizierte Erythrozyten (*infected red blood cells, iRBC*) analog zu den Versuchen mit lebenden Bakterien in verschiedenen Konzentrationen zu den THP-1 Zellen gegeben (iRBCs wie in Coch et al., 2019 beschrieben kultiviert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Marc Hübner, Institut für Mikrobiologie und Parasitologie, Universität Bonn). Die Zellkulturüberstände wurden in beiden Versuchen nach 16h abgenommen.

2.10 Darstellung lysosomaler RNA-Degradation

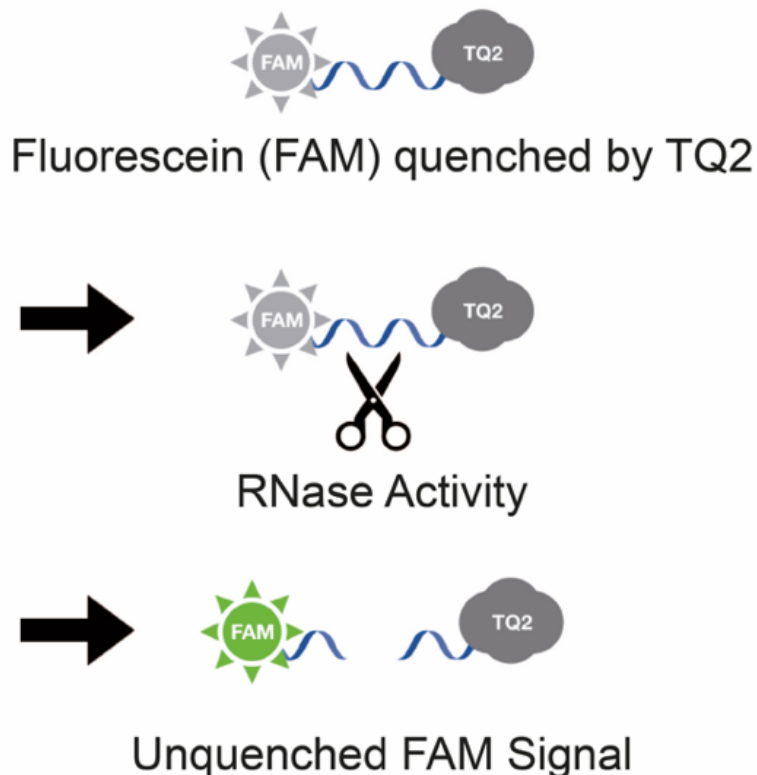


Abb. 4: Quencher-Fluoreszenz-Versuch (Abb. 4F der Originalpublikation)

Zur Darstellung lysosomaler RNA-Degradation durch RNasen wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen u.a. mit einzelsträngiger RNA (9.2S RNA, Tab. 2; Hornung et al., 2005), die mit einem 5'-6-FAM (6-Carboxyfluorescein) und einem 3'-TQ2-Quencher versehen wurde, transfiziert. Dafür wurden 1,6 µg/ml 5'-FAM-3'-TQ2-RNA, 6,4 µg/ml RNA (ohne Fluorochrom) für 10 min mit 8 µg/ml poly-L-Arginin komplexiert. Nach 18h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lebende Zellen mit Hoechst 34580 (Thermo Fisher Scientific) gefärbt. Durch die räumliche Trennung von Fluorochrom und Quencher konnte eine stattgefunden Degradation von 5'-FAM-3'-TQ2-RNA durch Fluoreszenz nachgewiesen werden ($\lambda_{\text{Absorption}}=495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}}=517 \text{ nm}$). Die Fluoreszenzmikroskopie und Anfertigung von Bildaufnahmen erfolgte mithilfe des Cytation 3 Multimode Reader (Biotek) unter Verwendung des DAPI und GFP filters sowie des 40x Objektivs. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der Software Gen5 (Biotek) anhand des GFP-Signals, das auf das DAPI-Signal (und somit indirekt auf die Anzahl lebender Zellen) normalisiert wurde.

2.11 ELISA zur Quantifizierung der Zytokine

Für die quantitative Messung der Zytokine wurden ELISA-Kits für hsCXCL-10, hsIFN- γ , hsIL12p70, hsIL-6, hsIL-8, hsTNF- α (BD BioSciences) sowie hsIFN- α (Thermo Fisher Scientific) verwendet und der Herstellerbeschreibung entsprechend verwendet.

2.12 Bakterienkultur und RNA-Isolierung

Die in Tab. 3 genannten Bakterienstämme wurden im angegebenen Medium 16h in einer Vorkultur (4 ml) inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:100 in 400 ml des jeweiligen Mediums gegeben. Während der Inkubation wurde kontinuierlich die optische Dichte (OD) gemessen, um die Inkubation in der Phase des exponentiellen Wachstums zu beenden (OD 0,6) und somit ein bereits stattfindendes, signifikantes Absterben und die damit verbundene Freisetzung bakterieller RNasen zu verhindern.

Die Bakterien wurden bei 3000 x g für 10 min pelletiert und in 2 ml PBS resuspendiert und grampositive mit 50 µg/ml, gramnegative mit 5 µg/ml Lysozym (Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Danach wurden 6 ml Trizol LS (Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation erfolgte dann die Zugabe von 20% v/v Chloroform und die abschließende Zentrifugation bei 12000 x g für 15 min bei 4°C. Solange die wässrige Pha-

se noch trüb erschien, wurde die Chloroform-Extraktion entsprechend wiederholt. Die isolierte RNA wurde mit 3 ml Isopropanol und 600 µl 3 M Natriumacetat gefällt, in 70% v/v Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet, ehe sie in 500 µl H₂O resuspendiert wurde. Zusätzlich wurden RNA-Degradationsprodukte, Endotoxine und andere Verunreinigungen mittels Zentrifugation durch Sephadex-G50 Säulen (Roche) eliminiert und anschließend mittels NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert.

Tab. 3 Verwendete Bakterienstämme

Name	Medium	Stamm	Herkunft
E. coli	LB	DH10B (18297010)	Thermo Fisher Scientific
S. aureus	Casein-Soja-Pepton	Seattle 1945 (DSM-1104)	Leibniz Institut DSMZ
S. pyogenes	Casein-Soja-Pepton	SF-130, T1 (DSM-20565)	Leibniz Institut DSMZ
S. agalactiae	Casein-Soja-Pepton	G19 (DSM-2134)	Leibniz Institut DSMZ
L. monocytogenes	Brain Heart Infusion	EGDe serovar 1/2a (ATCC BAA-679)	ATCC
S. marcescens	Casein-Soja-Pepton	Delft 137 (NCTC 1377)	Public Health England

3. Ergebnisse

3.1 RNase T2 und 2 sind lysosomale RNasen

Die Literaturrecherche nach endolysosomalen RNasen ergab als Kandidaten RNase T2 sowie RNase 1, 2 und 6, die alle als möglicherweise endolysosomal lokalisiert beschrieben wurden (Campomenosi et al., 2006; Lübke et al., 2009; Rouillard et al., 2016). Während klassische Monozyten sowohl RNase T2 als auch RNase 2 und 6 exprimieren (Schmiedel et al., 2018), haben wir in der 3'mRNA-Sequenzierung für die verwendeten Zelllinien THP-1 und BLaER-1 ein unterschiedliches Muster gefunden. Dabei exprimieren THP-1 im Wesentlichen RNase T2 und RNase 2, transdifferenzierte BLaER-1 hingegen RNase T2 sowie RNase 1 und 6 (Abbildung 1A der Originalpublikation). Die in bisherigen Publikationen beschriebenen TLR8-aktivierenden RNA-Liganden

wurden vor allem in Monozyten und THP-1 Zellen untersucht, sodass der Fokus auf die in beiden Zellen exprimierten RNasen T2 und 2 gelegt wurde.

Zur Erleichterung der Analyse der Lokalisation von RNase T2 und 2 wurden diese mit einem Hämagglutinin-Tag fusioniert und in THP-1 Zellen überexprimiert. Danach erfolgte die Färbung von Hämagglutinin, Rab5 als Marker für das frühe, Rab7 für das späte Endosom, LAMP1 für das Endolysosom sowie 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als Marker für die Zellkerne.

Es zeigte sich ein Manders M2 Kollokalkoeffizient (Manders et al., 1993) von 30-45% (Abbildung 1B-D der Originalpublikation). Das bedeutet, dass je nach verwendetem Marker (frühes, spätes Endosom oder Endolysosom) 30-45% aller Fluoreszenzsignale der RNasen mit einem der Fluoreszenzmarker für das frühe (Rab5) bzw. späte Endosom (Rab7) oder das Endolysosom (LAMP1) kollokalierte. Die Diskrepanz kommt durch die massive Überexpression der RNasen im Rahmen der lentiviralen Transduktion zustande.

Durch die Beschränkung der Studie auf RNase T2 und 2 war es wichtig, eine endolysosomale RNA-Degradation durch eine darüberhinausgehende ribonukleolytische Aktivität auszuschließen. Dafür wurde ein Konstrukt aus Fluorochrom (6-FAM), Quencher (TQ2) und RNA in THP-1 Zellen transfiziert. Aufgrund der räumlichen Nähe von Fluorochrom und Quencher in RNA-Oligonukleotiden kann bei intaktem RNA-Oligonukleotid keine Fluoreszenz detektiert werden (Fluoreszenzlöschung). Erst bei Degradation der RNA durch RNasen kommt es zur räumlichen Trennung und somit zur Aufhebung der Fluoreszenzlöschung, sodass ein Fluoreszenzsignal messbar wird. Somit stellt die Fluoreszenz ein Maß der RNA-Degradation dar. Für die RNase T2^{-/-} THP-1 Zellen ergab sich im Vergleich zum Wildtyp eine stark verminderte, für RNase 2^{-/-} THP-1 Zellen eine leicht verminderte Fluoreszenz. In RNase T2^{-/-} RNase 2^{-/-} war keine Fluoreszenz mehr nachweisbar (Abbildung 1h-k der Originalpublikation). Im Ergebnis war also bei Abwesenheit von RNase T2 und RNase 2 keine signifikante Fluoreszenz und damit, da die Fluoreszenz ein Maß für die RNA-Degradation darstellt, keine Degradation der transfizierten RNA mehr nachweisbar.

3.2 Degradationsprofil von RNase T2 und 2

Zur Ermittlung des Degradationsprofil wurde zunächst das pH-Optimum von RNase 2 und RNase T2 mithilfe der aufgereinigten, rekombinanten RNasen bestimmt. In der

Versuchsreihe mit unterschiedlichen pH-Werten ergab sich für RNase T2, wie beschrieben (Thorn et al., 2012), ein pH-Optimum von 4,5 und für RNase 2 ein Optimum bei pH 5-5,5, das ist eine pH-Einheit unter dem vorbeschriebenen Wert (Sorrentino & Glitz, 1991).

Als nächstes wurden die als TLR8 aktivierend beschriebenen RNA-Liganden hinsichtlich einer Degradation durch RNase 2 und T2 überprüft. Hierbei zeigte sich, dass beide RNasen in der Lage waren, alle verwendeten RNA-Liganden mit PDE-Verbindungen zu schneiden. Bei Verwendung von PTO-Verbindungen ergab sich aber ein anderes Bild: während 002 PTO und ssRNA40 PTO von beiden RNasen degradiert werden konnten, war dies bei 006 PTO lediglich RNase T2, bei 9.2S PTO jedoch RNase 2 vorbehalten (Abbildung S2C der Originalpublikation).

Weiterhin wurde getestet, inwiefern die RNasen in der Lage sind, Homo-/Hetero-RNA-Oligomere zu schneiden. Während RNase 2 kaum Degradation der Homooligomere A₂₁, G₂₁, C₂₁ und U₂₁ sowie der Heterooligomere (GA)₁₀G, (GC)₁₀G, (CU)₁₀G zeigte, war RNase T2 zu einer Degradation von U₂₁, A₂₁, (GU)₁₀G, (CU)₁₀C, (UA)₁₀U und (GA)₁₀G befähigt (Abbildung S3D der Originalpublikation).

Um das Degradationsverhalten detailliert zu untersuchen, führten Dr. Thomas Zillinger und Rebecca Linke (beide ebenfalls Autoren der dieser Dissertation zugrundeliegenden Publikation) umfangreiche massenspektrometrische Analysen durch. Dabei konnten sie das zuvor in Ansätzen ermittelte Profil bestätigen und erweitern. Es zeigte sich, dass RNase 2 zu keiner Degradation hinter Purinen befähigt ist und vorzugsweise hinter (3') Uridinen schneidet, während RNase T2 neben dem oben erwähnten Schneideverhalten vorzugsweise vor (5') Uridinen schneidet. Aus einem Liganden, wie bspw. R2152, der ein zwischen zwei Guanosinnukleotiden positioniertes Uridinnukleotid (-GUG-) enthält, gelingt die Freisetzung von Uridin also nur bei Anwesenheit beider RNasen, da RNase 2 nicht hinter Purinen (in diesem Fall das erste Guanosin der Sequenz -GUG-) schneiden kann, RNase T2 jedoch schon. Letzterer gelingt jedoch nicht die Degradation von UG, was in diesem Fall jedoch RNase 2 gelingt (Abbildungen 4 B-G der Originalpublikation).

Keinerlei Aktivität konnte sowohl für RNase T2 als auch für RNase 2 in Bezug auf 2'-O-methylierte RNA gezeigt werden (Abbildung S3E der Originalpublikation).

Für doppelsträngige RNA (dsRNA) ergab sich ein differenziertes Bild. Dabei war RNase T2 erst in höherer, im Vergleich zur Degradation von ssRNA ca. fünffacher Konzentration, in der Lage, dsRNA zu schneiden (Abbildung 3i-j der Originalpublikation). Für RNase 2 konnte selbst in dieser erhöhten Konzentration nur eine sehr schwache Degradationspotenz nachgewiesen werden (Abbildung 3h, j der Originalpublikation). Erst die Kombination beider RNasen bei einem pH-Wert von 5 ermöglichte eine signifikante Degradation (Abbildung 3j der Originalpublikation).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich die RNase-Abhängigkeit der TLR8-stimulatorischen Potenz jedes einzelnen RNA-Liganden allein anhand der Sequenz vorhersagen.

3.3 Einfluss von RNase T2 und 2 auf beschriebene TLR-Agonisten

Zur Untersuchung, welchen Einfluss die beiden RNasen auf die TLR8-Immunantwort haben, wurden THP-1 Zellen mit RNase-Defizienz sowie PBMC von Patienten mit homozygoter *loss of function*-Mutation im Gen für RNase T2 mit verschiedenen, zuvor beschriebenen Agonisten transfiziert (Abbildung 2A der Originalpublikation).

Hierbei zeigte sich unter Verwendung des FCS-haltigen Kulturmediums für die PDE-verbundenen RNA-Liganden 9.2S RNA sowie U₂₁ eine zum Wildtyp unveränderte Immunantwort in RNase-defizienten Zellen.

Eine vollständige Abhängigkeit von sowohl RNase T2 als auch RNase 2 zeigte sich für den PTO-verbundenen Agonisten ssRNA40. Hier war jeweils in den RNase T2^{-/-}, RNase 2^{-/-} und in den RNase T2^{-/-} RNase 2^{-/-} Zellen keine im Vergleich zu den TLR7/8^{-/-} Zellen hinausgehende Immunantwort messbar.

Eine Abhängigkeit nur von RNase T2 war für den PTO-verbundenen Liganden ORN006 nachweisbar, für ORN002 war die Anwesenheit nur einer der beiden RNasen notwendig (Abbildung 2D der Originalpublikation).

Auffällig war, dass sich für PDE-verbundene RNA-Liganden keine RNase-abhängige TLR8-Immunantwort nachweisen ließ. Interessanterweise verloren auch die PTO-verbundenen Liganden ihre RNase-Abhängigkeit, sobald man die PTO- durch PDE-Verbindungen ersetzte und diese transfizierte (Abbildung 3A der Originalpublikation).

Da es sich bei PDE-verbundener, einzelsträngiger RNA um vollständig unmodifizierte RNA, die mutmaßlich von jeder RNase geschnitten werden kann, handelt, vermuteten wir eine RNA-Degradation durch Serum-RNasen im Zellkulturmedium durch das zugeetzte FBS. Tatsächlich konnte eine starke Degradation von 9.2S RNA durch FBS-

haltiges Medium festgestellt werden. Auch PTO-verbundene 9.2S RNA wurde degradiert, jedoch waren hierfür eine deutlich höhere Konzentration notwendig (ca. 10fach für FBS und ca. 3fach für humanes Serum). Durch Ersatz durch den daraufhin verwendeten Serumersatz war diese Degradation nicht mehr nachweisbar (Abbildung 5E und S5A der Originalpublikation).

Die daraufhin mittels Serumersatz kultivierten THP-1 Zellen wurden erneut mit den beschriebenen RNA-Liganden stimuliert. Um eine möglichst gute Auflösung der Immunantwort zu erhalten, wurde zuvor eine Titration der Konzentration an RNA-Liganden durchgeführt. Die größtmögliche Trennschärfe unter Beibehaltung einer robusten Zytokinantwort ergab sich unter Verwendung von 320ng/mL RNA (Abbildung 5A-B der Originalpublikation). Diese Konzentration nutzten wir für die nachfolgenden Versuche. Nun zeigte sich auch für die PDE-Liganden 9.2S RNA, U₂₁ und sogar für randomisierte 21bp RNA-Oligonukleotide (N₂₁) eine ausbleibende Immunantwort in RNase T2^{-/-} RNase 2^{-/-} THP-1 Zellen, also eine Abhängigkeit von RNase 2 oder RNase T2. Das TLR8 Agonist TL8-506 als *small molecule* war wie erwartet in allen Versuchen von jeglicher RNase-Aktivität unabhängig (Abbildung 5F der Originalpublikation).

Zum Ausschluss anderer, von der Ribonukleaseaktivität unabhängiger Einflüsse im Rahmen der CRISPR-Cas9 vermittelten Genomeditierung auf die TLR8-Immunantwort wurden die RNase-defizienten Zellen mit der jeweils fehlenden, funktionalen RNase mittels Lentivirus transduziert und somit die RNase-Aktivität wiederhergestellt. Dabei konnte eine vollständige Wiederherstellung der TLR8-Immunantwort auf das Niveau von Wildtyp-Zellen erreicht werden (Abbildung S3A der Originalpublikation).

Weiterhin wurde versucht, eine Wiederherstellung der TLR8-Antwort auf den Liganden ORN002, der die Anwesenheit einer der beiden RNasen benötigt, mittels Vorverdau zu erreichen. Dafür wurde die ORN002 RNA mit RNase T2, RNase 2 sowie beiden RNasen analog zu 2.5 inkubiert und danach per poly-L-Arginin in die THP-1 Zellen transfiziert. Es konnte dabei eine, vermutlich durch die aufgrund der kürzeren RNA-Fragmente sowie der Einzelnukleotide erschwerten Transfektionsbedingungen, schwache Wiederherstellung der TLR8-Antwort erzielt werden (Abbildung 3B der Originalpublikation).

Da die natürlich vorkommenden TLR8-Agonisten in Bakterien und Protozoen eine Vielzahl an Sekundärstrukturen bilden, sollte als nächstes die Degradationspotenz in Bezug

auf doppelsträngige RNA (dsRNA) untersucht werden. Dafür wurde 9.2S RNA stellvertretend für die von einer der beiden RNasen abhängige sowie ssRNA40 stellvertretend für die von beiden RNasen abhängige RNA-Liganden mit einer jeweils komplementären RNA hybridisiert. Die so erzeugte dsRNA sowie der TLR8-Agonist R2152 (Hartmann et al., 2018), der als einzelsträngige RNA aufgrund der Basenkomplementarität eine sog. Haarnadelschleife bildet (Abbildung S3F der Originalpublikation) und somit partiell doppelsträngig erscheint, wurden dann in PBMC sowie THP-1 Zellen transfiziert. Die Ergebnisse passen gut zu den Ergebnissen aus den zellfreien Versuchen zum Degradationsprofil der RNasen (3.2): für die effektive Degradation doppelsträngiger RNA werden beide RNasen benötigt und in der Folge ergibt sich eine TLR8-Aktivierung durch dsRNA nur bei Anwesenheit beider RNasen (Abbildungen 3E-G der Originalpublikation).

Um den beobachteten Einfluss der RNasen auch in primären Zellen zu bestätigen, wurden die Stimulationsversuche in PBMC wiederholt. Hierbei wurden PBMC von Patienten mit homozygoter RNase T2-nonsense-Mutation sowie PBMC von Spendern mit intakter RNase T2 verwendet. Es konnte ein Einfluss von RNase T2 auf alle TLR8-agonistischen RNA-Liganden gezeigt werden. Eine IL12p70-Antwort auf ssRNA40 und den nur von RNase T2 abhängigen Liganden ORN006 war in den RNase T2^{-/-} PBMC kaum mehr messbar, auf die Liganden ORN002 und 9.2S war die Antwort auf 30-40% gegenüber gesunden Spendern reduziert. Die TLR8-Immunantwort auf den Liganden R848 als sog. *small molecule* war im Gegensatz dazu sogar gesteigert (Abbildung 2B-C der Originalpublikation). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus den THP-1 Zellen. Die RNA-Liganden, die die Anwesenheit beider RNasen benötigten, waren in RNase T2^{-/-} PBMC zu keiner Immunantwort mehr befähigt. Liganden, die die Anwesenheit nur einer RNase benötigten, ergaben noch eine residuale Immunantwort in diesen PBMC.

3.4 Einfluss von Chloroquin auf beschriebene TLR-Agonisten

Das zur Behandlung der Malaria sowie als DMARD (*disease modifying anti-rheumatic drug*) in der Behandlung rheumatischer Erkrankungen eingesetzte Chloroquin ist als Inhibitor endolysosomaler Ansäuerung bekannt (Blasius & Beutler, 2010) und wurde ebenfalls als Inhibitor der TLR8-Aktivierung durch RNA-Liganden beschrieben (Kužnik et al., 2011). Der genaue Zusammenhang zwischen Inhibition der Ansäuerung und Inhibition der TLR8-Aktivierung war bisher unklar. Aufgrund der Erkenntnis, dass RNA-

Liganden eine Degradation durch RNasen benötigen und die endolysosomalen RNasen wiederum ein pH-Optimum im sauren Bereich haben, wurde der Grund für die verminderte TLR8-Aktivierung in der durch einen veränderten pH verminderten RNase-Aktivität vermutet. Da die TLR8-Aktivierung durch *small molecules* RNase-unabhängig ist, passt der beobachtete geringe Effekt von Chloroquin auf die Immunantwort auf R848 (Kužnik et al., 2011) zu dieser Hypothese. Da keine genomeditierten Zelllinien für diesen Versuch benötigt wurden, war es möglich, für diesen Versuch primäre Zellen in Form von PBMC zu verwenden und durch die Messung von IL12p70 eine TLR8-spezifische Zytokinantwort zu messen.

Die Stimulation von PBMC, vorbehandelt mit verschiedenen Konzentrationen von Chloroquin ($C_{\text{Chloroquin}} \in [0,1;100] \mu\text{M}$), ergab eine inverse Korrelation von IL12p70-Sekretion und Chloroquin-Konzentration. Wie bei Versuchen mit Inhibitoren üblich, wurde der IC_{50} -Wert von Chloroquin für jeden verwendeten Liganden ermittelt. Dabei ergab sich ein Zusammenhang zwischen RNase-Abhängigkeit des Liganden und IC_{50} -Wert. Während für die Inhibition der TLR8-Antwort auf den RNase-unabhängigen Agonisten R848 die höchste Konzentration von Chloroquin notwendig war, ergab sich für den von beiden RNasen abhängigen Liganden ssRNA40 der kleinste IC_{50} -Wert. Ein Vorverdau des Liganden ORN002 mit RNase T2 und RNase 2 erbrachte eine Verdreifachung des IC_{50} -Wertes. Die Zusammenschau dieser Befunde bestätigt also die Hypothese, dass Chloroquin durch die Inhibition endolysosomaler Ansäuerung die Aktivität von RNase 2 und T2 herabsetzt und in der Konsequenz die TLR8-Aktivierung durch RNA-Liganden inhibiert (Abbildungen 3C-D der Originalpublikation).

3.5 TLR8-Immunantwort auf Bakterien und *P. falciparum*

Da die TLR8-Immunantwort unter normalen Lebensbedingungen nicht durch synthetische Oligoribonukleotide, sondern durch RNA von phagozytierten Mikroorganismen erfolgt, wurde nachfolgend RNA von sowohl gramnegativen (*E. coli*, *L. monocytogenes* und *S. marcescens*) als auch von grampositiven (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*) Bakterien sowie solche von *Plasmodium falciparum* isoliert und auf eine RNase-Abhängigkeit hinsichtlich der Aktivierung von TLR8 untersucht. Die isolierte und aufgereinigte RNA wurde in THP-1 sowie in PBMC transfiziert und die Zytokinexpression gemessen.

Dabei konnte eine stark reduzierte TLR8-Antwort in RNase T2^{-/-} THP-1 und BLaER1 Zellen für alle verwendeten Pathogen-RNAs beobachtet werden (Abbildung 6A, S6A

der Originalpublikation). Analog zu den Versuchen mit synthetischen Oligoribonukleotiden konnte ein Ribonuklease-unabhängiger Effekt durch vollständige Wiederherstellung der TLR8-Immunantwort durch lentivirale Transduktion der jeweiligen RNase ausgeschlossen werden (Abbildung S6B der Originalpublikation). Während die Immunantwort in RNase 2^{-/-} Zellen nur minimal reduziert war, führte das Fehlen beider RNasen zur vollständigen Inhibition der Immunantwort (Abbildung 6A, S6a der Originalpublikation).

Mithilfe der PBMC von Patienten mit kongenitaler, homozygoter RNase T2-Defizienz konnten wir diesen Effekt auch in primären Zellen nachweisen. Die TLR8-spezifische IL12p70- sowie die IFN- γ -Antwort auf bakterielle RNA und auf die RNA von *P. falciparum* war in den RNase T2^{-/-} PBMC um den Faktor 10-100 verringert, während die Zytokinantwort auf das RNase-unabhängige R848 im Vergleich zu gesunden Spendern sogar erhöht war (Abbildung 6C-D der Originalpublikation). Dies beweist die generelle Funktionsfähigkeit und möglicherweise sogar Hochregulation von TLR8 bei Patienten mit RNase T2-Defizienz.

Wie zuvor beschrieben, findet eine RNA-Degradation auch durch Serum-RNasen statt. Dies ist ein potentieller Störfaktor in der Untersuchung des Einflusses von RNase T2 und 2 auf die Aktivierung von TLR8. Da RNA von Mikroorganismen wie Bakterien oder Protozoen *in vivo* durch die Zelle an sich vor Serum-RNasen geschützt ist und erst im Endolysosom freigesetzt wird, war es gleichermaßen wichtig wie auch legitim, die RNA-Degradation durch Serum-RNasen durch Verwendung von Serumersatz zu verhindern. Aufgrund der Notwendigkeit einer mehrtägigen Gewöhnungsphase bei Substitution des FBS durch Serumersatz, konnten diese Versuche in serumfreiem Kulturmedium nicht mit primären Zellen durchgeführt werden. Daher verwendeten wir stattdessen THP-1 Zellen mit und ohne RNase-Defizienz. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch das Fehlen von RNase 2, anders als in den Versuchen mit FBS-haltigem Serum, zu einer signifikanten, im Vergleich zum Fehlen von RNase T2 jedoch weniger stark ausgeprägten Reduktion der TLR8-Antwort auf diese Pathogen-RNA führt (Abbildung 6E, S6C).

Wie schon gezeigt werden konnte (Eigenbrod et al., 2015; Coch et al., 2019) kann auch durch Inkubation von THP-1 Zellen mit lebenden Bakterien respektive Plasmodien eine TLR8 abhängige Immunantwort erzeugt werden. Auch in diesem, der Situation *in vivo* näherkommenden Versuch konnte für die TLR8-Antwort auf Bakterien und mit Plasmemo-

dien infizierte Erythrozyten (iRBC) eine Abhängigkeit von sowohl RNase 2 als auch RNase T2 nachgewiesen werden (Abbildung 6H-I). In diesem Versuch konnte also trotz Verwendung von FBS- und somit RNase-haltigem Kulturmedium eine Reduktion der TLR8-Antwort sowohl für RNase T2^{-/-} als auch RNase 2^{-/-} THP-1 Zellen nachgewiesen werden. Die Lokalisation der RNA innerhalb der jeweiligen Zelle des Pathogens schützt also vor der Degradation durch Serum-RNasen und hängt somit allein von den endolysosomal RNasen T2 und 2 ab.

4. Diskussion

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass eine koordiniert durch RNase T2 und 2 erfolgende Degradation von RNA eine Aktivierung von TLR8 durch die dadurch entstehenden Degradationsprodukte (Uridin-Einzelnukleotide sowie uridinhaltige Di- und Trinukleotide) ermöglicht. Wir konnten somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Erkennung von Infektionen sowie der darauffolgenden Aktivierung des Immunsystems leisten. Die Erkenntnisse zum Aktivierungsmechanismus von TLR8 ermöglicht nicht nur ein Verständnis zur Erkennung von aus Pathogenen stammender RNA, sondern eröffnet insbesondere auch die Chance, spezifische TLR8-agonistische Oligoribonukleotide zu entwickeln.

Offen geblieben ist jedoch der Zusammenhang von konnataler RNase T2-Defizienz und der daraus resultierenden psychomotorischen Retardierung. Klinisch sowie morphologisch ähnelt dieses Krankheitsbild den als Aicardi-Goutières-Syndrom zusammengefassten Enzephalopathien, die trotz ausbleibenden Erregernachweises den vertikalen Infektionen durch STORCH-Pathogene ähneln (Tonduti et al., 2016) und auch als *zystische Leukoencephalopathien ohne Megaloencephalopathie* (CLWM) zusammengefasst werden. Zur Gruppe der CLWM gehören bereits eine Vielzahl an monogenetischen Krankheitsbildern, darunter auch Defekte anderer Nukleasen wie z.B. DNase II (Rodero et al., 2017). All diesen Krankheitsbildern ist gemeinsam, dass sie eine Typ I-Interferon geprägte Autoinflammation aufweisen, die während der Entwicklung des Gehirns zu der beschriebenen Morphologie mit Zysten, Leukoencephalopathie und intracerebralen Verkalkungen führt (Rodero & Crow, 2016). Die Tatsache, dass RNase T2 zusammen mit RNase 2 eine notwendige Instanz in der Immunantwort durch TLR8 bildet und somit, vereinfachend, eine eher pro-inflammatorische Rolle einnimmt, erscheint zunächst im Widerspruch zur Hyperinflammation bei Patienten mit einer RNase T2-Defizienz zu stehen. Dieser Widerspruch löst sich jedoch auf, indem man das zuvor erwähnte Profil der RNase T2 mit dem der RNase 2 vergleicht. Während RNase 2 nahezu nur in der myeloischen Zellreihe exprimiert wird, findet man RNase T2 ubiquitär, also insbesondere auch in den Zellen, die TLR8 nicht exprimieren, vor. Sie scheint also eine Art „haushalterische“ Aufgabe zu übernehmen, indem sie endolysosomal anfallende RNA beispielsweise im Rahmen der Autophagie von Zellkompartimenten wie den Mitochondrien (Fujiwara et al., 2016) degradiert. Im Falle einer RNase T2-Defizienz wäre diese Degrada-

dation nicht mehr möglich, sodass in der Konsequenz die RNA den Lysosomen akkumuliert (Haud et al., 2011). Ein möglicherweise bestehender Zusammenhang von lysosomaler RNA-Akkumulation und Hyperinflammation durch Aktivierung anderer RNA-Rezeptoren wurde bis dato in keiner Studie gezeigt und wäre ein wichtiger Baustein im Verständnis der Erkrankung. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte bereits für DNase II, die CpG-haltige DNA-Degradationsprodukte für die Aktivierung von TLR9 bereitstellt, gezeigt werden (Krug et al., 2001; Chan et al., 2015). Eine Defizienz von DNase II hat aufgrund endolysosomaler DNA-Akkumulation bei ausbleibender TLR9-Aktivität jedoch eine zytosolische cGAS-STING-Aktivierung zur Folge (Rodero et al., 2017). Der beteiligte Rezeptor im Falle von akkumulierender RNA ist Gegenstand aktueller Studien.

Die Tatsache, dass auch zelleigene, also humane RNA endolysosomal degradiert wird, wirft die Frage auf, warum dies zu keiner TLR8 Aktivierung führt. Wie in 3.2 gezeigt, wird 2'O-methylierte RNA nicht durch RNase T2 und RNase 2 degradiert und kann so nicht zu einer Aktivierung von TLR8 führen. Da menschliche RNA eine Vielzahl an post-translationalen Modifikationen, darunter die Etablierung von Thioketonen, Methylierungen, Pseudouridinen und Hydroxymethylierungen (Freund et al., 2019), erfährt, könnte eine deshalb an entscheidender Stelle ausbleibende Ribonukleolyse zu einer fehlenden Freisetzung von Uridinmononukleotiden sowie von uridinhaltigen Di- und Trinukleotiden führen, die für eine Aktivierung von TLR8 notwendig sind. Für die 2'O-Methylierung haben wir diesen Zusammenhang nachweisen können, für die übrigen beschriebenen Modifikationen ist dies noch zu zeigen. Hierbei wäre zusätzlich zu klären, ob die von uns nicht untersuchten Modifikationen zu einer ausbleibenden RNase-Degradation oder zu einer ausbleibenden Rezeptorbindung führen. Zumindest dürften bei Inhibition der RNase-Degradation nur partiell Nukleotide modifiziert sein, um eine Ansammlung lysosomaler, eigener RNA zu verhindern.

Von Relevanz ist dieser Mechanismus auch für die Entwicklung von mRNA-Impfstoffen. Da diese unweigerlich auch endolysosomal aufgenommen werden und somit potentiell zu einer Aktivierung von TLR8 führen können, ist die Basenmodifikation, wie z.B. das Einführen von N1-Methyl-Pseudouridin (Karikó et al., 2005), der RNA ebenjener Impfstoffe von großer Bedeutung. So kann der Grad der Aktivierung von TLR8 gesteuert werden und somit sowohl eine Aktivierung mit darauffolgender angeborener Immunantwort, möglicherweise, um ein „Priming“ des Immunsystems zu bewirken, als auch eine

Unterbindung ebenjener Aktivierung, um mögliche Nebenwirkungen dieser Impfstoffe abzuschwächen, forciert werden.

5. Zusammenfassung

Die Funktion des endolysosomal lokalisierten *Toll-like receptor* (TLR) 8 war lange Zeit ungeklärt. In Mäusen funktionslos, führt eine Aktivierung in humanen Monozyten und Makrophagen, in denen TLR8 hauptsächlich exprimiert wird, zu einer durch IL-12p70 vermittelten TH1-Immunantwort auf intrazelluläre Pathogene bzw. deren RNA. Der genaue Aktivierungsmechanismus war zu Beginn unserer Studie jedoch unbekannt. Einen Hinweis auf eine möglicherweise notwendige, vorherige ribonukleolytische Degradation der Pathogen-RNA lieferte eine Studie, in der die Ektodomäne von TLR8 mit zuvor als aktivierend beschriebener ssRNA ko-kristallisiert wurde: Statt eines Komplex aus TLR8 mit intakter ssRNA wurden zwei räumlich getrennte Bindungstaschen, die ein einzelnes Uridin in der einen und uridinhaltige Di- oder Trinukleotide in der anderen Tasche enthielten.

Auf der Suche nach in diesem Prozess potentiell involvierten RNasen stießen wir auf RNase T2 und 2, die beide endolysosomal lokalisiert sind. Ziel unserer Studie war, diese beiden RNasen hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Aktivierung von TLR8 durch die Produktion von passenden RNA-Degradationsprodukten zu untersuchen.

Zu Beginn der Studie erstellten wir für beide RNasen ein Degradationsprofil. Passend zu lysosomalen RNasen ergab sich für beide RNasen ein pH-Optimum im sauren Bereich. Das Degradationsprofil der beiden RNasen unterschied sich vor allem hinsichtlich der Basenspezifität, auch im Hinblick auf Uridin: RNase T2 schneidet jeweils vor (5') einem Uridin, RNase 2 dahinter (3'), sodass die für die Aktivierung von TLR8 notwendige Freisetzung von Uridinen ermöglicht wird.

Die Abwesenheit von nur einer der beiden RNasen durchbricht diesen Synergismus und führt zu einer deutlich abgeschwächten TLR8-Antwort auf genannte RNA-Agonisten.

Diesen Zusammenhang konnten wir sowohl für synthetische TLR8-RNA-Liganden als auch für natürlich vorkommende TLR8-Liganden in Form von bakterieller oder Protozoen-RNA nachweisen.

Die Degradation doppelsträngiger RNA war signifikant effizienter bei Anwesenheit beider RNasen. Keine Degradation konnte bei Verwendung von 2'-O-methylierter RNA als Substrat festgestellt werden, passend zu der Tatsache, dass bei Verwendung von derart modifizierter RNA auch keine TLR8-Aktivierung mehr nachweisbar war.

Zusätzlich zeigten wir, dass das zur Malariatherapie eingesetzte Medikament Chloroquin durch Inhibition der lysosomalen Ansäuerung zu einer Aufhebung der TLR8-Antwort auf RNA führte, während die TLR8-Antwort auf non-RNA-TLR-Liganden weitgehend erhalten blieb. Chloroquin erhöht den endolysosomalen pH-Wert so weit, dass keine nennenswerte Ribonukleolyse mehr stattfindet und in der Konsequenz keine TLR8-Liganden generiert werden. Dieser Zusammenhang kann ein Ansatz in der bis dato nicht geklärten Funktionsweise von Chloroquin als Antirheumatikum (sog. *Disease Modifying Antirheumatic Drug, DMARD*) sein.

In Kollaboration mit der Abteilung für Neuropädiatrie der Universitätsmedizin in Göttingen isolierten wir PBMC (*mononucleäre Zellen des peripheren Bluts*), eines Patienten mit einer homozygoten RNase T2-Defizienz. Diese Zellen zeigten eine signifikant abgeschwächte, in Teilen sogar gänzlich fehlende Immunantwort auf TLR8-aktivierende RNA.

Durch unsere Arbeit konnte gezeigt werden, dass erst die ribonukleolytische Degradation pathogener RNA durch RNase T2 und 2 eine TLR8-Aktivierung ermöglicht, indem Uridinmononukleotide sowie uridinhaltige Di- oder Trinukleotide freigesetzt werden. Dieser Zusammenhang erklärt die Sequenzabhängigkeit der TLR8-Aktivierung und weshalb Modifikationen, wie z.B. die 2'-O-Methylierung, einzelner Nukleotide, die die Degradation durch RNase T2 und 2 verhindern, die TLR8-Antwort inhibieren. Dieses Wissen kann helfen, bei RNA-Oligonukleotid-basierten Therapien die TLR8-Aktivierung gezielt zu steuern. Medikamente, die RNase T2/2-Aktivität vermindern, könnten helfen, einer TLR8-vermittelten Autoinflammation entgegenzuwirken.

6. Literaturverzeichnis

Ablasser, A., Poeck, H., Anz, D., Berger, M., Schlee, M., Kim, S., Bourquin, C., Goutagny, N., Jiang, Z., Fitzgerald, K.A., Rothenfusser, S., Endres, S., Hartmann, G. & Hornung, V. Selection of Molecular Structure and Delivery of RNA Oligonucleotides to Activate TLR7 versus TLR8 and to Induce High Amounts of IL-12p70 in Primary Human Monocytes. *The Journal of Immunology*. 2009; 182: 6824–6833

Alexopoulou, L., Desnues, B. & Demaria, O. Le récepteur Toll-like 8. *médecine/sciences (Paris)*. 2012; 28: 96–102

Bergstrøm B., Aune M.H., Awuh J.A., Kojen J.F., Blix K.J., Ryan L., Flo T.H., Mollnes T.E., Espevik T. & Stenvik J. TLR8 Senses *Staphylococcus aureus* RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN- β Production via a TAK1 -IKK β -IRF5 Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. 2015; 195: 1100-1111

Blasius, A.L. & Beutler, B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*. 2010; 32: 305–315

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I. & Kagan, J.C. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annual Review of Immunology*. 2015; 33: 257–290

Campomenosi, P., Salis, S., Lindqvist, C., Mariani, D., Nordström, T., Acquati, F. & Taramelli, R. Characterization of RNASET2, the first human member of the Rh/T2/S family of glycoproteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006; 449: 17–26

Chan, M.P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S.-I., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G.N. & Miyake, K. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nature Communications*. 2015; 6: 5853

Coch, C., Hommertgen, B., Zillinger, T., Daßler-Plenker, J., Putschli, B., Nastaly, M., Kümmerer, B.M., Scheunemann, J.F., Schumak, B., Specht, S., Schlee, M., Barchet, W., Hoerauf, A., Bartok, E. & Hartmann, G. Human TLR8 Senses RNA From *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells Which Is Uniquely Required for the IFN- γ Response in NK Cells. *Frontiers in Immunology*. 2019; 52: 591-605

Doudna, J.A., Doudna, J.A., Charpentier, E. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346: 1258096

Eigenbrod, T., Pelka, K., Latz, E., Kreikemeyer, B. & Dalpke, A.H. TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Immunology*. 2015; 195: 1092–1099

Forsbach, A., Nemorin, J.-G., Montino, C., Müller, C., Samulowitz, U., Vicari, A.P., Jurk, M., Mutwiri, G.K., Krieg, A.M., Lipford, G.B. & Vollmer, J. Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses. *The Journal of Immunology*. 2008; 180: 3729–3738

Freund, I., Eigenbrod, T., Helm, M. & Dalpke, A. RNA Modifications Modulate Activation of Innate Toll-Like Receptors. *Genes*. 2019; 10: 92–18

Fujiwara, Y., Wada, K. & Kabuta, T. Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids - multiple autophagic pathways. *Journal of biochemistry*. 2016, 161: 145-154

Greulich, W., Wagner, M., Gaidt, M.M., Stafford, C., Cheng, Y., Linder, A., Carell, T. & Hornung, V. TLR8 Is a Sensor of RNase T2 Degradation Products. *Cell*. 2019; 179: 1264–1275

Hartmann G., Barchet W., Wimmenauer V. TLR8 ligand and uses thereof. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2018, EP 3263707 A1, Divisional application: EP20170168762.

Haud, N., Kara, F., Diekmann, S., Henneke, M., Willer, J.R., Hillwig, M.S., Gregg, R.G., MacIntosh, G.C., Gärtner, J., Alia, A. & Hurlstone, A.F.L. rnas2 mutant zebrafish model familial cystic leukoencephalopathy and reveal a role for RNase T2 in degrading ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 1099-1103

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science*. 2004; 303: 1526-1529

Henneke, M., Diekmann, S., Ohlenbusch, A., Kaiser, J., Engelbrecht, V., Kohlschütter, A., Krätzner, R., Madruga-Garrido, M., Mayer, M., Opitz, L., Rodriguez, D., Rüschemdorf, F., Schumacher, J., Thiele, H., Thoms, S., Steinfeld, R., Nürnberg, P. & Gärtner, J. RNASET2-deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nature Genetics*. 2009; 41: 773–775

Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. & Hartmann, G. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature Medicine*. 2005; 11: 263–270

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G. & Bauer, S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*. 2002; 3: 499

Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity*. 2005; 23: 165-175

Krug, A., Tomarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M. & Hartmann, G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunology*. 2001; 31: 3026-3037

Kutner, R.H., Zhang, X.-Y. & Reiser, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nature Protocols*. 2009; 4: 495–505

Kužnik, A., Benčina, M., Švajger, U., Jeras, M., Rozman, B. & Jerala, R. Mechanism of Endosomal TLR Inhibition by Antimalarial Drugs and Imidazoquinolines. *The Journal of Immunology*. 2011; 186: 4794–4804

Lu, H., Dietsch, G.N., Matthews, M.A.H., Yang, Y., Ghanekar, S., Inokuma, M., Suni, M., Maino, V.C., Henderson, K.E., Howbert, J.J., Disis, M.L. & Hershberg, R.M. VTX-

2337 Is a Novel TLR8 Agonist That Activates NK Cells and Augments ADCC. *Clinical Cancer Research*. 2012, 18: 499–509

Lu, L., Li, J., Moussaoui, M. & Boix, E. Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 1012

Luhtala, N. & Parker, R. T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends in Biochemical Sciences*. 2010; 35: 253–259

Lübke, T., Lobel, P. & Sleat, D.E. *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Molecular Cell Research*. 2009; 1793: 625–635

MacIntosh, G.C. RNase T2 Family: Enzymatic Properties, Functional Diversity, and Evolution of Ancient Ribonucleases'. In: Allen W. Nicholson, ed. *Ribonucleases*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 89–114

Manders, E.M.M., Verbeek, F.J. & Aten, J.A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*. 1993; 169: 375–382

Ostendorf, T., Zillinger, T., Andryka, K., Schlee-Guimaraes, T.M., Schmitz, S., Marx, S., Bayrak, K., Linke, R., Salgert, S., Wegner, J., Grasser, T., Bauersachs, S., Soltesz, L., Hübner, M.P., Nastaly, M., Coch, C., Kettwig, M., Roehl, I., Henneke, M., Hoerauf A., Barchet W., Gärtner J., Schlee M., Hartmann G. & Bartok E. Immune Sensing of Synthetic, Bacterial, and Protozoan RNA by Toll-like Receptor 8 Requires Coordinated Processing by RNase T2 and RNase 2. *Immunity*. 2020; 52: 591–605

Rapino, F., Robles, E.F., Richter-Larrea, J.A., Kallin, E.M., Martinez-Climent, J.A. & Graf, T. C/EBP α Induces Highly Efficient Macrophage Transdifferentiation of B Lymphoma and Leukemia Cell Lines and Impairs Their Tumorigenicity. *CellReports*. 2013; 3: 1153–1163

Rodero, M.P. & Crow, Y.J. Type I interferon – mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *The Journal of Experimental Medicine*. 2016; 213: 2527–2538

Rodero, M.P., Tesser, A., Bartok, E., Rice, G.I., Mina, Della, E., Depp, M., Beitz, B., Bondet, V., Cagnard, N., Duffy, D., Dussiot, M., Frémond, M.-L., Gattorno, M., Guillem, F., Kitabayashi, N., Porcheray, F., Rieux-Laucat, F., Seabra, L., Ugenti, C., Volpi S., Zeef L.A.H., Alyanakian M.-A., Beltrand J., Bianco A.M., Boddaert N., Brouzes C., Candon S., Caorsi R., Charbit M., Fabre M., Faletra F., Girard M., Harroche A., Hartmann E., Lasne D., Marcuzzi A., Neven B., Nitschke P., Pascreau T., Pastore S., Picard C., Picco P., Piscianz E., Polak M., Quartier P., Rabant M., Stocco G., Taddio A., Uettwiller F., Valencic E., Vozzi D., Hartmann G., Barchet W., Hermine O., Bader-Meunier, B., Tommasini A., Crow Y. J. Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nature Communications*. 2017; 8: 2176

Rosenberg, H. Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN/RNase 2) and the Mouse Eosinophil-Associated RNases (mEars): Expanding Roles in Promoting Host Defense. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16: 15442–15455

Rouillard, A.D., Gundersen, G.W., Fernandez, N.F., Wang, Z., Monteiro, C.D., McDermott, M.G. & Ma'ayan, A. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database*. 2016; baw100

Schlee, M. & Hartmann, G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nature Reviews Immunology*. 2016; 16: 566–580

Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K.A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig J., Hartmann G. Recognition of 5' Triphosphate by RIG-I Helicase Requires Short Blunt Double-Stranded RNA as Contained in Panhandle of Negative-Strand Virus. *Immunity*. 2009; 31: 25–34

Schmiedel, B.J., Singh, D., Madrigal, A., Valdovino-Gonzalez, A.G., White, B.M., Zapardiel-Gonzalo, J., Ha, B., Altay, G., Greenbaum, J.A., McVicker, G., Seumois, G., Rao, A., Kronenberg, M., Peters, B. & Vijayanand, P. Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression. *Cell*. 2018; 175: 1701-1715

Sorrentino, S. & Glitz, D.G. Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). *Federation of European Biochemical Societies*. 1992; 288: 23–26

Sorrentino, S. & Libonati, M. Human Pancreatic-Type and Nonpancreatic-Type Ribonucleases: A Direct Side-by-Side Comparison of Their Catalytic Properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994; 312: 340-348

Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K. & Shimizu, T. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2015; 22: 109–115

Thorn, A., Steinfeld, R., Ziegenbein, M., Grapp, M., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Sheldrick, G.M., Gärtner, J. & Krätzner, R. Structure and activity of the only human RNase T2. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40: 8733–8742

Tonduti, D., Crow, Y.J., Orcesi, S., Jenkinson, E.M., Dorboz, I., Renaldo, F., Panteghini, C., Rice, G.I., Henneke, M., Livingston, J.H., Elmaleh, M., Burglen, L., Willemsen, M.A.A.P., Chiapparini, L., Garavaglia, B., Rodriguez, D., Boespflug-Tanguy, O., Moroni, I. & Crow, Y.J. Clinical, radiological and possible pathological overlap of cystic leukoencephalopathy without megalencephaly and Aicardi-Goutières syndrome. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2016; 20: 604–610

Zhang, Y., El-Far, M., Dupuy, F.P., Abdel-Hakeem, M.S., He, Z., Procopio, F.A., Shi, Y., Haddad, E.K., Ancuta, P., Sekaly, R.-P. & Said, E.A. HCV RNA Activates APCs via TLR7/TLR8 While Virus Selectively Stimulates Macrophages Without Inducing Antiviral Responses. *Nature Publishing Group*. 2016; 6: 29447

Immunity

Immune Sensing of Synthetic, Bacterial, and Protozoan RNA by Toll-like Receptor 8 Requires Coordinated Processing by RNase T2 and RNase 2

Highlights

- Endolysosomal RNase 2 and RNase T2 cooperatively process RNA into TLR8 ligands
- RNase 2 and RNase T2 synergistically release uridine from RNA ligands
- RNase T2-hypomorphic patients have an impaired to TLR8 response to pathogen RNA
- Sensing of live pathogens by TLR8 requires both RNase 2 and RNase T2

Authors

Thomas Ostendorf, Thomas Zillinger, Katarzyna Andryka, ..., Martin Schlee, Gunther Hartmann, Eva Bartok

Correspondence

ebartok@uni-bonn.de

In Brief

Toll-like receptor 8 (TLR8) is an endosomal RNA sensor that induces a robust T-helper 1 response downstream of pathogen recognition. Ostendorf and colleagues identify two RNases, RNase 2 and RNase T2, which synergistically process pathogen RNA into TLR8 ligands and are critically required for the sensing of live bacteria and plasmodia.



Immune Sensing of Synthetic, Bacterial, and Protozoan RNA by Toll-like Receptor 8 Requires Coordinated Processing by RNase T2 and RNase 2

Thomas Ostendorf,^{1,7} Thomas Zillinger,^{1,7} Katarzyna Andryka,¹ Thais Marina Schlee-Guimaraes,¹ Saskia Schmitz,¹ Samira Marx,¹ Kübra Bayrak,¹ Rebecca Linke,¹ Sarah Salgert,¹ Julia Wegner,¹ Tatjana Grasser,² Sonja Bauersachs,² Leon Soltesz,¹ Marc P. Hübner,³ Maximilian Nastaly,¹ Christoph Coch,^{1,4} Matthias Kettwig,⁵ Ingo Roehl,² Marco Henneke,⁵ Achim Hoerauf,^{3,6} Winfried Barchet,^{1,6} Jutta Gärtner,⁵ Martin Schlee,¹ Gunther Hartmann,^{1,6,7} and Eva Bartok^{1,7,8,*}

¹Department of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

²Axolabs GmbH, Fritz-Hornschuch-Strasse 9, 95326 Kulmbach, Germany

³Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology (IMMIP), University Hospital Bonn, Bonn, Germany

⁴Miltenyi Biotec, Biomedicine Division, Bergisch Gladbach, Germany

⁵Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Division of Pediatric Neurology, University Medical Center Göttingen, Georg August University, Göttingen, Germany

⁶German Center for Infection Research (DZIF), partner site Bonn-Cologne, Cologne, Germany

⁷These authors contributed equally

⁸Lead Contact

*Correspondence: ebartok@uni-bonn.de

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.009>

SUMMARY

Human toll-like receptor 8 (TLR8) activation induces a potent T helper-1 (Th1) cell response critical for defense against intracellular pathogens, including protozoa. The receptor harbors two distinct binding sites, uridine and di- and/or trinucleotides, but the RNases upstream of TLR8 remain poorly characterized. We identified two endolysosomal endoribonucleases, RNase T2 and RNase 2, that act synergistically to release uridine from oligoribonucleotides. RNase T2 cleaves preferentially before, and RNase 2 after, uridines. Live bacteria, *P. falciparum*-infected red blood cells, purified pathogen RNA, and synthetic oligoribonucleotides all required RNase 2 and T2 processing to activate TLR8. Uridine supplementation restored RNA recognition in *RNASE2*^{-/-} or *RNASET2*^{-/-} but not *RNASE2*^{-/-} *RNASET2*^{-/-} cells. Primary immune cells from RNase T2-hypomorphic patients lacked a response to bacterial RNA but responded robustly to small-molecule TLR8 ligands. Our data identify an essential function of RNase T2 and RNase 2 upstream of TLR8 and provide insight into TLR8 activation.

INTRODUCTION

The pattern-recognition receptors (PRRs) of the endosomal compartment are ideally situated to detect ligands released by the hydrolytic degradation of pathogens (Brubaker et al., 2015), including “foreign” nucleic acids. Several endosomal PRRs can sense pathogen-derived RNA and DNA as well as

mislocalized or altered self RNA and DNA (Schlee and Hartmann, 2016). The endosomal PRR toll-like receptor 8 (TLR8) can sense RNA from a broad variety of pathogens, such as viruses, bacteria (Bergström et al., 2015; Eigenbrod et al., 2015), and protozoa (Coch et al., 2019). Stimulation of TLR8 in monocytes and macrophages induces a potent downstream T helper-1 (Th1) cell response including the release of the Th1 cell-associated cytokines interleukin-18 (IL-18) and IL-12p70, which, in turn trigger interferon- γ (IFN- γ) release from natural killer (NK) cells (Coch et al., 2019). The induction of IL-12p70 in monocytes is non-redundant with other TLRs and of particular importance to host defense against intracellular pathogens. However, because of the lack of functional TLR8 expression in mice, we are only beginning to understand the role of TLR8 in human immunity (Alexopoulou et al., 2012).

To date, a variety of TLR8 activators have been described, including bacterial ribosomal RNA, short single-stranded oligoribonucleotides (ORNs) (Ablasser et al., 2009; Forsbach et al., 2008; Heil et al., 2004), and small-molecule ligands, such as R848 (Jurk et al., 2002) and the TLR8-specific agonist VTX-2337 (Lu et al., 2012). However, the precise nature of the specific ligands that activate TLR8 remains unclear. Co-crystal structures of TLR8 have been published (Tanji et al., 2015) with single-stranded RNA (ssRNA) agonists: ORN006 with and without a full-phosphorothioate (PTO) backbone (Forsbach et al., 2008), and ssRNA40 (Heil et al., 2004). These structures have revealed that TLR8 harbors two distinct binding pockets, one for the nucleoside uridine and one for di- and trinucleotides (e.g., UG, NUG, or UGN). This suggests that stimulation of TLR8 by diverse RNAs may involve a common RNA-degradation pathway by RNases to generate shorter nucleotides that activate TLR8 as observed in the TLR8/ORN006 co-crystal structure. Moreover, because many synthetic TLR8 ligands contain fully PTO-linked RNA or complex secondary structures (e.g., double-stranded RNA [dsRNA]), these RNases must also be active on such substrates.



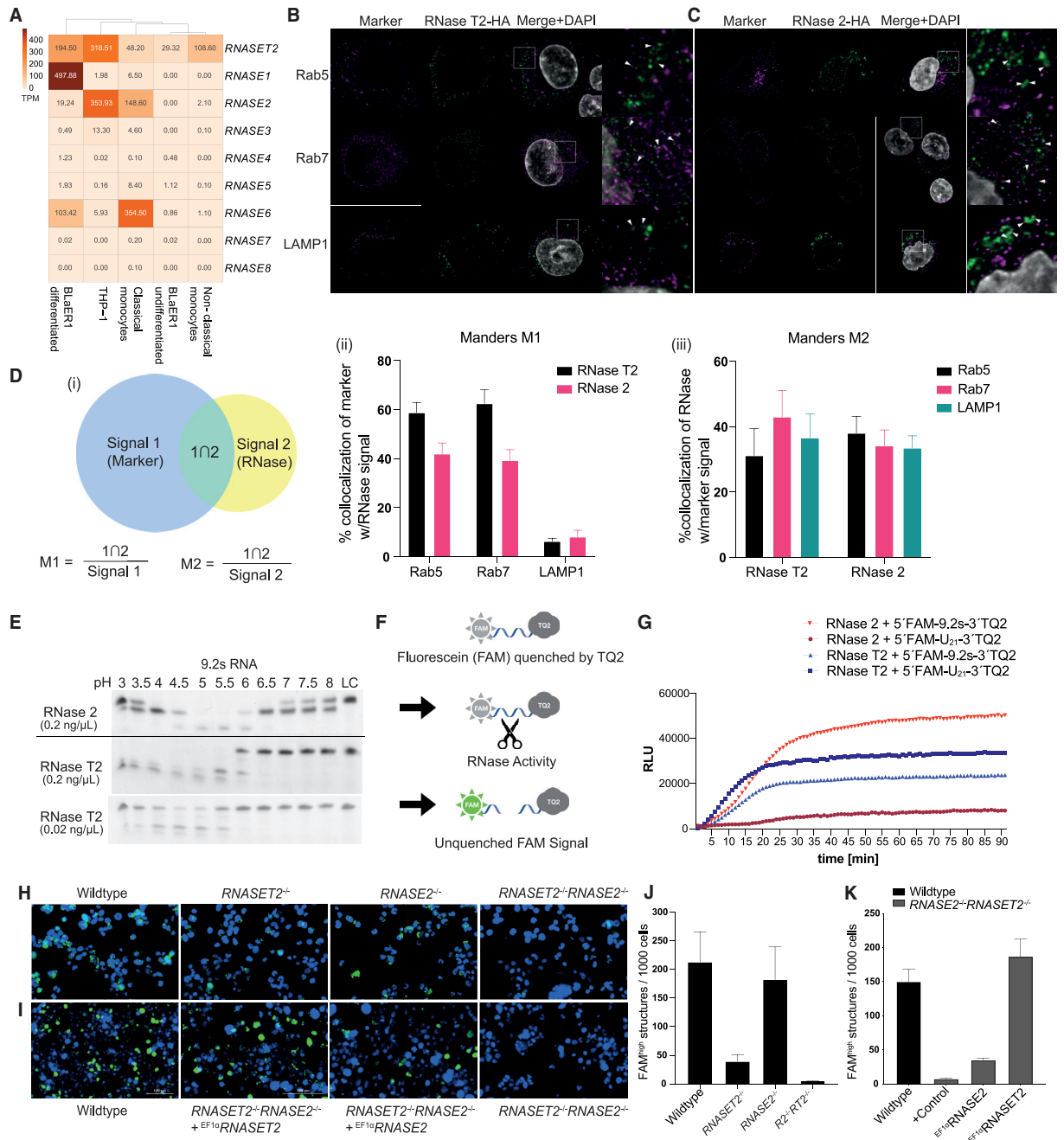


Figure 1. RNase 2 and RNase T2 Drive Endolysosomal RNA Degradation in Monocytic Cells

(A) Transcripts per million (TPM) of RNase expression from canonical and non-canonical monocytes (Schmiedel et al., 2018) and 3'mRNA sequencing from THP-1, undifferentiated and transdifferentiated BLaER1 cells.

(B and C) Maximum intensity projections of confocal z stacks of THP-1 cells transduced with RNase T2-HA (B) or RNase 2-HA (C). Cells were co-stained for the hemagglutinin (HA) tag, endolysosomal markers, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Third column shows the merge of HA, marker, and DAPI. Close-up images (fourth column) are the rectangles in the third column.

(D) (i) Schematic of Manders overlap coefficients M1 and M2. (ii,iii) M1 and M2 coefficients calculated from 2 experiments with 3 cells each. Data are displayed as mean \pm SEM of percent overlap as defined in (i).

(E) PAGE of pH titration of 9.2s RNA digested with RNase 2 or RNase T2.

(F) Schematic overview of the 5'FAM-RNA-3'TQ2 construct.

(legend continued on next page)

Humans express a wide variety of RNases, including the transferase-type endonucleases of the RNase T2 and RNase A families (Deshpande and Shankar, 2002). Only one member of the RNase T2 family, RNase T2, is present in humans, but its structure and function are highly conserved, even among bacteria and plants (MacIntosh, 2011). RNase T2 is ubiquitously expressed in nucleated cells, where it is involved in autophagy and degradation of mitochondrial RNA (Fujiwara et al., 2017) and has been reported to be localized to the endolysosome and excreted into the extracellular space (Lu et al., 2018). Rare hypomorphic variants of RNase T2 in humans have been associated with cystic leukoencephalopathy without megalencephaly (CLWM), which is characterized by devastating developmental and neurological defects. The clinical picture of this disease resembles a conatal infection with cytomegalovirus (Henneke et al., 2009), and zebrafish deficient in RNase T2 show endolysosomal accumulation of RNA in neurons (Haud et al., 2011). RNase T2 has also been described as a tumor suppressor and regulator of innate immunity (Acquati et al., 2019), and, only very recently, another group has reported that RNase T2 is required for TLR8 activation by ssRNA40 (Greulich et al., 2019).

RNase 2 is a member of the RNase A superfamily. Like RNase T2, RNase 2 has been reported to be lysosomal (Lübke et al., 2009) and extracellular (Lu et al., 2018). However, the RNase A family has undergone rapid evolution. RNase 2 results from a gene duplication that is unique to Old World monkeys and humans (Rosenberg et al., 1995) and only expressed in the myeloid compartment. RNase 2 has reported antiviral activity, which has been linked to its ability to destroy viral RNA (Lu et al., 2018; Rosenberg, 2008), although TLR7 activation has also been hypothesized (Lu et al., 2018). Moreover, several RNase A family members, including RNase 2, have been reported to contribute to the RNase activity of the serum (Sorrentino, 2010).

In this study, we demonstrate that the activity of two endolysosomal RNases, RNase 2 and RNase T2, is sufficient for the processing of all TLR8-activating RNA agonists. RNAs with PTO linkages or dsRNA critically required expression of both RNases 2 and T2 to activate TLR8. These RNases act complementarily, with RNase T2 cleaving *before* uridines and RNase 2 *after*, leading to a synergistic release of uridine from RNA, which is essential for TLR8 activation. We also observed that serum RNases in cell culture media contributed to TLR8 activation. Indeed, using serum-free culture conditions, we found that endolysosomal RNase activity was required for TLR8 activation by all tested RNA agonists. Using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CLWM patients, we observed heavily impaired detection of bacterial and protozoal RNA. Moreover, our data show that immune sensing of live pathogens requires both RNases 2 and T2 for TLR8 activation. Altogether, our study provides a detailed mechanistic view into the endolysosomal RNA metabolism required for TLR8 activation, with consequences for TLR8 activation in different cell types and species.

RESULTS

RNase 2 and RNase T2 Drive Endolysosomal RNA Degradation in Monocytic Cells

To identify candidate RNases upstream of TLR8 activation, we quantified the expression of RNase T2 and RNase A superfamily members 1–8 in classical and non-classical monocytes and two monocytic cell lines with known TLR8 activity (Figure 1A), THP-1 and the B cell line BLAER1 (Rapino et al., 2013), which can be transdifferentiated into macrophage-like cells via tamoxifen-inducible C/EBP α expression and has been used as a model for monocytes (Gaidt et al., 2018). Though classical monocytes robustly express RNases T2, 2, and 6 (Schmiedel et al., 2018), neither transdifferentiated BLAER1 nor THP-1 cells had the same RNase expression pattern. THP-1 cells expressed high amounts of RNases 2 and T2 but not RNase 6, whereas BLAER1 expressed RNase T2, RNase 6, and very high amounts of RNase 1, as has been observed in monocyte-derived primary macrophages and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-differentiated THP-1 cells (Liu et al., 2018).

RNase T2 and the RNase A family members RNase 1, 2, and 6, have all been described as *potentially* lysosomal (Campomenosi et al., 2006; Lübke et al., 2009; Rouillard et al., 2016). However, because both classical monocytes and THP-1 cells are responsive to all of the TLR8 ligands reported to date (Coch et al., 2019; Forsbach et al., 2008), we focused our investigation on RNase T2 and RNase 2. To determine the precise subcellular location of these RNases, we transduced THP-1 cells with lentiviruses expressing RNase T2-HA or RNase 2-HA and performed confocal microscopy. RNase 2 and T2 colocalized with the early endosomal marker Rab5, late endosomal marker Rab7, and endolysosomal marker LAMP1 (Figures 1B–1D; Figures S1A and S1B), with calculated Manders M2 colocalization coefficients of 30%–45% (Figure 1Di–1Diii). Of note, the discrepancy between the number of RNase-positive LAMP1 vesicles (Figure 1Dii; Table S1) and LAMP1-positive RNase vesicles (Figure 1Diii; Table S2) can be explained by the additional presence of LAMP1 on primary lysosomal vesicles not yet fused with endosomes (Kinchen and Ravichandran, 2008). Of note, the endosomal localization of RNase T2 and RNase 2 fits with previous reports that TLR8 activation is primarily endosomal (Blasius and Beutler, 2010; Ishii et al., 2014) rather than lysosomal.

To investigate the pH optima and activity of both RNases, we purified recombinant RNase 2-FLAG and RNase T2-FLAG from 293FT cells (Figure S1C) and tested their activity on the widely used dual TLR7 and 8 ligand, 9.2s RNA (Hornung et al., 2005) (Table S4). Both RNases demonstrated pH optima compatible with the endolysosome: RNase T2 had an optimum of pH 4.5 (Figure 1E) as previously reported (Thorn et al., 2012), and RNase 2 had an optimal range of pH 5 to 5.5, one log unit below a previous report (Sorrentino and Glitz, 1991). Further experiments were performed at these experimentally determined pH optima. To sensitively quantify RNA degradation, we then used 5'-FAM-U₂₁-3'-TQ2 and 5'-FAM-9.2sRNA-3'-TQ2 quencher

(G) FAM signal (relative light units, RLU) over time of the indicated FAM-RNA-TQ2 constructs incubated with 1 ng/ μ L of RNase 2 or T2. Data shown is representative of four independent experiments.

(H–K) THP-1 cell lines transfected with 5'-FAM-U₂₁-3'-TQ2 RNA were visualized (H and I) and quantified (J and K) after 18 h. Exemplary pictures of FAM and Hoechst overlay. (J and K) Graphs depict counts of dequenched FAM^{high} structures normalized for cell count. Data shown are means of duplicates (J) and means of triplicates (K) \pm SEM. Data are representative of two independent experiments.

constructs (Figures 1F and 1G; Table S4). RNase T2 was found to rapidly degrade the dual TLR7 and 8 ligand U₂₁, whereas RNase 2 had much weaker activity on U₂₁. In contrast, 9.2s RNA was more avidly degraded by RNase 2 than RNase T2.

To determine their relative contribution *in cellulo*, we generated *RNASE2*^{-/-}, *RNASET2*^{-/-}, and *RNASE2*^{-/-}*RNASET2*^{-/-} THP-1 cells using CRISPR/Cas9 genome editing (Mali et al., 2013) (Figure S1D) and transfected them with 5'-FAM-U₂₁-3'-TQ2 (Figures 1H–1K). Wild-type (WT) cells displayed a punctate pattern of 6-fluorescein amidite (FAM)-positive, degraded RNA, which colocalized with LysoTracker (Figure S1E). In RNase-deficient THP-1, we observed that the de-quenched FAM signal (and thus RNase activity) was slightly lower in *RNASE2*^{-/-} cells, markedly lower in *RNASET2*^{-/-} cells, and absent in *RNASE2*^{-/-}*RNASET2*^{-/-} cells (Figures 1H and 1J), and nonetheless it could be restored by lentiviral rescue of RNase expression (Figures 1I and 1K). Of note, the more pronounced effect of RNase T2 deficiency at the cellular level for 5'-FAM-U₂₁-3'-TQ2 (Figures 1H–1K) corresponded to its relative activity in the cell-free assay (Figure 1G).

Altogether, our data demonstrate that RNases 2 and T2 effectively control endolysosomal RNA degradation in monocytic cells.

Endosomal Degradation Determines Activation of TLR8

We then investigated whether RNase T2 and RNase 2 are involved in TLR8 activation. We obtained PBMC from CLWM patients with a genetic deficiency in RNase T2 (Henneke et al., 2009) (Figures 2B and 2C), transfected them with established TLR7 and 8 ligands (Diebold et al., 2004; Forsbach et al., 2008; Heil et al., 2004; Hornung et al., 2005) (Figure 2A), and measured the release of the TLR8-specific cytokine IL-12p70 (Ablasser et al., 2009; Coch et al., 2019) and TNF. In CLWM-patient PBMC, we found a decreased response to all RNA-based TLR8 agonists, although the small-molecule R848 induced a response higher than that of the healthy controls (Figures 2B and 2C). Of note, RNase T2 deficiency differentially affected the TLR8 response to RNA agonists: the response to ssRNA40 was almost completely abrogated (3.3%), ORN002 and 9.2s RNA retained approximately 30%–40% of their signal for IL-12p70 (Figure 2B), and ORN002 retained 75% for TNF (Figure 2C).

No human hypomorphic mutations of *RNASE2* or *RNASE6* have been reported to date. Thus, to investigate the contribution of other RNases to TLR8 signaling, we used CRISPR/Cas9-generated RNase-deficient THP-1 cells. Because we observed that all phosphodiester (PDE)- but not PTO-linked ORNs were

able to induce a TLR7-dependent CXCL10 response in THP-1 cells (Figure 2A; Figure S2A), we performed all subsequent experiments on a TLR7-deficient background. Testing the same RNA ligands (Figure 2A) in *TLR7*^{-/-}, *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}, *TLR7*^{-/-}*RNASE2*^{-/-}, *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-}, and *TLR7*^{-/-}*TLR8*^{-/-} THP-1 cells revealed additional effects for RNase 2 on TLR8 activation (Figure 2D; Figure S2B): ORN002 was activated by either RNase 2 or T2, ssRNA40 required both RNases, and ORN006 could be activated by RNase T2 but not RNase 2, but the residual CXCL10 signal in *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-} disappeared in *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-}. Nonetheless, the activity of U₂₁ and 9.2s RNA was unaffected by lack of both RNase T2 and RNase 2, strongly suggesting the activity of other RNases on these ligands.

To confirm that CXCL10 reliably reflected TLR8 activation in THP-1 cells, we then performed 3' mRNA sequencing on *TLR7*^{-/-}*TLR8*^{-/-}, *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-}, and *TLR7*^{-/-} THP-1 cells after stimulation with either a small-molecule TLR8 agonist, TL8-506, or transfection of ssRNA40 (Figures 2E–2K). As expected, TL8-506 had virtually no effect on *TLR7*^{-/-}*TLR8*^{-/-} cells (Figure 2H) but could robustly activate *TLR7*^{-/-} (Figure 2J) and *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} cells (Figure 2I). In contrast, ssRNA40 PTO only induced a significant response in *TLR7*^{-/-} (Figure 2G), whereas *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} THP-1 demonstrated a global loss in TLR8-dependent gene induction (Figure 2F; Figure S2C). Clustering the 25 most up- and downregulated genes after ssRNA40 stimulation in *TLR7*^{-/-} cells revealed that ssRNA40 stimulation of *TLR7*^{-/-} clustered with TL8-506 stimulation in *TLR7*^{-/-} and *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} THP-1 cells, whereas ssRNA40 stimulation of *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} THP-1 clustered with the medium control (Figure 2K). Of note, CXCL10 demonstrated the highest fold change of all differentially regulated genes after ssRNA40 stimulation (Figure 2G; Figures S2D and S2E), confirming its sensitivity as a readout of TLR8 activation. We also investigated the effect of ssRNA40 and TL8-506 stimulation on transcripts per million (TPM) and fold change of other typical “TLR8-induced cytokines” (Figures S2D and S2E). Here, only CXCL8 and CXCL10 were robustly induced by ssRNA40 stimulation. Though increases in IL-6 and IL-12B (IL-12p40) transcripts could not be observed 8 h after ssRNA40 stimulation, IL-6, IL-12B, and TNF were strongly induced by TL8-506. Of note, the increased fold change observed for TL8-506 in *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} THP-1 mirrored R848 stimulation in CLWM patient PBMC

Figure 2. Endosomal Degradation Determines Activation of TLR8

(A) Oligoribonucleotides (ORNs) used in this study.

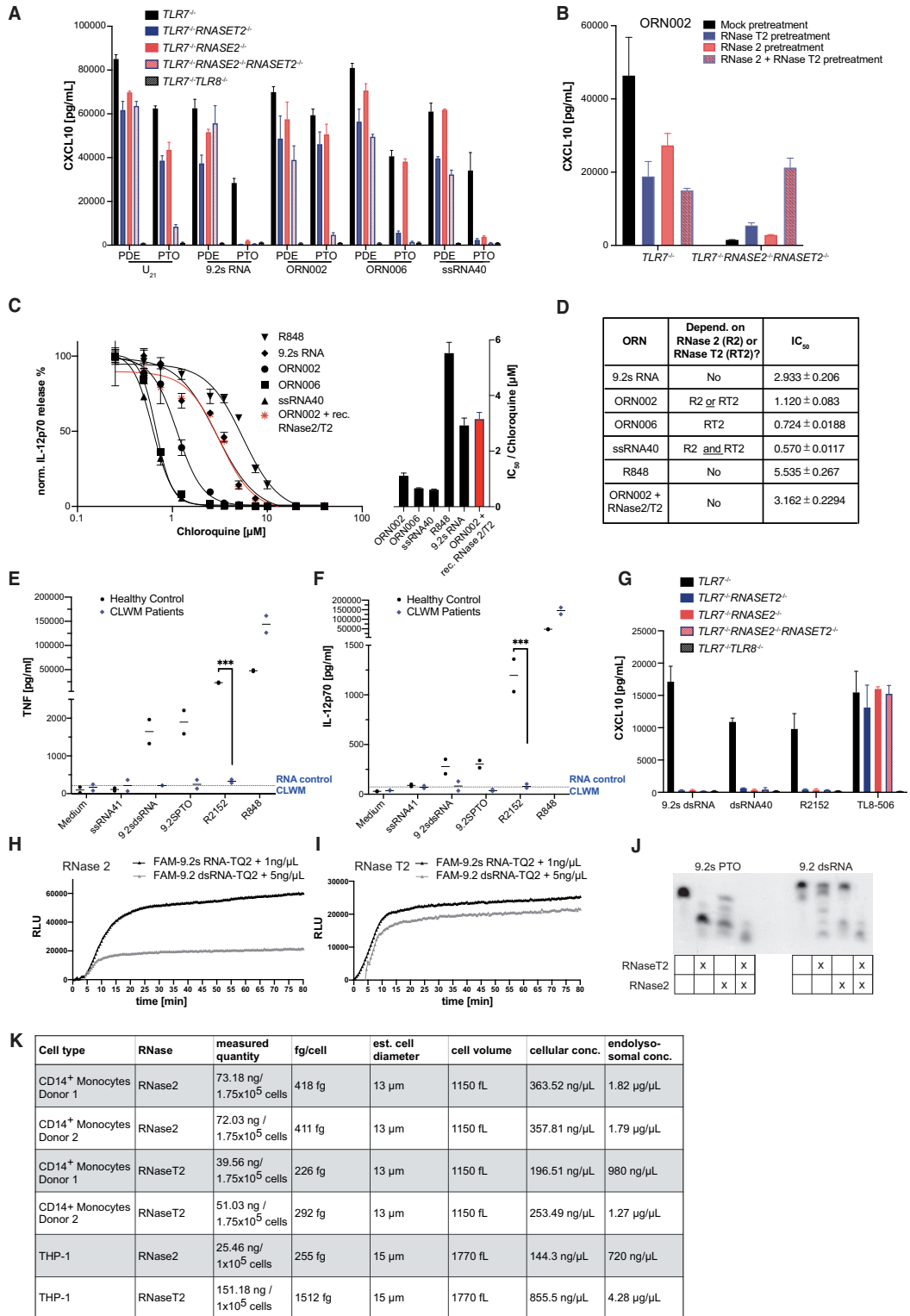
(B and C) IL-12p70 (B) and TNF (C) production by PBMC from CLWM patients and healthy controls stimulated with indicated ORNs or R848. The bar graphs depict the response of CLWM patients normalized to healthy controls (HC) ± SEM. Statistical significance was determined with ANOVA and Bonferroni correction (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

(D) THP-1 cells of the indicated genotype were stimulated with indicated ORN, R848, TL8-506, or RIG-I ligand.

(E–J) Volcano plots of the differential regulation relative to the medium control for 35,273 transcripts in 3' mRNA sequencing after ssRNA40 (E–G) and TL8-506 (H–J) stimulation of *TLR7*^{-/-}*TLR8*^{-/-} (E and H), *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} (F and I), and *TLR7*^{-/-} (G and J) THP-1 cells. Significantly regulated genes were defined as p_{adj} < 0.01 and |log₂(fold-change)| > 1.

(K) A heatmap of 50 differentially regulated genes after TL8-506 and ssRNA40 stimulation (biological triplicates) from the same experiment in (E–J). Data are vsd normalized and hierarchical clustering was performed with the Euclidean distance. Bold genes were used as readouts in subsequent experiments.

(L and M) RT-PCR data from a time-course experiment of THP-1 cells stimulated as indicated in (D). Cells were lysed for RNA purification at the indicated time points. Data presented are the Log₂ fold change (ΔΔCt) of the indicated gene relative to the housekeeping gene GAPDH and the medium control, displayed as the mean ± error (Gaussian error propagation).



(legend on next page)

(Figures 2B and 2C). Of note, IL-12A (IL-12p35), the other member of the IL-12p70 heterodimer, was not induced by either TL8-506 or ssRNA40, and IFNB1 was induced by ssRNA40 and TL8-506 but not statistically significant (Figures S2D and S2E). Thus, CXCL10 and CXCL8 were chosen for subsequent ELISA readouts of TLR8 activation.

To validate our results, we then selected four upregulated genes from the 3' mRNA sequencing, CCL4, CCL8, GMPR, and CXCL10, and performed real-time PCR on a time course from 4 to 16 h (Figures 2L and 2M; Figures S2F and S2G). All four genes were upregulated by TL8-506 in *TLR7*^{-/-} and *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} THP-1 cells, and by ssRNA40 in *TLR7*^{-/-} THP-1 cells. However, as expected, they were not induced by ssRNA40 in *TLR7*^{-/-}*RNASET2*^{-/-}*RNASE2*^{-/-} THP-1, even after 16 h. Although the time course revealed that RNA stimulation is delayed when compared to a small-molecule agonist, likely because of the time necessary for RNA uptake and processing, RNase-deficient cells did not show even a delayed response to ssRNA40.

The Cooperative Activity of RNase 2 and RNase T2 Are Required for Immune Sensing of Structured and PTO-Modified RNA

ORN002, ORN006, and ssRNA40 are PTO-linked to protect them from RNases, whereas U₂₁ and 9.2s have PDE backbones (Figure 2A). Thus, we compared PDE and PTO versions of all ligands. This revealed that all PDE ORNs stimulated TLR8 to some degree, even in the absence of both RNases, whereas all PTO-linked ORNs had a strict dependence on RNase 2 and/or T2 for TLR8 activation (Figure 3A). Moreover, their activity was restored by lentiviral rescue of RNase expression (Figure S3A) or by preincubation of ORN002 PTO with recombinant RNase (Figure 3B). Although we could also reproduce the recent finding by Greulich et al. (2019) that ssRNA40 PTO is unable to induce IL-6 in BLaER1 cells lacking RNase T2 (Figure S3B), all PDE ligands and U₂₁ PTO induced IL-6 release in *RNASET2*^{-/-} BLaER1 cells in our experiments, showing that RNase T2 is not required for all RNA ligands for TLR8 activation.

Next, we examined the degradation of PDE- and PTO-linked ligands (Figure S3C) and additional ssRNA PDE hetero- and homooligomers (Figure S3D) by recombinant RNases T2 and 2. Here, we found that both RNases were capable of degrading all PDE TLR8 agonists tested (Figure S3C). However, for PTO-linked RNA ligands, differences in substrate activity were apparent: RNase T2 had little activity on 9.2s RNA PTO, RNase 2 had no activity on ORN006 PTO, but both were capable of cleaving ORN002 PTO. These differences in cleavage reflected

the data obtained for PTO ORNs in RNase-deficient cells: both RNase T2 and 2 activated ORN002 PTO (Figures 2B, 2C, 3A, and 3B), whereas ORN006 PTO almost exclusively depended on RNase T2. The distinct activities of the RNases were also apparent in the degradation of homo- and heterooligomers (Figure S3D). RNase 2 had limited activity on homooligomers and the purine oligomer (GA)₁₀G, in line with previous reports (Boix et al., 2013; Sorrentino and Libonati, 1994). In contrast, RNase T2 could degrade U₂₁, A₂₁, GU₁₀G, CU₁₀C, UA₁₀U, and GA₁₀G, as previously shown (Campomenosi et al., 2006; Luhtala and Parker, 2010). Of note, neither RNase degraded 2'-O-methylated RNA (Figure S3C), fitting with both their activity as transferase-type RNases that cleave via 2'-3' cyclic intermediates (Deshpande and Shankar, 2002; MacIntosh, 2011) and with the numerous studies demonstrating that 2'-O-methylation can modulate or abrogate TLR8 activity (Freund et al., 2019a, 2019b; Jung et al., 2015; Rimbach et al., 2015).

Chloroquine, a well-known inhibitor of endolysosomal acidification and TLR signaling (Blasius and Beutler, 2010), was reported to inhibit activation of TLR8 by RNA ligands at lower concentrations than the small molecule agonist R848 (Kuznik et al., 2011), and we hypothesized that this may be due to RNase activity. Using chloroquine titration (250 nM–40 μM), we could reproduce the result of Kuznik et al. (2011) but also observed that the RNase dependence of a specific TLR8 ligand closely correlated with its ability to be inhibited by chloroquine (Figures 3C and 3D), i.e., 9.2 s RNA PDE did not require RNase 2 and T2 for TLR8 activation in THP-1 (Figure 3A) and had the highest IC₅₀ of all RNA ligands, whereas ssRNA40 PTO, which required both RNases, had the lowest. To control for the effect of chloroquine binding to nucleic acids, which could theoretically inhibit RNase activity or interaction with TLR8, we stimulated chloroquine-treated PBMC with ORN002 pretreated with RNase 2 and T2, as in Figure 3B. Pretreated ORN002 had an inhibition profile similar to 9.2s RNA (Figures 3C and 3D), clearly demonstrating that chloroquine not only inhibits TLR8 activation at high concentrations (>5 μM), as for R848, but also inhibits RNase-mediated degradation of RNA ligands into active products. Of note, clinically relevant concentrations of chloroquine are 0.5–1.5 μM (Haladyj et al., 2018; Rainsford et al., 2015), which, according to our data, would only affect the sensing of RNase-dependent RNA ligands.

As pathogenic RNA, such as bacterial rRNA, often has a complex secondary structure with dsRNA regions, we also tested the effect of RNase deficiency on the stimulatory potential of ssRNA40 and 9.2s RNA annealed to their respective antisense strand (then called dsRNA40 and 9.2 dsRNA), as well as R2152,

Figure 3. The Cooperative Activity of RNase 2 and RNase T2 Are Required for Functional Immune Sensing of Structured and PTO-Modified RNA

(A) The indicated THP-1 cell lines were stimulated with phosphorothioate (PTO) and phosphodiester (PDE) versions of the ORN in Figure 2A. (B–D) (B and C) ORN002 was preincubated with 1 ng/μL of the indicated RNase or 0.5 ng/μL of each RNase for 30 min. (B) THP-1 cells of the indicated genotype were stimulated with ORN002, pretreated with the indicated RNase. (C and D) PBMC were pretreated with 250 nM–40 μM chloroquine for 3 h and stimulated with indicated ORN or R848; dose responses (C, left) and IC₅₀ values (C, right graph, D) are shown. (E–I) 9.2s RNA, FAM-9.2s RNA-TQ2, and ssRNA40 were annealed to their antisense strands (9.2 dsRNA, dsRNA 40). (E and F) PBMC were stimulated with indicated ORN or R848. (G) THP-1 were transfected with dsORN or R2152 or treated with TL8-506. (H and I) FAM/Quencher-tagged 9.2s with (dsRNA) or without (ssRNA) antisense strand were incubated with RNase as indicated. Data are shown as RLU and are representative of three independent experiments. (J) TBE-urea PAGE of 9.2s PTO or 9.2 dsRNA incubated with 2 ng/μL RNase T2 or RNase 2 or 1 ng/μL each. (K) Endolysosomal concentrations of RNase 2 and RNase T2 in THP-1 and primary monocytes as calculated in Figures S3G–S3N. In (A–C) and (E–G) Data shown are mean ± SD and representative of two (E and F), three (B), or four (A, C, and G) experiments. Statistical significance was determined with ANOVA and Bonferroni correction (**p < 0.001).

a selective TLR8 ligand, which forms a hairpin structure (Figure S3E) (Hartmann et al., 2018). TNF and IL-12p70 release was absent from CLWM-patient PBMC stimulated with 9.2s dsRNA and R2152 (Figures 3E and 3F). Furthermore, in *TLR7*^{-/-} THP-1 cells, the activity of 9.2s dsRNA, dsRNA40, and R2152 all required the presence of both RNases 2 and T2 (Figure 3G; Figure S3F). Given that it has been reported that both RNases only cleave ssRNA (Lu et al., 2018; Luhtala and Parker, 2010), we tested their activity on dsRNA, (1) using RNase incubation followed by PAGE (Figure S3E) and (2) measuring RNase activity on 5'FAM-9.2s RNA-3'TQ2 annealed to its antisense strand (Figures 3H and 3I). We observed that each RNase was capable of degrading dsRNA to a degree, but a combination of both cooperatively cleaved dsRNA substrates (Figure 3J). To determine the relevance of this dsRNA degradation *in cellulo*, we then quantified RNase 2 and T2 protein in THP-1 and primary human monocytes via immunoblotting (Figures S3G–N). Assuming that endolysosomes comprise approximately 20% of cell volume (Dice, 2006), we calculated exceptionally high concentrations ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) of RNase T2 and RNase 2 in the endolysosome (Figure 3K), far beyond those used in our dsRNA assays. Of note, the estimated endolysosomal concentration of RNase T2 is 3 to 4 times higher in THP-1 cells than monocytes, in line with both our sequencing data (Figure 1A) and the higher TLR8 activity for dsRNA found in these cells.

RNase 2 and RNase T2 Synergistically Release Short Oligonucleotides and Uridine from RNAs

The crystal structures of TLR8 with ssRNA40 and ORN006 degradation products revealed two binding pockets: one for uridine and one for short di- or trinucleotides (UG, NUG, or UGN) (Tanji et al., 2015). However, it is clear that other RNA fragments lacking uridine or guanosine can also activate TLR8. Both ORN002 and U_{21} do not contain guanosine but are strong TLR8 ligands (Figure 2A). Furthermore, a follow-up paper (Shibata et al., 2016) showed that the ssRNA41 (Figure 2A) can activate TLR8 when supplemented with free uridine. Using ssRNA41-PTO, we reproduced these results and found that both RNases 2 and T2 are required to process ssRNA41 for TLR8 activation under uridine supplementation (Figure 4A). Thus, despite clearly requiring both free uridine and RNA processing, the sequence requirements for short ORN binding to the second pocket of TLR8 remain ill defined.

To characterize the specific contributions of RNases T2 and 2 to TLR8 activation, we incubated ORN002, ORN006, ssRNA40, 9.2s RNA, and R2152 (all fully PTO modified) with recombinant RNase 2, RNase T2, or both followed by mass spectrometry (Figure S4A). Of note, R2152 is ideal to study uridine release, because it has only one uridine (Figure 3F) and required both RNases for TLR8 activation (Figures 3D–3F).

After determining the cut sites in each ORN (Figures S4H–S4M), we examined the Base1 (B1)-Base2 (B2) cleavage patterns for each RNase with ssRNA40, 9.2s RNA, and R2152 (Figures 4B–4E). In line with Figures 1 and 2, an internal U-U could be cleaved by both RNases, as well as C-U and U-C (Figure 4B, highlights). However, all other dinucleotide combinations were cleaved differentially (i.e., cleaved by only one [or none] of the RNases) (Figure 4B). We then examined the B1 and B2 preferences of both RNases. RNase 2 had no activity at B1 purines, consistent with previous work on the RNase A superfamily

(Boix et al., 2013; Lu et al., 2018), but exhibited strong activity after B1 uridines. In contrast, for RNase T2, most publications have not reported a strong B1 or B2 preference (Luhtala and Parker, 2010), but our data demonstrated a strong preference for cleavage *before* a B2 uridine (Figure 4D). Thus, the two RNases act complementarily, with RNase T2 cleaving *before* (Figure 4D) and RNase 2 *after* uridines (Figure 4C), resulting in their synergistic release. Analysis of the precise cut sites within ssRNA40, 9.2s RNA, and R2152 also confirmed this finding. In combination, RNase 2 and RNase T2 increase the number of uridines released from ssRNA40 from two to four, from 9.2s RNA from three U to five U, and from R2152 from zero U to one U (Figures 4E–4G). Moreover, combined RNase2 and T2 activity also increased the number of UG motifs released from ssRNA40 and 9.2s RNA (Figures 4E and 4F) and was required for UG release from R2152 (Figure 4G). The repetitive nature of ORN002 and ORN006 hindered the precise interpretation of their degradation products. However, based on the release of di- and trinucleotides, RNases 2 and T2 both avidly cleaved ORN002 (Figure 4H), whereas RNase T2 cleaved ORN006 more effectively than RNase 2 (Figure 4I). These data agree with our observation that RNase T2 but not RNase 2 is critical for the TLR8 activity of ORN006, and nonetheless ORN002 can be activated by both RNases (Figure 3A).

To validate our mass spectrometry results, we supplemented RNASE2- and RNASET2-deficient THP-1 cells with uridine to see whether this restored TLR8 activity. Uridine supplementation could only rescue TLR8 activity in cells deficient in one but not both RNases, thus demonstrating that both uridine release and RNA ligand processing are required upstream of TLR8 activation.

Serum and Endosomal RNases Activate PDE TLR8 Agonists

Mass spectrometry detected degradation products in PTO-linked ORNs even without RNase treatment (Figures S4B–S4G). Because PDE-linked RNA is even more susceptible to degradation, we speculated that PDE ORN fragments may cause background activation of TLR8, independent of endosomal RNases. Titrating PDE-linked U_{21} , 9.2s RNA, and a random RNA sequence N_{21} , we saw no influence of RNase expression on TLR8 activation with 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of RNA. However, at 320 ng/mL, we observed a reduction in TLR8 activity in *TLR7*^{-/-}*RNASE2*^{-/-}*RNASET2*^{-/-} THP-1 cells. We then tested PDE versions of all the ligands in Figure 2A and N_{21} at this concentration and observed a substantial reduction in CXCL8 and CXCL10 release (Figures 5C and 5D) for all PDE ligands in *TLR7*^{-/-}*RNASE2*^{-/-}*RNASET2*^{-/-} THP-1 cells. However, for all ligands, except R2152, there was a residual signal. Moreover, in contrast to the PTO versions of the ligands, PDE-linked ssRNA40 and 9.2s RNA could be activated by RNase 2 or RNase T2, no longer requiring both RNases.

Because endosomal RNase activity could be rescued by pre-treatment of ORN002 with RNase 2 and/or RNase T2 (Figure 3B), we also hypothesized that RNases present in the serum of cell culture media may contribute to TLR8 activation *in vitro*. Of note, serum RNases are part of the RNase A superfamily, as is RNase 2, and both RNase 2 and RNase T2 have been reported to be secreted as well as lysosomal (Luhtala and Parker, 2010; Sorrentino, 2010). To test RNase activity in serum, we incubated PDE- and PTO-linked 9.2s RNA with RPMI medium and titrated

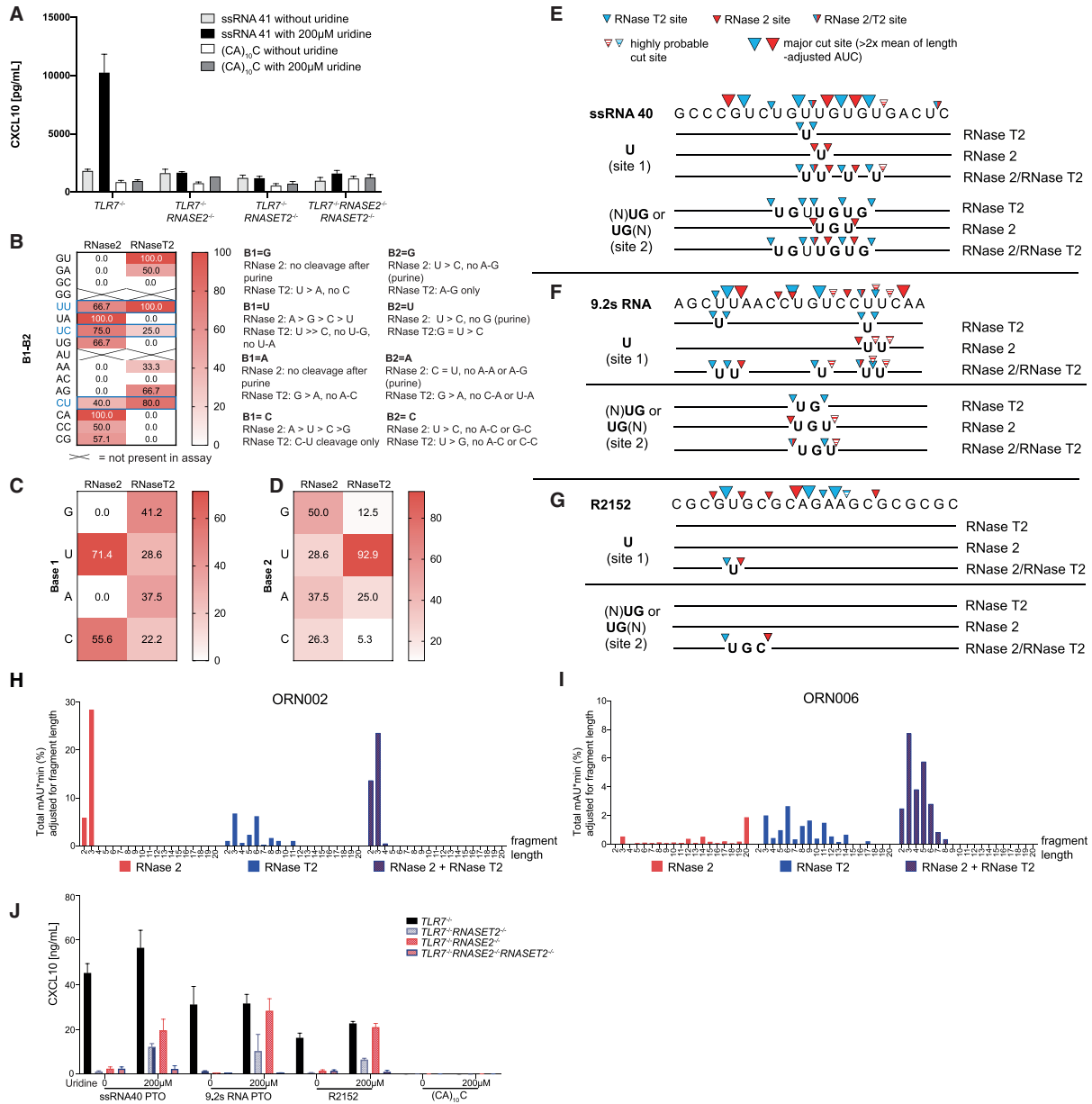


Figure 4. RNase 2 and RNase T2 Synergistically Release Oligoribonucleotides and Uridine from RNA Ligands of TLR8

(A) THP-1 cell lines preincubated with 200 μ M uridine were stimulated with indicated ORNs.

(B) Heatmap of possible dinucleotide combinations found in the ORN ssRNA40, 9.2s RNA, and R2152 and the percentage cut by RNase 2 and RNase T2 according to mass spectrometry. Dinucleotides not found within the three ORNs are noted with an "X," while those cut by both are highlighted in blue. Preferences for a particular B1 (5') or B2 (3') base are listed to the right of the table.

(C and D) Heatmaps showing the percentage cut of possible B1 (C) or B2 (D) combinations cut for a particular base within the three ORNs.

(E–G) For ssRNA40 (E), 9.2sRNA (F), and R2152(G), an overview of the cut sites found by HPLC-ESI-MS for RNase 2, RNase T2, and the combination of both RNases, and the resulting uridine and di- or trinucleotide (NUG or UGN) release. Shown are potentially released ligands for TLR8 binding sites 1 (Uridine) and 2 (UG or trinucleotides containing UG) resulting from RNase cut sites. Determination of cut sites is shown in Figure S4.

(H and I) The distribution frequency of fragment lengths (x axis) is shown in % length-adjusted area under the curve (AUC, y axis) for ORN002 (H) and ORN006 (I) after incubation with RNase 2, RNase T2, or double digestion.

(J) THP-1 cells were treated as in (A).

(A) and (J) Data are shown as the mean \pm SD and are representative of three independent experiments.

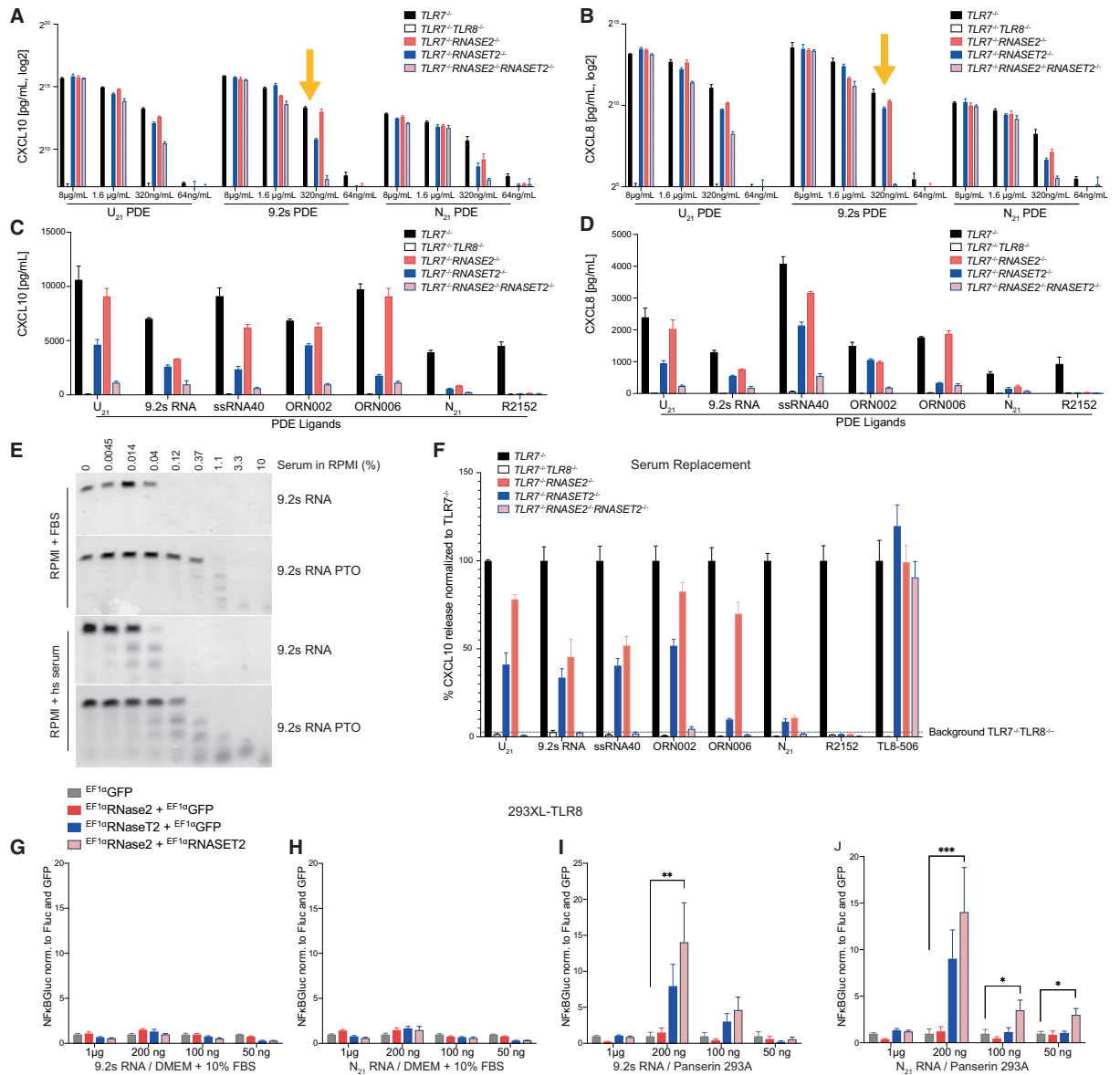


Figure 5. Serum and Endosomal RNases Activate PDE TLR8 Agonists

(A–D) THP-1 cell lines were cultivated in RPMI 10% FBS. (A and B) THP-1 were stimulated with ORNs at the indicated concentrations. The yellow arrows indicate the concentration used for subsequent experiments. (C and D) THP-1 were stimulated with 320 ng/mL of the indicated ORN. (E) PAGE of 9.2s RNA (PDE or PTO) incubated in serially diluted RPMI with 10% FBS or RPMI with 10% human serum (hs serum). (F) THP-1 cells cultivated in RPMI/1x HL-1 serum replacement were stimulated with 320 ng/mL of the indicated ORNs. CXCL10 release is shown normalized to TLR7^{-/-} THP-1 for all genotypes. (G–J) NF-κB Luciferase assay of 293XL-TLR8 cells stably transduced with lentiviral vectors expressing RNase 2, T2, or EGFP, cultured with 10% FBS (G and H) or Panserin 293A (I and J), stimulated with 9.2s RNA (G and I) or N₂₁ RNA (H and J). Induction shown is normalized to EGFP-expressing cell line. Data are depicted as the means of duplicates plus SEM. Results are representative of three independent experiments. (A–D) and (F) Data shown are the mean ± SD and representative of three independent experiments. Statistical significance was determined with ANOVA and Bonferroni correction (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

in fetal bovine serum (FBS) or human serum (hs serum) (Figure 5E). For both types of serum, we observed strong RNase activity: 9.2s RNA PDE was degraded by just 0.12% FBS after 1 h,

and 9.2s RNA PTO was degraded by 1.1% FBS. Human serum had even more RNase activity, with noticeable degradation at 0.04% hs serum for PDE RNA (Figure 5E).

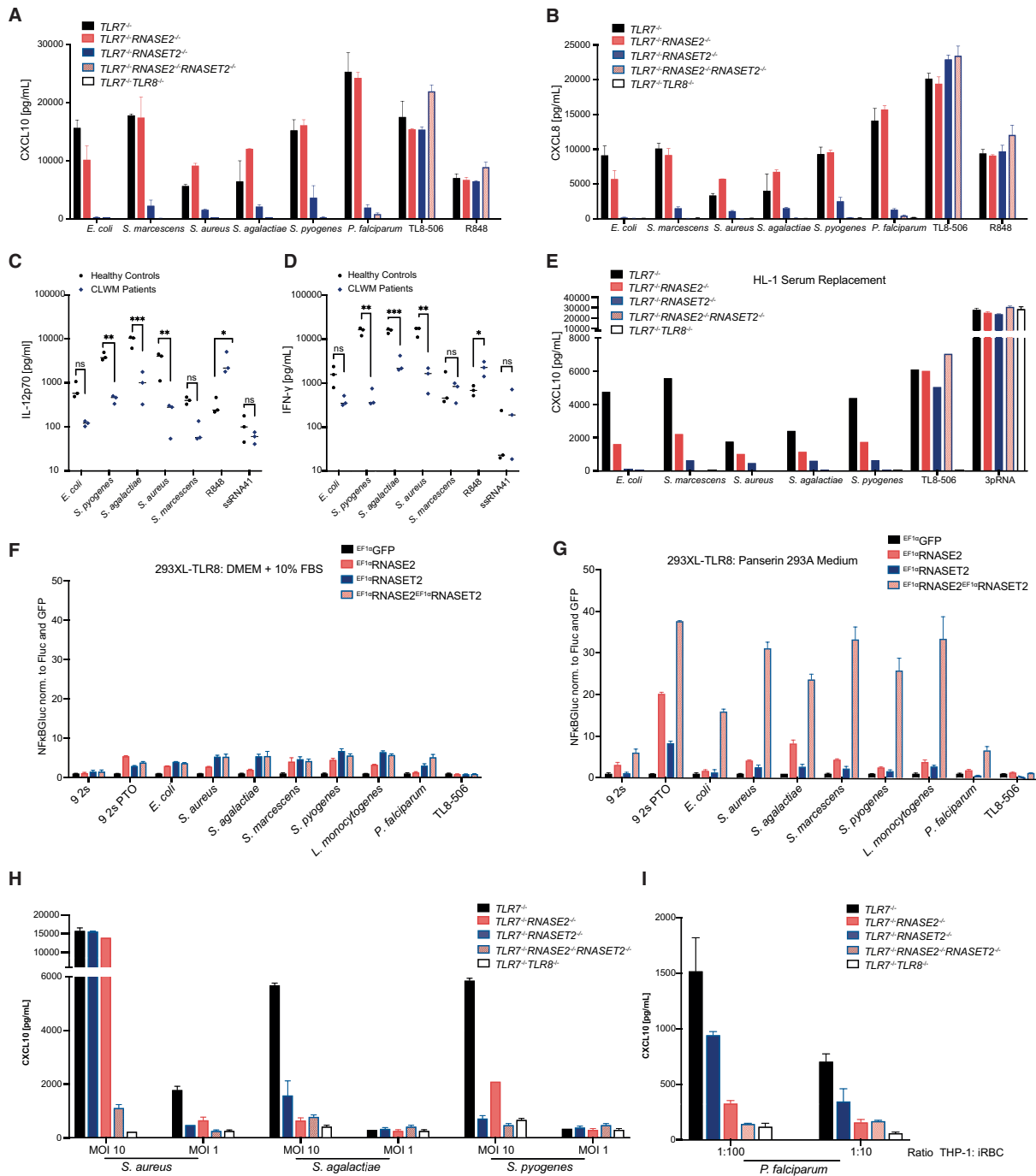


Figure 6. RNase 2 and RNase T2 Govern the Sensing of Bacterial and Protozoan RNA

(A–E) CXCL10 (A and E), CXCL8(B), IL-12p70 (C), or IFN γ (D) ELISA. In (A–D), PMBC and THP-1 were cultivated in RPMI/10% FBS and in (E) with HL-1 serum replacement. (A and B) THP-1 cells of the indicated genotype were treated with TLR4 inhibitor CLI-095 and then stimulated with RNA from bacterial species or *P. falciparum*. (C and D) PMBC from CLWM patients and healthy controls were stimulated ORNs or R848. (E) THP-1 cells were cultivated in RPMI with HL-1 and stimulated as in (A and B). Data are presented as the mean \pm SD and are representative of three independent experiments. Statistical significance was determined with ANOVA and Bonferroni correction (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

(legend continued on next page)

To investigate TLR8 activity independent of serum RNases, we cultured THP-1 cells in RPMI with an RNase-free HL-1 serum replacement (Figure S5A). After adaptation of the cells (3 weeks), stimulation with PDE ligands at 320 ng/mL no longer produced a CXCL10 (Figure 5F; Figure S5B) or CXCL8 (Figures S5C and S5D) signal above background in *TLR7^{-/-}RNASE2^{-/-}RNASET2^{-/-}* THP-1 cells.

In addition to THP-1 and BLaER1, many studies on TLR8 activation use a 293XL reporter line transgenic for TLR8 (Invivogen) that is combined with diverse reporter constructs (Coch et al., 2019; Kuznik et al., 2011; Lu et al., 2012). Although this cell line responds strongly to small molecule ligands, the response to RNA-based TLR8 agonists is weaker. Though 293XL cells do express RNase T2—albeit less than THP-1 cells, transdifferentiated BLaER1 cells, and human monocytes (Sup. Figure 5e)—as non-myeloid cells, they do not express RNase 2. Thus, we considered that serum RNases may also contribute to the activation of TLR8 in 293XL. Thus, we transduced 293XL cells with lentiviruses expressing RNase T2 and/or RNase 2 and cultivated them in DMEM with 10% FBS or Panserin 293A, a serum-free medium with greatly reduced RNase activity (Figure S5A). Indeed, in the cells grown in Panserin 293A (Figures 5I and 5J) but not FBS (Figures 5G and 5H), 9.2s RNA PDE and N₂₁ PDE reported the highest TLR8 activity under combined RNase T2 and RNase 2 lentiviral expression (Figures 5I and 5J). Thus, lentiviral expression of both RNases plus serum-free culture conditions render 293XL-TLR8 cells a suitable model for testing the activity of TLR8 ligands.

RNase 2 and RNase T2 Govern the Sensing of Bacterial and Protozoan RNA

Having characterized the role of RNase 2 and RNase T2 in the sensing of synthetic TLR8 ligands, we then studied their impact on TLR8 activation by pathogens and pathogen-derived RNA. Using RNA purified from gram-negative (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*) and gram-positive (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*) bacteria and the protozoan parasite *P. falciparum*, we observed that THP-1 cells and BLaER1 cells deficient in RNase T2 had a profound defect in the sensing of all pathogen RNA tested (Figures 6A and 6B; Figures S6A), which could also be rescued by lentiviral expression of RNase T2 (Figure S6B). Although RNase 2 deficiency alone had little effect, RNase 2 deficiency on an RNase T2-deficient background abrogated the residual signal (Figures 6A and 6B).

We then tested the effect of RNase T2 deficiency in human primary cells using PBMC from CLWM patients. Like RNase T2-deficient cell lines, CLWM-patient PBMC showed a strongly diminished TLR8 response to bacterial RNA (Figures 6C and 6D, note the log₁₀ scale), with a 10- to 100-fold decrease in the induction of IL-12p70 and downstream release of IFN- γ (Figures 6C and 6D). As observed above in Figures 2B and 2C, the response of CLWM-patient PBMC to the small-molecule ligand R848 was substantially increased, demonstrating that the TLR8 pathway itself is still functional.

Because experiments with PBMC could not be performed under serum-free conditions (data not shown), we instead used THP-1 cells adapted to serum-free medium. Here, RNase 2-deficiency also decreased TLR8 activation by bacterial RNA (Figure 6E; Figure S6C). Moreover, though 293XL-TLR8 cells cultured in 10% FBS and transduced with lentiviruses expressing RNase 2 and RNase T2 exhibited a several-fold increase of the signal to background when stimulated with bacterial and protozoan RNA (nuclear factor [NF]-KB luciferase reporter to quantify TLR8 activation) (Figure 6F; Figure S6D), the contribution of RNase 2 and combined RNase 2 and RNase T2 activity became even clearer if cells were cultivated in RNase-low (Figure S5A) Panserin 293A medium (Figure 6G).

Although RNA ligands of TLR8 are undoubtedly exposed to serum or tissue RNases if they are in the blood or extracellular space, RNA within live bacteria and *P. falciparum*-infected red blood cells (iRBC) are protected until lysis of the pathogen in the endolysosome. Thus, we then tested how both RNases influence the sensing of live pathogens, as opposed to purified RNA. Incubation with live bacteria and iRBC activated a TLR8-dependent response in THP-1 (Figures 6H and 6I) as previously reported (Eigenbrod et al., 2015; Coch et al., 2019). However, both live bacteria (Figure 6H) and iRBC (Figure 6I) required the activity of both RNase 2 and RNase T2 for CXCL10 induction in THP-1 cells, despite cultivation in 10% FBS. Altogether, our data demonstrate that the cooperative activity of RNase 2 and RNase T2 is critical for the sensing of bacteria and *P. falciparum* via TLR8, which is in turn critical for host defense.

DISCUSSION

Due to important differences in its role in humans and mice, TLR8 has only recently become widely researched (Alexopoulou et al., 2012; Cervantes et al., 2012), aided largely by CRISPR/Cas9 genome editing in human cell lines. Our study provides genetic proof for the synergistic role of RNase 2 and RNase T2 in degrading RNA substrates to license sensing by the endosomal PRR TLR8.

Since the initial submission of our study, another group has published that RNase T2 is essential for TLR8 activity (Greulich et al., 2019). Although the two studies concur that RNase T2 makes a critical contribution to TLR8 sensing, there are key differences. One central statement of Greulich et al. (2019) is that RNase T2 cleaves more or less exclusively G-U and A-U dinucleotides. However, we observed strong activity not only for G-U and A-U but for all B2 uridines, including U-U and C-U, not only by mass spectrometry but also by PAGE and intracellular assays using U₂₁. RNase T2 activity on polyU has also been well described in the literature (Campomenosi et al., 2006; Uchida and Egami, 1971). Moreover, it should be noted that dinucleotides flanked by polyA, as used in Greulich et al. (2019), may pose limitations on the generalization of the conclusions drawn from their study. In contrast, mixed sequence ORN, including the comparison of a several sequences, as in our

(F and G) NF- κ B Luciferase assay of 293XL-TLR8 cells stably transduced with lentiviral vectors expressing RNase 2, T2 or EGFP, cultured with 10% FBS (F) or in Panserin 293A (G), stimulated with ORN and TL8-506 as indicated. y axis is matched to (G) for comparison; for magnification, see Figure S6D. Induction is shown normalized to EGFP-expressing cell line. Data shown are the mean \pm SEM and are representative of three independent experiments.

(H and I) THP-1 cultivated in RPMI/10%FBS were treated with CLI-095 and then incubated with bacteria (H) or *P. falciparum*-infected red blood cells (iRBC, I) at the multiplicity of infection (MOI) indicated. Data are presented as the mean \pm SD and are representative of two (I) or four (H) independent experiments.

study, provides information beyond the core sequence tested by Greulich et al. (2019). For example, though we found that RNase 2 could digest U-G heterooligomers, which was also observed by others (Boix et al., 2013), the same group (Boix and colleagues) has recently reported that RNase 2 is capable of cleaving a U-A dinucleotide but not U-G (Prats-Ejarque et al., 2019). These findings demonstrate important differences in dinucleotide and ORN degradation. Moreover, they suggest that, though RNase 2 can release a U in front of a G from a longer ORN, it is unable to “destroy” an already released U-G dinucleotide potentially destined for the second TLR8 binding pocket. This property would make RNase 2 ideal for the processing of TLR8 agonists containing U-G motifs and could explain the weaker stimulation observed for U-A based ligands.

Another difference is that Greulich et al. (2019) primarily use the PTO-linked ligand ssRNA40 in transdifferentiated BLaER1 but not other well-established ligands, such as ORN002, polyU, and 9.2s RNA. In our experiments with BLaER1, we reproduced the RNase T2 phenotype that they observed for PTO-linked ssRNA40. However, the ligands that stimulated independently of RNase T2 in THP-1 and CLWM-patient PBMC were also RNase T2-independent in BLaER1. Moreover, in contrast to Greulich et al. (2019), we demonstrated that serum RNases in cell-culture media as well as endolysosomal RNase 2 contributed to the sensing of PDE-linked ssRNA40 in RNaseT2-deficient THP-1 cells. Moreover, though we agree that PTO-linked ssRNA40 requires RNase T2 to activate TLR8, it is not sufficient. Our data clearly demonstrate that ssRNA40 PTO also requires RNase 2 for activation in THP-1. However, in BLaER1, RNase 1 and RNase 6 may contribute this additional RNase activity, given that both are highly expressed in this specific cell model.

Although serum RNases contribute to the activation of PDE-linked TLR8 ligands *in vitro* (Figure 5), they are unlikely to do so *in vivo*. In blood, free RNA is usually destroyed before it can reach TLR8 in the endosome of myeloid cells, and thus reaches TLR8 only if it is somehow protected. Besides the artificial protection afforded by PTO, RNA is also “protected” within a live pathogen and first released upon lysis in the endolysosome. In this physiologically relevant situation, TLR8 sensing depended on both RNase 2 and T2 activity. If one regards pathogen RNA as a random sequence (similar to N_{21}) with complex secondary structures (similar to dsRNA or R2152), it seems logical that both RNases are required to release active TLR8 agonists. This differs from many synthetic TLR8 agonists, which were not developed to be “natural” but rather to robustly activate TLR8. Accordingly, it is not surprising that many established PDE-linked agonists can be activated by only one RNase, whereas N_{21} requires both.

Understanding the roles of these RNases gives insight into TLR8 activation. Although their overexpression allows for the improvement of TLR8 activation in conventional TLR8 reporter lines, inhibition of RNases T2 and 2 is also linked to the decreased inflammatory response seen with chloroquine treatment at clinically relevant concentrations. Moreover, the lack RNase 2 and RNase T2 activity on 2'-O-methylated RNA provides a vantage point for understanding how this modification silences immune recognition of pathogenic and self RNA.

Despite their complementarity, RNase 2 and RNase T2 have distinct evolutionary roles. Though the RNase T2 family is evolutionarily ancient and conserved, the RNase A superfamily is

vertebrate specific (Schwartz et al., 2018) and has been subject to strong evolutionary pressure (Rosenberg et al., 1995). Owing to the known association of these genes with immune activity (Lu et al., 2018; Rosenberg, 2008), it is tempting to speculate that this pressure stems from the evolution of PRRs in vertebrates. In fact, a recent review has even hypothesized a connection between RNase 2 and TLR7 activation (Lu et al., 2018). In this context, it is important to note that for animal models of TLR8 activation, it will be necessary to examine which RNases are required for ligand activation and which might assume the role of human RNase 2. Furthermore, there are also differences in the RNase expression patterns between different TLR8-expressing cell types in humans, and determining these may help explain differences in the activity of synthetic and natural TLR8 ligands in different human cell subsets and individuals.

Although RNase 2 and RNase T2 have long been thought to have immunomodulatory activities, it has been assumed that this activity was linked to their ability to degrade foreign RNA and act as alarmins (Schwartz et al., 2018) rather than the preparation of specific RNA ligands for PRR recognition and activation. Indeed, the clinical presentation of RNase T2-hypomorphic patients is likely a result of an overflow of RNA species acting as ligands for other RNA receptor(s) rather than reduced TLR8 activity. Here, there are important parallels to the lysosomal nuclease DNase II, which can both prevent cGAS/STING activation (Ahn et al., 2012; Rodero et al., 2017; Yoshida et al., 2005) and release TLR9 ligands from synthetic or genomic DNA (Chan et al., 2015). Thus, our study provides another example of how nucleases can balance seemingly contradictory pro- and anti-inflammatory functions.

Altogether, the activities of RNase 2 and RNase T2 act as a rheostat for TLR8 activity. Further studies will allow us to determine the precise contribution of these RNases to TLR8 activity in different cell types and immunological contexts with potential for the creation of novel specific ligands and targeted immunomodulatory therapies.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Primary cells
 - Cell lines
 - CRISPR-Cas9 genome edited cell lines
- METHOD DETAILS
 - Plasmids
 - Lentiviral overexpression
 - Purification of RNase T2 and RNase 2 protein
 - Stimulation and treatment of cells with RNA
 - Luciferase assay
 - Cytokine Detection
 - Stimulation with live pathogens and purification of pathogen RNA
 - RNA degradation assay using fluorescence
 - In-cell RNA degradation assay, High content reader
 - In-cell RNA degradation assay, confocal microscopy

- Immunofluorescence
- RNA degradation / PAGE
- Mass Spectrometry of RNA degradation products
- RT-PCR
- 3' mRNA Sequencing
- Immunoblot and quantification of endogenous RNases
- Oligonucleotides
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
 - Analysis of stimulation experiments
 - Image Analysis
 - RNA Expression analysis
- **DATA AND CODE AVAILABILITY**

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.009>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Core Facilities of the Medical Faculty, Microscopy, NGS, and Flow Cytometry for their support of our work. We thank Meghan Campbell for her critical reading of the manuscript. We thank Waldemar Kolanus, Jerome Mertens, Sven Burgdorf, and Eicke Latz for lending us imaging antibodies on exceptionally short notice. We thank the CLWM patients and their families for their extraordinary willingness to assist with our research. This study was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy-EXC2151-390873048 of which A.H., E.B., G.H., and M.S. are members. It was also supported by other grants of the DFG, including TRR237 (K.A., T.M.S.-G., E.B., G.H., M.N., and M.S.), SFB670 (E.B., W.B., G.H., and M.S.), SCHL1930/1-1 (M.S.), GA 354/14-1 (J.G.), and Bo&MeRanG GRK 2168 (G.H., E.B., and M.S.). E.B., M.N., T.O., and T.Z. received financial support from BONFOR (Uni Bonn). T.O. also received support from BonnNI (Uni Bonn). This work is part of the thesis of T.O. at the University of Bonn.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.O., T.Z., K.A., S. Schmitz, K.B., S. Salgert, S.M., R.L., J.W., T.G., S.B., L.S., C.C., M.N., and E.B. performed the experiments. T.M.S.-G. analyzed sequencing data. T.O., T.Z., T.M.S.-G., M.H., M.P.H., I.R., A.H., W.B., J.G., M.S., G.H., and E.B. conceived experiments. M.P.H. and A.H. supervised experiments with *P. falciparum*-infected red blood cells. M.K., M.H., and J.G. supported experiments with patient material. T.Z., M.S., G.H., and E.B. wrote the manuscript. All authors revised the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

W.B. is an employee of IFM Therapeutics. The other authors declare no competing interests.

Received: July 15, 2019

Revised: January 24, 2020

Accepted: March 18, 2020

Published: April 14, 2020

REFERENCES

- Ablasser, A., Poeck, H., Anz, D., Berger, M., Schlee, M., Kim, S., Bourquin, C., Goutagny, N., Jiang, Z., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J. Immunol.* *182*, 6824–6833.
- Acquati, F., Mortara, L., De Vito, A., Baci, D., Albini, A., Cippitelli, M., Taramelli, R., and Noonan, D.M. (2019). Innate Immune Response Regulation by the Human *RNASET2* Tumor Suppressor Gene. *Front. Immunol.* *10*, 2587.
- Ahn, J., Gutman, D., Saijo, S., and Barber, G.N. (2012). STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *109*, 19386–19391.
- Alexopoulou, L., Desnues, B., and Demaria, O. (2012). [Toll-like receptor 8: the awkward TLR]. *Med. Sci. (Paris)* *28*, 96–102.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *31*, 166–169.
- Bergström, B., Aune, M.H., Awuh, J.A., Kojen, J.F., Blix, K.J., Ryan, L., Flo, T.H., Mollnes, T.E., Espevik, T., and Stenvik, J. (2015). TLR8 Senses *Staphylococcus aureus* RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN- β Production via a TAK1-IKK β -IRF5 Signaling Pathway. *J. Immunol.* *195*, 1100–1111.
- Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* *32*, 305–315.
- Boix, E., Blanco, J.A., Nogués, M.V., and Moussaoui, M. (2013). Nucleotide binding architecture for secreted cytotoxic endoribonucleases. *Biochimie* *95*, 1087–1097.
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 257–290.
- Campomenosi, P., Salis, S., Lindqvist, C., Mariani, D., Nordström, T., Acquati, F., and Taramelli, R. (2006). Characterization of RNASET2, the first human member of the Rh/T2/S family of glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* *449*, 17–26.
- Cervantes, J.L., Weinerman, B., Basole, C., and Salazar, J.C. (2012). TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cell. Mol. Immunol.* *9*, 434–438.
- Chan, M.P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G.N., and Miyake, K. (2015). DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* *6*, 5853.
- Coch, C., Hommergen, B., Zillinger, T., Daßler-Plenker, J., Putschli, B., Nastaly, M., Kümmerer, B.M., Scheunemann, J.F., Schumak, B., Specht, S., et al. (2019). Human TLR8 Senses RNA From *Plasmodium falciparum*-Infected Red Blood Cells Which Is Uniquely Required for the IFN- γ Response in NK Cells. *Front. Immunol.* *10*, 371.
- Deshpande, R.A., and Shankar, V. (2002). Ribonucleases from T2 family. *Crit. Rev. Microbiol.* *28*, 79–122.
- Dice, J.F. (2006). Biogenesis, Structure and Function of Lysosomes. In *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, R.A. Meyers, ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA). <https://doi.org/10.1002/3527600906.mcb.200300122>.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529–1531.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21.
- Eigenbrod, T., Pelka, K., Latz, E., Kreikemeyer, B., and Dalpke, A.H. (2015). TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*. *J. Immunol.* *195*, 1092–1099.
- Forsbach, A., Nemorin, J.-G., Montino, C., Müller, C., Samulowitz, U., Vicari, A.P., Jurk, M., Mutwiri, G.K., Krieg, A.M., Lipford, G.B., and Volmer, J. (2008). Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J. Immunol.* *180*, 3729–3738.
- Freund, I., Buhl, D.K., Boutin, S., Kotter, A., Pichot, F., Marchand, V., Vierbuchen, T., Heine, H., Motorin, Y., Helm, M., et al. (2019a). 2'-O-methylation within prokaryotic and eukaryotic tRNA inhibits innate immune activation by endosomal Toll-like receptors but does not affect recognition of whole organisms. *RNA* *25*, 869–880.
- Freund, I., Eigenbrod, T., Helm, M., and Dalpke, A.H. (2019b). RNA Modifications Modulate Activation of Innate Toll-Like Receptors. *Genes (Basel)* *10*, 92.
- Fujiwara, Y., Wada, K., and Kabuta, T. (2017). Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids-multiple autophagic pathways. *J. Biochem.* *161*, 145–154.

- Gaidt, M.M., Rapino, F., Graf, T., and Hornung, V. (2018). Modeling Primary Human Monocytes with the Trans-Differentiation Cell Line BLaER1. *Methods Mol. Biol.* 1714, 57–66.
- Greulich, W., Wagner, M., Gaidt, M.M., Stafford, C., Cheng, Y., Linder, A., Carell, T., and Hornung, V. (2019). TLR8 Is a Sensor of RNase T2 Degradation Products. *Cell* 179, 1264–1275.e13.
- Haładyj, E., Sikora, M., Felis-Giemza, A., and Olesińska, M. (2018). Antimalarials – are they effective and safe in rheumatic diseases? *Reumatologia* 56, 164–173.
- Hartmann, G., Barchet, W., Wimmenauer, V., 2018. TLR8 ligand and uses thereof. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, EP 3263707 A1, Divisional application: EP20170168762.
- Haud, N., Kara, F., Diekmann, S., Henneke, M., Willer, J.R., Hillwig, M.S., Gregg, R.G., Macintosh, G.C., Gärtner, J., Alia, A., and Hurlstone, A.F.L. (2011). rnas2 mutant zebrafish model familial cystic leukoencephalopathy and reveal a role for RNase T2 in degrading ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 1099–1103.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529.
- Henneke, M., Diekmann, S., Ohlenbusch, A., Kaiser, J., Engelbrecht, V., Kohlschütter, A., Krätzner, R., Madruga-Garrido, M., Mayer, M., Opitz, L., et al. (2009). RNASET2-deficient cystic leukoencephalopathy resembles congenital cytomegalovirus brain infection. *Nat. Genet.* 41, 773–775.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., et al. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 11, 263–270.
- Ishii, N., Funami, K., Tatematsu, M., Seya, T., and Matsumoto, M. (2014). Endosomal localization of TLR8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells. *J. Immunol.* 193, 5118–5128.
- Jung, S., von Thülen, T., Laukemper, V., Pigisch, S., Hangel, D., Wagner, H., Kaufmann, A., and Bauer, S. (2015). A single naturally occurring 2'-O-methylation converts a TLR7- and TLR8-activating RNA into a TLR8-specific ligand. *PLoS ONE* 10, e0120498.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* 3, 499.
- Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 781–795.
- Kuznik, A., Bencina, M., Svajger, U., Jeras, M., Rozman, B., and Jerala, R. (2011). Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J. Immunol.* 186, 4794–4804.
- Li, B., and Dewey, C.N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323.
- Liu, H., Lorenzini, P.A., Zhang, F., Xu, S., Wong, M.S.M., Zheng, J., and Roca, X. (2018). Alternative splicing analysis in human monocytes and macrophages reveals MBNL1 as major regulator. *Nucleic Acids Res.* 46, 6069–6086.
- Lu, H., Dietsch, G.N., Matthews, M.-A.H., Yang, Y., Ghanekar, S., Inokuma, M., Suni, M., Maino, V.C., Henderson, K.E., Howbert, J.J., et al. (2012). VTX-2337 is a novel TLR8 agonist that activates NK cells and augments ADCC. *Clin. Cancer Res.* 18, 499–509.
- Lu, L., Li, J., Moussaoui, M., and Boix, E. (2018). Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. *Front. Immunol.* 9, 1012.
- Lübke, T., Lobel, P., and Sleat, D.E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 625–635.
- Luhtala, N., and Parker, R. (2010). T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends Biochem. Sci.* 35, 253–259.
- MacIntosh, G.C. (2011). RNase T2 Family: Enzymatic Properties, Functional Diversity, and Evolution of Ancient Ribonucleases. In *Ribonucleases, Nucleic Acids and Molecular Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, A.W. Nicholson, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 89–114.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826.
- Prats-Ejarque, G., Lu, L., Salazar, V.A., Moussaoui, M., and Boix, E. (2019). Evolutionary Trends in RNA Base Selectivity Within the RNase A Superfamily. *Front. Pharmacol.* 10, 1170.
- Rainsford, K.D., Parke, A.L., Clifford-Rashotte, M., and Kean, W.F. (2015). Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* 23, 231–269.
- Rapino, F., Robles, E.F., Richter-Larrea, J.A., Kallin, E.M., Martínez-Climent, J.A., and Graf, T. (2013). C/EBP α induces highly efficient macrophage transdifferentiation of B lymphoma and leukemia cell lines and impairs their tumorigenicity. *Cell Rep.* 3, 1153–1163.
- Rimbach, K., Kaiser, S., Helm, M., Dalpke, A.H., and Eigenbrod, T. (2015). 2'-O-Methylation within Bacterial RNA Acts as Suppressor of TLR7/TLR8 Activation in Human Innate Immune Cells. *J. Innate Immun.* 7, 482–493.
- Rodero, M.P., Tesser, A., Bartok, E., Rice, G.I., Della Mina, E., Depp, M., Beitz, B., Bondet, V., Cagnard, N., Duffy, D., et al. (2017). Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nat. Commun.* 8, 2176.
- Rosenberg, H.F. (2008). RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1079–1087.
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., Tiffany, H.L., and Gonzalez, M. (1995). Rapid evolution of a unique family of primate ribonuclease genes. *Nat. Genet.* 10, 219–223.
- Rouillard, A.D., Gundersen, G.W., Fernandez, N.F., Wang, Z., Monteiro, C.D., McDermott, M.G., and Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)* 2016, baw100.
- Schlee, M., and Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol.* 16, 556–580.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., et al. (2009). Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31, 25–34.
- Schmiedel, B.J., Singh, D., Madrigal, A., Valdovino-Gonzalez, A.G., White, B.M., Zapardiel-Gonzalo, J., Ha, B., Altay, G., Greenbaum, J.A., McVicker, G., et al. (2018). Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression. *Cell* 175, 1701–1715.e16.
- Schwartz, L., Cohen, A., Thomas, J., and Spencer, J.D. (2018). The Immunomodulatory and Antimicrobial Properties of the Vertebrate Ribonuclease A Superfamily. *Vaccines (Basel)* 6, 76.
- Shibata, T., Ohto, U., Nomura, S., Kibata, K., Motoi, Y., Zhang, Y., Murakami, Y., Fukui, R., Ishimoto, T., Sano, S., et al. (2016). Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int. Immunol.* 28, 211–222.
- Sorrentino, S. (2010). The eight human “canonical” ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.* 584, 2194–2200.
- Sorrentino, S., and Giltz, D.G. (1991). Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). *FEBS Lett.* 288, 23–26.
- Sorrentino, S., and Libonati, M. (1994). Human pancreatic-type and non-pancreatic-type ribonucleases: a direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 340–348.
- Stauffer, W., Sheng, H., and Lim, H.N. (2018). EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms. *Sci. Rep.* 8, 15764.
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2015). Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 109–115.
- Thorn, A., Steinfeld, R., Ziegenbein, M., Grapp, M., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Sheldrick, G.M., Gärtner, J., and Krätzner, R. (2012). Structure and activity of the only human RNase T2. *Nucleic Acids Res.* 40, 8733–8742.
- Uchida, T., and Egami, F. (1971). 9 Microbial Ribonucleases with Special Reference to RNases T1, T2, N1, and U2. *Enzymes* 4, 205–250.
- Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., and Nagata, S. (2005). Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* 6, 49–56.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
EEA1 antibody (C45B10), rabbit	Cell Signaling Technology	Cat# 3288; RRID:AB_2096811
LAMP1 antibody (D2D11), rabbit	Cell Signaling Technology	Cat# 9091; RRID:AB_2687579
Rab5 antibody (C8B1), rabbit	Cell Signaling Technology	Cat# 3547; RRID:AB_2300649
Rab7 antibody (D95F2), rabbit	Cell Signaling Technology	Cat# 9367; RRID:AB_1904103
Anti-HA antibody (3F10), rat	Roche	Cat# 11867431001; RRID:AB_390919
donkey anti-rat Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21208; RRID:AB_2535794
donkey anti-rabbit Alexa 647	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-31573; RRID:AB_2536183
Anti-Flag M2 antibody, mouse, HRP-coupled	Sigma-Aldrich	Cat# A8592; RRID:AB_439702
RNaseT2 antibody, rabbit	Abcam	Cat# ab140191
RNase2 antibody, rabbit	Thermo Fisher Scientific	Cat# PA5-37305
beta-actin antibody	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-47778 HRP
goat-anti-rabbit HRP	Bio-Rad	Cat# 1706515; RRID:AB_261711
goat-anti-rabbit IRDye800CW	LI-COR Biosciences	Cat# 925-32211; RRID:AB_2651127
Bacterial and Virus Strains		
<i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific	DH10B (18297010)
<i>S. aureus</i>	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Germany	Seattle 1945 (DSM-1104)
<i>S. pyogenes</i>	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Germany	SF-130, T1 (DSM-20565)
<i>S. agalactiae</i>	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Germany	G19 (DSM-2134)
<i>L. monocytogenes</i>	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Germany	EGDe serovar 1/2a (ATCC BAA-679)
<i>S. marcescens</i>	Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig, Germany	Delft 137 (NCTC 1377)
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
recombinant RNaseT2-FlagHis	This Paper	N/A
recombinant RNase2-FlagHis	This Paper	N/A
FLAG peptide	Sigma-Aldrich	Cat# F3290
R848	Invivogen	Cat# tlr-r848
TL8-506	Invivogen	Cat# tlr-tl8506
poly-L-arginine, 5-15kDa	Sigma-Aldrich	Cat# P4463
CLI-095	Invivogen	Cat# tlr-cli95
LysoTracker Red DND-99	Thermo Fisher Scientific	Cat# L7528
Hoechst 34580	Sigma-Aldrich	Cat# 63493
Deposited Data		
RNA expression datasets of classical and non-classical monocytes	Schmiedel et al., 2018 https://dice-database.org	N/A
3' mRNA seq data of gene-edited THP-1	available upon request	N/A
Experimental Models: Cell Lines		
293FT cell line	Thermo Fisher Scientific	Cat# R70007
293XL-TLR8	Invivogen	Cat# 293xl-htlr8
THP-1	Clinics for Anesthesiology and Intensive Care, University of Bonn	ATCC Cat# TIB-202
BlaER1 cell line	Thomas Graf, Center for Genomic Regulation, Barcelona Rapino et al., 2013	N/A
gene-edited THP-1 and BlaER1 lines	This Paper	see Table S1

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models: Organisms/Strains		
<i>P. falciparum</i>	Achim Hoerauf, Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology, University of Bonn	strain 3D7
Oligonucleotides		
synthetic RNA oligonucleotides	Biomers.net, see Table S4 for sequences	see Table S4
synthetic DNA oligonucleotides	Integrated DNA Technologies, see Tables S2, S3, S6 for sequences	see Tables S2, S3, S6
Recombinant DNA		
pLenti6-EF1alpha-IRES-EGFP	Jonas Doerr, Institute of Reconstructive Neurobiology, University of Bonn	N/A
pEF-BOS	Eicke Latz, Institute of Innate Immunity, University of Bonn	N/A
pEF-BOS-RNase2-FlagHis	This Paper	N/A
pEF-BOS-RNaseT2-FlagHis	This Paper	N/A
pLenti6-EF1-alpha-RNaseT2-IRES-EGFP	This Paper	N/A
pLenti6-EF1-alpha-RNaseT2-IRES-mCherry	This Paper	N/A
pLenti6-EF1-alpha-RNase2-IRES-EGFP	This Paper	N/A
pLenti6-EF1-alpha-RNase2-IRES-mCherry	This Paper	N/A
pLenti6-EF1-alpha-RNase2-HA	This Paper	N/A
pLenti6-EF1-alpha-RNaseT2-HA	This Paper	N/A
pMD2.G	Addgene	RRID:Addgene_12259
D8.9 (pCMV-dR8.91)	Eicke Latz, Institute of Innate Immunity, University of Bonn	https://www.addgene.org/vector-database/2221/
Software and Algorithms		
PRISM 8	GraphPad Software	RRID:SCR_002798
Leica Application Suite X	Leica	RRID: SCR_013673
ImageJ	https://imagej.net/	RRID:SCR_003070
EzColocalization plugin for ImageJ	Stauffer et al., 2018 https://sites.imagej.net/EzColocalization/plugins/	N/A
Compass HyStar software package	Bruker	N/A
STAR	https://github.com/alexdobin/STAR	RRID:SCR_015899
HTseq	https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.9.1/	RRID:SCR_005514
RSEM	http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/	RRID:SCR_013027

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Eva Bartok (ebartok@uni-bonn.de). Materials will be made available via material transfer agreement (MTA).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Primary cells

Human PBMC and monocytes were isolated from buffy coats of healthy human donors or from fresh blood of healthy human donors and CLWM patients, respectively.

Cell lines

293XL-TLR8 cells were from Invivogen, Toulouse, France. BlaER1 cells were kindly provided by Thomas Graf, Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain. THP-1 cells were kindly provided by the Clinics for Anesthesiology, University of Bonn.

CRISPR-Cas9 genome edited cell lines

THP1 and BlaER1 cells were transiently electroporated with EF1alpha-Cas9-2A-EGFP(tdTomato for BlaER1)/U6-guideRNA expression plasmids targeting RNase T2 and RNase2, respectively (Neon Transfection System, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt,

Germany – 1250 V, 50 ms, 1 pulse). Cells were sorted for EGFP or tdTomato expression after 18 h and seeded as single-cell colonies via limited dilution. After expansion, RNase T2 and RNase 2 deficient clones were identified by Sanger sequencing. Genotypes are shown in [Table S1](#). TLR7 and TLR8-deficient THP1 cell lines have been described previously ([Coch et al., 2019](#)).

METHOD DETAILS

Plasmids

For mammalian overexpression and protein purification, the human RNase T2 CDS was cloned into pEF-BOS (kindly provided by Eicke Latz, Institute of Innate Immunity, University of Bonn) in frame with C-terminal FLAG and 6xHis tag via Sall/BamHI fusion. For RNase 2, XhoI/BamHI fusion was used instead of Sall/BamHI (primer sequences in [Table S2](#)).

For lentiviral overexpression, human RNase T2 and RNase 2 CDS were subcloned into 3rd generation lentivector pLenti6-EF1alpha-IRES-EGFP (a derivative of Invitrogen pLenti6, kindly provided by Jonas Doerr, Institute of Reconstructive Neurobiology, University of Bonn) or pLenti6-EF1alpha-IRES-mCherry via Sall/NotI fusion. For lentiviral overexpression of HA-tagged RNases, RNases were subcloned in pLenti6-EF1alpha-MCS-HA via XhoI/Sall and BamHI fusion in frame with C-terminal HA.

For CRISPR-Cas9-based editing of human RNase T2 and RNase 2, gRNAs ([Table S3](#)) were selected with the CRISPR design tool (Zhang Lab, MIT, crispr.mit.edu) and introduced into an EF1a-Cas9-U6-sgRNA expression plasmid via Gibson assembly.

Lentiviral overexpression

Lentiviral particles were generated as previously described (“Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors,” 2009). Briefly, 293FT cells were transfected with lentivector plasmid and packaging plasmids D8.9 and pMD2.G using calcium phosphate transfection to produce lentiviral vectors. Viral supernatants were concentrated by ultracentrifugation using a Beckman Coulter SW32-TI rotor at 21,000 rpm for 2 h. Virus pellets were resuspended in DMEM and added to human THP-1 and 293XL-TLR8 cells (Invivogen, Toulouse, France), respectively.

Purification of RNase T2 and RNase 2 protein

Human RNase T2 and RNase 2 constructs with a C-terminal FLAG sequence were introduced into DNase-II-deficient HEK293FT by calcium phosphate transfection. After 36 h, the cells were resuspended in native lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON X-100, and a protease inhibitor cocktail (cComplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)). Nuclei were removed by centrifugation, supernatant proteins were then subjected to affinity immunoprecipitation with Anti-FLAG M2 Agarose Beads (Sigma) and eluted with FLAG Peptide (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) according to the manufacturer’s instructions. RNase T2-FLAG and RNase 2-FLAG were quantified via SDS-PAGE and silver stain in reference to a BSA standard, and identity was confirmed by immunoblotting with Anti-FLAG M2 antibody.

Stimulation and treatment of cells with RNA

Cells were stimulated in duplicates with TLR ligands, oligonucleotides and pathogen-derived RNA as indicated. 100 ng/mL LPS, 1 µg/mL small molecules TLR 7 / TLR 8 ligands (R848 (InvivoGen), 120 ng/mL TL8-506 (InvivoGen)) and 200 µM uridine (1 h preincubation) were used if not stated differently. RIG-I agonist IVT4 (200 ng/mL, [Schlee et al., 2009](#)) was transfected with Lipofectamine 2000 (0.5 µl/mL, Thermo Fisher Scientific). TLR4-inhibitor CLI-095 (Invivogen) was added 1 h before stimulation at a final concentration of 1 µg/mL.

Synthetic RNA ligands (see [Table S4](#)) as well as bacterial RNA were complexed with polyL-Arginine of 5-15 kDa (pLArg, Sigma-Aldrich) as delivery agent (1.8 µg per µg RNA). For one 96-well, pLArg and RNA were added to 25 µL PBS and incubated for 10 min before being added to cells. If not indicated differently, a final concentration of 1.6 µg/mL RNA was added to human primary immune cells and 8 µg/mL RNA to THP-1 and transdifferentiated BLaER1 cells (5d, 100 nM 17-Estradiol, 10 ng/mL human IL-3 and M-CSF), all in RPMI1640 supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids (NEAA), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Penicillin/Streptomycin). For serum-free experiments, THP-1 cells were adapted to RPMI 1640-medium supplemented with 1x HL-1 FBS substitute (Lonza, Cologne, Germany), 1mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, Penicillin/Streptomycin over 5 passages, as recommended by the manufacturer. If not otherwise indicated, supernatants of stimulation experiments were collected after 16 h.

Luciferase assay

293XL-TLR8 cells (Invivogen) were cultivated in DMEM supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 1mM NEAA and Penicillin/Streptomycin. Cells were plated at 3×10^4 per 96-well and transfected with 5 ng pGI3-NFkB-Gluc, 10 ng pEF-BOS-FLuc and 85 ng pMax-MCS using TransIT-LT1 reagent (Mirus Bio, Madison WI, USA). After 12 h, cells were stimulated with RNAs and small molecules and after further 14 h cells were lysed and luciferase assay was performed using respective substrates Coelenterazine (PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Germany) and D-Luciferin (PerkinElmer, Rodgau, Germany). Gaussia luciferase reporter signal was normalized to Firefly luciferase reference signal for each well. For serum-free experiments, cells were adapted to Panserin 293A Medium (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) with Penicillin/Streptomycin over 5 passages, luciferase assay was then performed according to the same method.

Cytokine Detection

After supernatant collection 16 h after stimulation, cytokines were measured by ELISA (hsCXCL-10, hsIL12p70, hsIL-6, hsIL-8, hsTNF, hsIFN- γ ELISA sets by BD BioSciences, hsIFN- α ELISA by Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Stimulation with live pathogens and purification of pathogen RNA

P. falciparum-infected red blood cells (iRBC) were prepared as described previously (Coch et al., 2019) and directly added at the indicated ratios into the cell culture medium. For RNA isolation, iRBC suspension was mixed with Trizol LS (Thermo Fisher Scientific) in a 1:3 ratio (v:v) and extraction was performed as recommended by the manufacturer. Bacteria (see Table S5) were plated on agar plates containing LB broth for *E. coli*, Tryptic Soy broth for *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. marcescens* and Brain Heart Infusion broth for *L. monocytogenes* (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) overnight at 37°C. For a pre-culture, a single colony was picked and incubated in growth medium at 37°C overnight. Pre-culture medium was then diluted 1:100 in fresh growth medium. At an OD of 0.6, bacteria were collected by centrifugation. For direct stimulation with live bacteria, cells were washed three, resuspended in PBS and added to the cell culture medium at the indicated MOI. For RNA extraction, bacteria were resuspended in PBS containing lysozyme (5 μ g/mL for gram-negative and 50 μ g/mL for gram-positive bacteria) and incubated at 37°C for 1 h. Bacteria were then lysed in Trizol using MagNA Lyser Green Beads (Roche, Mannheim, Germany) on a Precellys homogenizer (VWR, Darmstadt, Germany) at 6500 rpm/2x30s. RNA was then extracted by standard Trizol method. Bacterial RNA was then further purified by Sephadex-G50 size exclusion (Mini Quick Spin RNA columns, Roche) to remove RNA degradation products, bacterial endotoxins and other contaminations.

RNA degradation assay using fluorescence

5 μ g/mL 5'-FAM fluorochrome / 3'-TQ2 quencher labeled RNA was diluted in RNase digestion buffer (50mM sodium acetate, 100mM NaCl, pH 4.5 (RNaseT2), 5.0 (RNase 2/T2), 5.5 (RNase2) in black 96-well plates. RNases (200ng/mL) were added at 4°C. The assay was then performed at 37°C on a Cytation 3 multimode reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) and FAM fluorescence (exc. 485 nm/ em. 528 nm) was recorded in 30 s intervals.

In-cell RNA degradation assay, High content reader

PMA-differentiated THP-1 cells were transfected with 8 μ g/mL of pArg-complexed 5'-FAM-3'-TQ2 labeled RNA Oligo / unlabeled oligo mix (1:4; 1.6 μ g/mL labeled, 6.4 μ g/mL non-labeled oligo). After 18 h, cells were washed with PBS and nuclei of live cells were counterstained with Hoechst 34580 (Thermo Scientific). Plates were imaged on Cytation 3 multimode reader using the microscopy module (4x objective) and DAPI (377/447 nm)/GFP(469/525) filters. De-quenched bright green objects (threshold for signal specificity was set to max fluorescence of cell-free pArg/RNA complexes) as well as nuclear counterstain were counted by cell object count function of Gen5 analysis software (Biotek). GFP count was normalized to DAPI count for each well. For high magnification pictures, 2x2 images taken with 40x objective were stitched with Gen5 software. Handling and imaging were performed with minimal light exposure to avoid non-specific de-quenching.

In-cell RNA degradation assay, confocal microscopy

PMA-differentiated adherent THP1 cells were transfected with 8 μ g/mL of pArg-complexed 5'-FAM-3' BHQ1 labeled RNA oligo/unlabeled oligo mix (1:10). BHQ1 was used instead of faintly red-fluorescent TQ2 to eliminate signal overlap with lysotracker. After 12 h, cells were washed with prewarmed medium and incubated with LysoTracker Red DND-99 (55 nM, Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 37°C, washed and stained with 0.5 μ g/mL Hoechst 34580 (Sigma-Aldrich) for another 30 min at 37°C. Cells were washed 3 times with PBS and imaged in phenol red free HEPES-buffered medium at 37°C. Z stack series were imaged on Leica SP8 LIGHTNING microscope in resonant scanner mode with HC PL APO CS2 63x/1.20 water immersion objective (Leica).

Immunofluorescence

PMA-differentiated THP-1 cells were plated on poly-L-ornithine/gelatin coated plates. Adherent cells were fixed with 4% PFA for 7 min at RT and permeabilized/blocked with PBS 2% Horse serum/1% BSA/0.05% Triton X-100 for 1 h, followed by immunostaining with primary antibodies in PBS/1%BSA/0.05%Triton X-100: HA-Tag (1:100) was stained for 1 h on ice, co-stainings for endolysosomal markers were done at 4°C overnight: EEA1 (1:200), Lamp1 (1:200), Rab5 (1:200) and Rab7 (D95F2, 1:200) antibodies were from Cell Signaling Technology (Leiden, Netherlands). Secondary antibody staining was performed at RT for 1 h (donkey anti-rat Alexa488 and donkey anti-rabbit Alexa647, both 1:2000), nuclei were counterstained with 1 μ g/mL DAPI for 20 min (Sigma-Aldrich). Z stack image series were acquired on a Leica SP8 LIGHTNING confocal microscope in LIGHTNING high resolution mode, with HC PL APO CS2 63x/1.20 water immersion objective (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

RNA degradation / PAGE

1 μ g RNA was incubated with RNase 2 and RNase T2 in 15 μ l 50 mM sodium acetate buffer / 100 mM NaCl at indicated pH (titrated optima for RNaseT2 pH4.5 and RNase2 pH5.5, double digest at pH 5.0) for 15 min at 37°. For medium and serum RNase test, 1 μ g RNA was digested with 10 μ l of different medium formulations at 37°C for 1 h, serial dilutions were prepared in RNase-free 20mM Tris-HCl pH7.5. Reactions were stopped by adding 100 mM Tris-HCl pH 7.5 and 2X Formamide RNA loading dye (Thermo Scientific),

followed by heating at 65°C for 5 min. Samples were separated by PAGE on 7M urea 1XTBE 18% Acrylamide (29:1) gels and stained with methylene blue.

Mass Spectrometry of RNA degradation products

11 µg of PTO-RNA oligo was digested with RNase T2, RNase2 or both (500 ng each) in 110 µl RNase digestion buffer (50mM sodium acetate, 100mM NaCl, pH 4.5 (RNaseT2), 5.0 (RNase 2/T2), 5.5 (RNase2) or left untreated in buffer (pH 5.5) for 30 min at 37°C. For R2152-PTO, digest and control incubation were increased to 4 h. Reaction was stopped by addition of 100 mM Tris-HCl pH7.5 and snap-freezing on dry ice. 1 µg was analyzed by TBE-page, the remaining sample was subjected to Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP HPLC) and electrospray-ionization mass spectrometry (at AxoLabs, Kulmbach, Germany):

For IP-RP HPLC separations, samples were analyzed on a Vanquish UHPLC system (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) using UV detection at 260 nm. Oligonucleotides were separated by methanol-gradient elution on an Acquity UPLC Oligonucleotide BEH C18 column (2.1 × 100 mm) with 1.7 µm particle-size (Waters; Milford, MA, USA). In the TEA/HFIP system, mobile phase A consisted of 100 mM HFIP and 16.3 mM TEA and mobile phase B consisted of 100 mM HFIP, 16.3 mM TEA and 25% methanol. The gradient starts at 0% and mobile phase B was increased to 80% in 32 min at a flow rate of 250 µL/min. Injection volume was 15 µL of a 2.8 µM digested RNA solution in 100 mM TEAA. Column temperature was set to 55°C.

For mass spectrometric analysis, a COMPACT time-of-flight (TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) interface (Bruker; Billerica, MA, USA) was used in line with the IP-RP HPLC system. The mass spectrometer was run in negative ion mode. The source parameters were set as follows: capillary voltage of 4,500 V, nebulizer of 1.8 bar, dry gas flow of 8.0 L/min at 240°C, and end plate offset voltage of 500 V. Masses were scanned from 350 to 1600 m/z, the quadrupole ion energy was set to 4.0 eV and the collision cell energy was at 8.0 eV. Data acquisition and analysis was performed using the Compass HyStar software package (Bruker; Billerica, MA, USA).

1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (eluent additive for LC-MS) and methanol (LC-MS grade) were purchased from Honeywell (Charlotte, NC, USA). Triethylamine (TEA) (BioUltra, GC grade) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Triethylammonium acetate (TEAA) (HPLC grade) was purchased from Biosolve (Valkenswaard, NL).

Deconvoluted masses and possible fragments were determined by AxoLabs. To deduce cut sites, PTO-RNA fragments bearing 3'-cyclic PTO ends identified by unambiguous mass allocation were mapped to respective position within oligo sequence. Highly plausible cut sites were deduced from positioning of ambiguous or repetitive fragments in relation to adjacent unambiguous fragments. Fragment quantity was approximated by normalizing relative HPLC signal (% area under curve (AUC), mAU*min) for fragment length. For multiple or ambiguous fragments within the same peak, AUC was divided by fragment number. Cut frequency was quantified by summation of corresponding fragment quantities (ambiguous fragment quantity was assumed as equally divided between possible allocations). Major cuts were defined by [sum of corresponding fragments]>2-fold mean of all fragments. A small amount of 2'3'-cyclic PTO bearing fragments was detected in untreated 9.2 s RNA but not other RNAs (all with B1 = C). Fragments with same ends detected in RNase digests of 9.2 s RNA were therefore only considered when their corresponding AUC was at least 2-fold higher. Aberrant synthesis byproducts (cyano-adducts, fragments with single PDE residues) and corresponding degradation products were excluded from analysis.

RT-PCR

1 × 10⁶ cells were lysed in 350 µL RLT-Buffer (QIAGEN), frozen at -80°C, thawed, supplemented with 1 volume 70% Ethanol and loaded onto a Zymo III column (Zymo). The column was then washed with RW1buffer (QIAGEN), RNA wash buffer (Zymo) and eluted with DEPC water. Samples were then subjected to DNase I digestion and reverse transcription with random hexamer primers and RevertAid Reverse Transcriptase (all from Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed using with 5x EvaGreen QPCR-Mix II (ROX) (Bio-Budget, Krefeld, Germany). Primers (Table S6) were validated with melting curve and agarose gel analysis and tested for efficiency using cDNA dilution.

3' mRNA Sequencing

THP-1 cells, undifferentiated and differentiated BLaER1 cells were lysed in RLT Buffer (3x10⁶/350µL) and total RNA was purified using the RNeasy RNA + mini kit (QIAGEN). Total RNA was used to generate stranded RNA sequencing libraries using the Encore Complete RNA-Seq library system of NuGEN. The libraries were sequenced on an Illumina HiSeq1500 device.

Immunoblot and quantification of endogenous RNases

Cells were resuspended in native lysis buffer supplemented with cOmplete Protease Inhibitor and incubated on ice for 30 min. Lysates were cleared by centrifugation (10,000 rcf, 5 min, 4°C). To deglycosylate proteins, cleared lysates and purified RNases were denatured and treated with PNGaseF (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Germany) according to manufacturer's recommendations. RNaseT2 and RNase2 were detected with primary antibodies ab140191 (Abcam, Berlin, Germany; 1:1000) and PA5-97305 (Thermo Fisher Scientific; 1:500), respectively. For standard immunoblot, secondary goat-anti-rabbit-HRP (Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Germany; 1:5000) and Pierce ECL Substrate (Thermo Scientific) were used, for quantitative immunoblot, secondary goat anti-rabbit IRDye800CW (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, Germany; 1:15,000) was used. Beta-actin (C4, Santa Cruz

Biotechnology, Heidelberg, Germany; 1:1000), Flag (M2, Sigma-Aldrich; 1:1000) and HA (26183, Thermo Fisher Scientific; 1:1000) were detected with HRP-coupled primary antibodies and ECL substrate. Blots were recorded on an Odyssey FC Dual imaging system (Li-Cor Biosciences).

Oligonucleotides

RNA oligonucleotides were ordered from Biomers, Ulm, Germany and from Integrated DNA Technologies (IDT), Leuven, Belgium. DNA oligonucleotides were ordered from Integrated DNA Technologies (IDT), Leuven, Belgium.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Analysis of stimulation experiments

Statistical analysis was performed using non-parametric tests in PRISM8 (Graphpad Software, San Diego, CA). Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare paired groups. In case of multiple comparisons, Friedman test was used and corrected according to Bonferroni. * indicates a p value < 0.05; ** < 0.01 and *** < 0.001. Dose-response curves were fitted using 4-variable, non-linear regression with PRISM8. Repetition and error bases are defined in the respective figure legends.

Image Analysis

Leica Application Suite X (LAS X) was used to export data and perform maximum intensity projection of Z stacks for presentation. Data were analyzed using ImageJ EzColocalization plugin (Stauffer et al., 2018). Otsu's method was used to identify cell areas and calculate Manders colocalization coefficients: M1 and M2 with Costes thresholding. Colocalization was calculated for every Z stack slice, mean and SD was calculated for every cell.

RNA Expression analysis

Sequencing reads were aligned to the human reference genome (Ensemble genome version 96) using STAR (Dobin et al., 2013). The transcripts were quantified using HTSeq (Anders et al., 2015). TPM (Transcripts Per Kilobase Million) values are calculated using RSEM (Li and Dewey, 2011). The datasets for classical monocytes and non-classical monocytes are from (Schmiedel et al., 2018). Clustering was performed according to the Euclidean distance metric and displayed as tightest cluster first.

DATA AND CODE AVAILABILITY

RNA-sequencing data generated in this paper is available upon request and will be made available at GEO.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Eva Bartok für die außergewöhnlich gute Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Du warst zu jeder Tages- und oft auch Nachtzeit erreichbar, standest mir mit Rat und, nicht nur gelegentlich, auch Tat zur Seite und hast mich, wo es Dir nur möglich war, gefördert. Eine solche Betreuung ist mit Sicherheit etwas ganz Besonderes.

Ein großer Dank gehört auch meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Martin Schlee, für die sehr gute Betreuung und die Überlassung des Themas sowie Herrn Professor Dr. med. Gunther Hartmann für die Bereitstellung der Infrastruktur, für sein Engagement hinsichtlich der verschiedenen Kooperationen, die ansonsten in dieser Form nicht möglich gewesen wären, sowie für die Ermöglichung und Förderung des gesamten Projektes.

Auch danke ich Herrn Dr. rer. nat. Thomas Zillinger für die viele Hilfe, die Ratschläge bei schwierigen Versuchen sowie für die massenspektrometrischen Analysen.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke auch den Promotionskollegien BONFOR und BonnNI (Else Kröner-Fresenius-Stiftung) für die großzügige Unterstützung meines Promotionsvorhabens.

Mein besonderes Dankeschön richte ich an Saskia Schmitz, die mir nicht nur mit vielen Anleitungen, Tipps und vielen Experimenten geholfen hat, sondern vor allem als gute Seele des Labors für eine sehr schöne Zeit gesorgt hat.

Dir, Sarah, danke ich für Deine immerwährende, bedingungslose Unterstützung und deinen stetigen Optimismus während der Laborarbeit sowie zu allen Zeiten.