

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Reprogrammierung von Mustererkennungsrezeptor-Signalwegen  
durch Konditionierung mit Lipopolysaccharid und poly(I:C):  
molekulare Mechanismen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Andreas Sailer

aus Garmisch-Partenkirchen

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Veit Hornung  
Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Christian Hotz  
Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2017

**Meinen Eltern in Dankbarkeit**



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Mustererkennungsrezeptoren .....	1
1.1.1	Toll- <i>like</i> -Rezeptoren.....	2
1.1.2	RIG-I- <i>like</i> -Rezeptoren.....	4
1.2	Signalwege von Toll- und RIG-I- <i>like</i> -Rezeptoren .....	5
1.2.1	MyD88-abhängiger Signalweg.....	6
1.2.2	TRIF-abhängiger Signalweg .....	6
1.2.3	MAVS-abhängiger Signalweg.....	7
1.3	Zusammenspiel bei der Mustererkennung .....	7
1.3.1	Begriffsdefinitionen.....	7
1.3.2	Beispiele für synergistische und antagonistische Interaktionen .....	8
1.4	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	10
1.5	Zielsetzung .....	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1	Material .....	12
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.2	Lösungen, Medien und Puffer .....	13
2.1.3	Immunstimulantien, Inhibitoren und Reagenziensätze.....	14
2.1.4	Antikörper.....	15
2.1.5	Geräte .....	16
2.1.6	Software.....	16
2.2	Tierversuche.....	16
2.3	Zellkultur.....	17
2.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	17
2.3.2	Herstellung einer Einzelzellsuspension von Knochenmarkszellen .....	17
2.3.3	Generierung von dendritischen Zellen .....	18
2.3.4	Kultivierung von J774-Zellen.....	18
2.3.5	Transfektion zur Stimulation intrazellulärer Rezeptoren .....	19
2.4	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	19
2.5	Proteinanalyse mittels <i>Western blot</i> .....	20
2.5.1	Proteinvorbereitung .....	20
2.5.2	Gelelektrophorese.....	20
2.5.3	Western Blot.....	21
2.5.4	Immundetektion einzelner Proteine.....	21
2.6	Statistische Analyse .....	21

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
3.1	Experimenteller Aufbau.....	22
3.2	Einheitliche Effekte durch Konditionierung mit poly(I:C)- und LPS <i>in vitro</i> .....	23
3.3	Abhängigkeiten der Reprogrammierungseffekte .....	25
3.3.1	Effekte in Zellen aus <i>in vivo</i> mit poly(I:C)-behandelten Wildtyp- und TRIF- <i>knockout</i> -Mäusen.....	25
3.3.2	Abhängigkeit der Effekte von TBK1/IKK $\epsilon$ <i>in vitro</i> .....	27
3.3.3	Bedeutung von Typ-I-Interferonen für die Vermittlung der poly(I:C)-Effekte. 29	
3.4	Modulation von Signalwegen auf Proteinebene.....	31
3.4.1	Aktivierungsstatus von MAPKs und NF $\kappa$ B .....	31
3.4.2	Expression von RIG-I- <i>like</i> -Rezeptoren .....	34
3.4.3	Aktivierungsstatus von TBK1/IKK $\epsilon$ und IRF3 .....	35
3.4.4	Übersicht über die Veränderungen auf Proteinebene .....	37
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>39</b>
4.1	Zusammenspiel von MyD88-ab- und unabhängigen Signalwegen.....	39
4.2	Endogene Interferone als Mediatoren .....	41
4.3	Molekulare Mechanismen der TLR-Sensitivierung.....	43
4.3.1	Rolle von MAPKs und NF $\kappa$ B.....	43
4.3.2	Kooperation auf Transkriptionsfaktorebene.....	44
4.4	Molekulare Mechanismen der RLR-Blockade.....	47
4.4.1	Beeinflussung auf Rezeptorebene .....	47
4.4.2	Veränderungen auf der Ebene von TBK1/IKK $\epsilon$ und IRF3 .....	48
4.4.2.1	Regulation durch postrtranslationale Modifikationen.....	48
4.4.2.2	Regulation durch direkte Proteininteraktion.....	49
4.4.3	Weitere Einflussfaktoren auf Transkriptionsfaktorebene.....	49
4.5	Klinische Relevanz.....	50
4.6	Ausblick .....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>

---

<b>9</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>71</b>
9.1	Originalarbeit .....	71
9.2	Poster.....	71
9.3	Vorträge.....	71
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>72</b>





# 1 Einleitung

## 1.1 Mustererkennungsrezeptoren

Im Laufe der Evolution haben höhere Lebewesen ein komplexes Immunsystem entwickelt, das die Verteidigung gegen verschiedenste Mikroorganismen erlaubt. Es lässt sich in zwei Subsysteme untergliedern: das angeborene und das adaptive (früher auch erworbene) Immunsystem. Während der angeborene Teil in einer ungezielten Sofortreaktion die potentiellen Krankheitserreger auszuschalten und damit ihre Verbreitung einzudämmen versucht, besteht die Funktion des adaptiven Immunsystems in der gezielten, dafür aber zeitlich verzögerten Abwehr von Pathogenen und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Die angeborene Immunantwort läuft grundsätzlich in drei Schritten ab: nach der Erkennung von Pathogenen durch verschiedene Immun- und Nicht-Immun-Zellen werden intrazellulär Signalwege aktiviert, an deren Ende die Auslösung potenter Effektormechanismen stehen (Nish und Medzhitov, 2011). Die Detektion mikrobieller Muster erfolgt durch eine Reihe von Keimbahn-kodierten Rezeptoren, die sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Diesen dienen entwicklungsgeschichtlich hoch konservierte Strukturen von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die deren erfolgreiches Überleben oft erst ermöglichen, als Erkennungsmoleküle (Janeway, 1989). Chemisch gesehen handelt es sich dabei sowohl um Oberflächenstrukturen wie mikrobielle Lipide, Proteine oder Polysaccharide als auch um intrazelluläre Bestandteile wie Nukleinsäuren (Kumar *et al.*, 2011; Takeuchi und Akira, 2010).

Die Mustererkennungsrezeptoren werden basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten in fünf Familien eingeteilt: *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs), *retinoic acid-inducible gene-I* (RIG-I)-*like-Rezeptoren* (RLRs), *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like-Rezeptoren* (NLRs), *C-type lectin-Rezeptoren* (CLRs) und zytosolische Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sensoren (Kawasaki *et al.*, 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur PAMPs sondern auch molekulare Strukturen, die bei der Zerstörung körpereigener Zellen frei werden (*damage-associated molecular patterns*), unter bestimmten Umständen von PRRs erkannt werden können (Tang *et al.*, 2012).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die für diese Promotionsarbeit relevanten Mustererkennungsrezeptoren mit ihren wichtigsten Liganden und den entsprechenden Adaptormolekülen, die im Folgenden näher beschrieben werden. Für eine umfassende

Auflistung sämtlicher Vertreter der verschiedenen PRR-Familien sei auf entsprechende Übersichtsarbeiten (Kumar *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2015; Takeuchi und Akira, 2010) verwiesen.

Familie	Rezeptor	Liganden	Adaptormolekül
<b>TLRs</b>	TLR4	LPS, F-Protein (RSV), Hüllprotein (MMTV)	MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF
	TLR3	dsRNA (poly(I:C))	TRIF
	TLR7/8	ssRNA (R848)	MyD88
	TLR9	CpG DNA*	MyD88
<b>RLRs</b>	RIG-I	kurze dsRNA, ssRNA	MAVS (STING)
	MDA5	lange dsRNA	MAVS
	LGP2	RNA	MAVS

**Tabelle 1: Wichtige Mustererkennungsrezeptoren und ihre Liganden sowie Adaptorproteine**

Aufgelistet sind die verschiedenen, im Hinblick auf diese Arbeit relevanten Mustererkennungsrezeptoren mit ihren jeweiligen Liganden und Adaptorproteinen. Für verwendete Abkürzungen vergleiche Fließtext. Nach (Kumar *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2015; Takeuchi und Akira, 2010). STING: *Stimulator of interferon genes*, \*: auch bakteriellen Ursprungs.

### 1.1.1 Toll-like-Rezeptoren

Mitte der neunziger Jahre wurden zunächst die TLRs entdeckt (Lemaitre *et al.*, 1996), die heute die am besten untersuchten Mustererkennungsrezeptoren darstellen. Es handelt sich dabei um Typ 1-Transmembranproteine, die sich jeweils aus einer extrazellulären (den sogenannten *leucin-rich repeats* für die PAMP-Erkennung), transmembranen und zytosolischen (die *toll-interleukin 1 receptor* (TIR) Domäne zur Interaktion mit Adaptormolekülen) Komponente zusammensetzen (Akira *et al.*, 2001; Kawai und Akira, 2010). Bis heute konnten 13 verschiedene TLRs identifiziert werden, wobei TLR1 bis 9 gleichermaßen von murinen und humanen Zellen exprimiert werden, TLR10 in Mäusen nicht funktionell ist und TLR11, 12 und 13 nur in murinen Zellen vorkommen (Pandey *et al.*, 2015). Grundsätzlich können TLRs anhand ihrer Lokalisation in der Zelle in zwei Gruppen unterteilt werden, die membranösen und die endosomalen TLRs. Die membranösen TLRs befinden sich in der Plasmamembran, also an der Zelloberfläche, umfassen TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10 und detektieren vorwiegend mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine oder Proteine (Kawai und Akira, 2010). TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 und 13 dagegen zählen zu den endosomalen TLRs, die ausschließlich intrazellulär in der Wand von Endosomen, Endolysomen, Lysosomen oder endoplasmatischem Retikulum vorkommen und verschiedene Nukleinsäure-Bestandteile erkennen (Pandey *et al.*, 2015). Die unterschiedliche Lokalisation der verschiedenen TLRs innerhalb der Zelle ist für die effektive und wenig störanfällige Mustererkennung und die Aktivierung der richtigen Signalwege von entscheidender Bedeutung (Barton und Kagan, 2009). Die verschiedenen Vertreter der TLR-

Familie werden von unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

Aus der Gruppe der membranösen TLRs interessiert im Bezug auf diese Arbeit TLR4, welcher als Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, bekannt wurde (Poltorak *et al.*, 1998). Er nimmt eine Sonderrolle ein, da er zur Erkennung von LPS initial an der Zelloberfläche exprimiert wird, später nach Bindung seines Liganden jedoch in Endolysosomen transloziert und dadurch in seiner Früh- und Spätphase unterschiedliche Signalwege aktivieren kann (Palsson-McDermott und O'Neill, 2004). Zu den weiteren von diesem Rezeptor erkannten PAMPs zählen unter anderem das Fusionsprotein von *respiratory syncytial-Virus* (RSV) und das Hüllprotein von *mouse mammary tumor-Virus* (MMTV) (Akira *et al.*, 2006).

Die endosomalen TLRs detektieren Nukleinsäuren viralen und bakteriellen Ursprungs, im Kontext von Autoimmunprozessen auch körpereigene Nukleinsäuren, was unter normalen Umständen jedoch durch die streng intrazelluläre Lokalisation dieser Rezeptoren verhindert wird (Pandey *et al.*, 2015). Das Protein UNC93B1 spielt bei der Regulation und Verteilung von TLR3, 7 und 9 vom endoplasmatischen Retikulum auf die Endolysosomen eine entscheidende Rolle (Kim *et al.*, 2008b). TLR3 wird von nahezu allen Zellen des angeborenen Immunsystems außer plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) und Neutrophilen, und von verschiedenen epithelialen Zellen exprimiert und nimmt eine entscheidende Rolle bei der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferone (IFN) zur Virusabwehr ein (Kawai und Akira, 2010). Er erkennt neben dem synthetischen doppelsträngigem (ds)-Ribonukleinsäure (RNA)-Analogon *polyinosinic:polycytidylic acid* (poly(I:C)) (Alexopoulou *et al.*, 2001) genomische dsRNA von Reoviren, Cytomegalovirus (CMV) und *Herpes simplex-Virus* (HSV)-1. Auch einige *small interfering* (si)-RNAs und dsRNA, die bei der Replikation von einzelsträngigen (ss)-RNA-Viren wie RSV, *Encephalomyocarditis-Virus* (EMCV) und *West Nile-Virus* (WNV) anfallen, gehören zu den erkannten PAMPs (Kawai und Akira, 2010).

Anders als TLR3 werden TLR7, 8 und 9 besonders stark von pDCs exprimiert, die bei bestehender Virusinfektion große Mengen an Typ-I-Interferonen sezernieren (Kawasaki *et al.*, 2011). TLR7 und 8 detektieren in erster Linie virale ssRNA von *vesicular stomatitis-Virus* (VSV), Influenza-A-Virus, humanes *immunodeficiency-Virus* und Coxsackie-B-Virus sowie die synthetischen Imidazoquinoline-Derivate Imiquimod und Resiquimod (R848) und Guanin-Analoga wie Loxoribine (Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004; Kawai und Akira, 2010; Wang *et al.*, 2007). Weiter spielen sie auch bei der Detektion von RSV, *Sendai-Virus* (SeV) und humanes *Metapneumo-Virus* eine Rolle (Pandey *et al.*, 2015). Außerdem konnte gezeigt

werden, dass TLR7 und 8 auch auf bakterielle RNA reagieren (Mancuso *et al.*, 2009). TLR9 dagegen erkennt virale und bakterielle DNA, die reich ist an unmethylierten Cytosin-phosphat-Guanin (CpG)-DNA-Motiven. Zu diesen Viren zählen CMV, HSV-1/-2 und Adenoviren (Hemmi *et al.*, 2000; Kawasaki *et al.*, 2011). Neben genomischer DNA sind auch verschiedene synthetische CpG-Oligonukleotide und das von *Plasmodium falciparum* produzierte Hemozoin Liganden von TLR9 (Coban *et al.*, 2010).

### 1.1.2 RIG-I-like-Rezeptoren

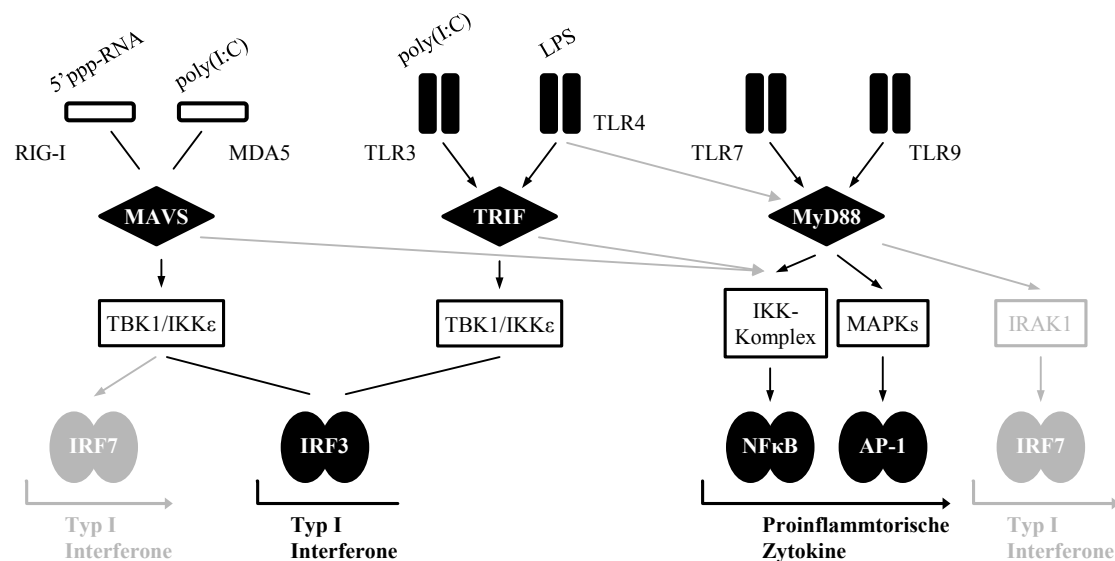
Die zweite, im Hinblick auf diese Arbeit wichtige Familie von Mustererkennungsrezeptoren stellen RLRs mit ihren drei Vertretern RIG-I, *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) dar. Im Unterschied zu den TLRs kommen diese drei Rezeptoren in nahezu allen Zelltypen, also nicht nur in Immunzellen, vor (Yoneyama und Fujita, 2009). Sie setzen sich grundsätzlich aus drei Komponenten zusammen, der aminoterminalen Region mit *Caspase activation and recruitment domains* (CARDs), der zentralen *DEAD box helicase/ ATPase*-Domäne und der carboxyterminalen regulatorischen Domäne (Yoneyama und Fujita, 2008). Lediglich LGP2 fehlt die aminoterminalen CARD Domäne und erfüllt deshalb vordergründig eine andere, bislang nicht vollständig geklärte Funktion. Diese liegt in der stark von der jeweiligen Situation abhängigen entweder positiven oder negativen Regulation antiviraler Immunantworten (Saito *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2014).

RIG-I erkennt Vertreter verschiedener Virusfamilien, beispielsweise *Newcastle-Disease-Virus* (Bibeau-Poirier *et al.*), SeV, VSV, Japanisches Enzephalitis Virus, Influenza-A-Virus, Masernvirus oder Ebola-Virus (Kato *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2011). Dabei detektiert es vorzugsweise kurze dsRNA-Sequenzen (maximal 1000 Basenpaare lang) mit einem 5'ppp-Triphosphat-modifiziertem ssRNA-Ende (5'ppp-RNA), die sich oft in viralen Nukleinsäuren finden (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). Die Aufgabe von MDA5 liegt dagegen in der Detektion verschiedener Vertreter aus der Familie der Picornaviridae, darunter EMCV, *Theiler's-Virus*, Mengovirus, Hepatitis-C-Virus und das Norovirus (Kato *et al.*, 2006; McCartney *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu RIG-I bindet MDA5 dsRNA-Fragmente mit einer Länge von 2000 oder mehr Basenpaaren (Kato *et al.*, 2008). Einige Viren werden sowohl von RIG-I als auch von MDA5 erkannt: Dengue-Virus, WNV und Reovirus (Fredericksen *et al.*, 2008; Loo *et al.*, 2008).

## 1.2 Signalwege von Toll- und RIG-I-like-Rezeptoren

Zwischen der Erkennung mikrobieller Strukturen auf Rezeptorebene und der Auslösung von Effektormechanismen zur Immunabwehr liegen eine Reihe von Proteinen und Enzymen, die in ihrer Gesamtheit die Signaltransduktionskaskade darstellen. Zu Beginn dieser intrazellulären Signalwege stehen die Adaptorproteine, die mit den entsprechenden Rezeptoren interagieren. Während RIG-I und MDA5 beide auf *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS) als Adaptorprotein zurückgreifen, muss bei den TLRs grundsätzlich zwischen vier verschiedenen Adaptorproteinen unterschieden werden: *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *toll-interleukin 1 receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF) und den Ko-Adaptoren *TIR-domain containing adaptor protein* (TIRAP) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) (O'Neill und Bowie, 2007; Takeuchi und Akira, 2010).

Abbildung 1 soll einen Überblick über die wesentlichen Bestandteile der Signalwege der oben vorgestellten Mustererkennungsrezeptoren geben, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.



**Abbildung 1: Überblick über die Signalwege endosomaler TLRs und intrazellulärer RLRs**

Dargestellt sind die für das Verständnis dieser Arbeit notwendigen Mustererkennungsrezeptoren mit ihren Signalwegen in vereinfachter Form (schwarz): links die beiden relevanten Vertreter der RLR, RIG-I und MDA5, rechts die strikt im Endosom lokalisierten TLRs, TLR3, 7 und 9, sowie TLR4, der sowohl in Endosomen, als auch an der Zelloberfläche zu finden ist. Zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung sämtlicher, an den jeweiligen Signalwegen beteiligten Proteine verzichtet. Stattdessen sind nur die wesentlichen Ebenen der jeweiligen Signalwege gezeigt. Für einen detaillierteren Überblick über alle beteiligten Signalproteine sei auf verschiedene Übersichtsartikel (Kawai und Akira, 2010; Pandey *et al.*, 2015; Takeuchi und Akira, 2010) verwiesen. Hier grau eingefärbt sind Bestandteile der intrazellulären Signalwege, die im Rahmen dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung sind, jedoch in dieser vereinfachten, dennoch vollständigen Übersicht zu den genannten Rezeptoren nicht fehlen sollen. Für verwendete Abkürzungen vergleiche Fließtext. Nach (Pandey *et al.*, 2015).

### 1.2.1 MyD88-abhängiger Signalweg

Der MyD88-abhängige Weg wird von allen TLRs außer TLR3 beschriftet. Dabei dient MyD88 als zentrales Adaptorprotein, das zwischen Rezeptor- und Enzymebene vermittelt. TLR4 und TLR2 bedürfen dazu des Ko-Adaptorproteins TIRAP (Fitzgerald *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002). MyD88 rekrutiert mehrere *IL-1R1-associated protein kinases* (IRAKs) und der so gebildete Enzymkomplex, auch als „*Mydosome*“ bezeichnet, bindet an *tumor necrosis factor* (TNF) *receptor associated factor* (TRAF) 6 (Gohda *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2010). Dies ermöglicht nun die Aktivierung des *transforming growth factor  $\beta$ -associated kinase 1* (TAK1)-Komplexes, der durch Phosphorylierung von Enzymen des *inhibitor of  $\kappa$ B* (I $\kappa$ B) *kinase* (IKK)-Komplexes den Abbau von I $\kappa$ B-Protein vermittelt und so den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B) aktiviert (Jiang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). Die beiden durch Phosphorylierung aktivierten Untereinheiten p50 und p65 translozierten anschließend in den Nukleus.

Gleichzeitig aktiviert der TAK1-Komplex auch die *mitogen activated protein*-Kinasen (MAPKs) bestehend aus den Unterfamilien der *extracellular-signal-regulated kinases* (ERKs), *p38 MAP kinase* (p38) und *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs) (Chang und Karin, 2001; Dong *et al.*, 2002). Diese lösen ihrerseits wiederum die Translokation verschiedener Transkriptionsfaktoren, unter anderem *activator protein 1* (AP-1) und *cAMP response element-binding protein* (CREB), in den Zellkern aus (Akira *et al.*, 2006). Gemeinsam münden diese MyD88-abhängigen Prozesse in der Induktion verschiedener Gene mit verstärkter Produktion proinflammatorischer Zytokine (Kawai und Akira, 2010). Lediglich in pDCs vermag MyD88 mittels Rekrutierung eines unter anderem aus TRAF3, TRAF6, IKK $\alpha$  und IRAK1 bestehenden Multiproteinkomplexes den Transkriptionsfaktor IRF7 zu aktivieren und so die Produktion von Typ-I-Interferonen auszulösen (Honda *et al.*, 2005; Kawai *et al.*, 2004).

### 1.2.2 TRIF-abhängiger Signalweg

Dagegen aktivieren TLR3 und TLR4 über den TRIF-abhängigen Signalweg die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und *interferon regulatory factor* (IRF) 3 (Yamamoto *et al.*, 2003a). TLR4 greift dabei wieder auf ein weiteres Adaptorproteins, TRAM, zurück (Fitzgerald *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003b). Die Aktivierung von NF $\kappa$ B erfolgt in Analogie zum MyD88-abhängigen Signalweg via TRAF6 und TAK1, wobei einige weitere Proteine wie *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIP1), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain* (TRADD) und Pellino-1 eine wichtige Rolle spielen (Kawai und Akira, 2010). Zusätzlich rekrutiert TRIF via TRAF3 einen Enzymkomplex bestehend aus *TANK-binding Kinase 1* (TBK1) und I $\kappa$ B Kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ), der im nächsten Schritt IRF3

phosphoryliert (Hacker *et al.*, 2006). Nach Aktivierung und Dimerisierung transloziert IRF3 in den Zellkern und induziert dort die Produktion von Typ-I-Interferonen, in erster Linie IFN- $\beta$ , und führt zur verstärkten Expression von IFN-induzierbaren Genen (Takeuchi und Akira, 2010).

### 1.2.3 MAVS-abhängiger Signalweg

Bei den RLRs ermöglicht erst die durch Bindung der entsprechenden Liganden ausgelöste Konformationsänderung von RIG-I und MDA5 in ihren CARD-Domänen die Assoziation mit dem Adaptorprotein MAVS, auch bekannt als *interferon promoter stimulator 1* (IPS-1) (Kawai *et al.*, 2005). MAVS befindet sich in der äußeren Membran von Mitochondrien und Peroxisomen und rekrutiert an diese intrazellulären Membranen sowohl die RLRs als auch TRAF3 unter Bildung eines sogenannten „Signalosoms“ (Dixit *et al.*, 2010; Scott, 2010). Dieses aktiviert im nächsten Schritt den TBK1-IKK $\epsilon$ -Komplex, woraufhin es zur Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 kommt (Paz *et al.*, 2006). Als Transkriptionsfaktoren stimulieren sie die Produktion von Interferonen, welche wiederum in auto- oder parakriner Art und Weise zur Hochregulierung von *interferon stimulated genes* (ISGs) und damit zur Verstärkung der antiviralen Immunantwort führen. Zusätzlich aktiviert das Signalosom auch den IKK-Komplex, was nachfolgend zu einer NF $\kappa$ B-vermittelten Steigerung der proinflammatorischen Zytokinproduktion führt (Loo und Gale, 2011; Yoneyama *et al.*, 2015).

## 1.3 Zusammenspiel bei der Mustererkennung

### 1.3.1 Begriffsdefinitionen

Pathogene tragen meist gleichzeitig mehrere unterschiedliche PAMPs, die wiederum von verschiedenen PRRs erkannt werden (Kawai und Akira, 2011). Ein Beispiel dafür ist RSV, das gleichzeitig von TLRs, RLRs und NLRs detektiert wird (Jensen und Thomsen, 2012). Um eine gezielte und effiziente Abwehrreaktion zu induzieren, müssen die verschiedenen PRRs und ihre Signalwege miteinander kommunizieren (Nish und Medzhitov, 2011). Diese beiden Autoren unterscheiden Kooperation, Komplementierung und Kompensation als verschiedene Formen des Zusammenspiels bei der Auslösung potenter Abwehrmechanismen (Nish und Medzhitov, 2011). An anderer Stelle wird bei kombinierter Aktivierung von verschiedenen PRRs grundsätzlich von komplementären, synergistischen oder antagonistischen Effekten gesprochen (Trinchieri und Sher, 2007). Für Synergismus liegt die Ausprägung des Effekts bei kombinierter Stimulation über der Summe der Effekte der Einzelstimulationen, auch supraadditiver Effekt genannt, Antagonismus bezeichnet demnach das Gegenteil (Tan *et al.*, 2014).

Die Literatur setzt im Hinblick auf die Interaktionen von PRR-Signalwegen weitestgehend konsequent folgende drei Begriffe ein, um die Auswirkung von kombinierter Stimulation auf die ausgelöste Immunantwort zu beschreiben: Synergismus, Sensitivierung (englisch *priming*) und Toleranz (Trinchieri und Sher, 2007). Dabei bezeichnet Synergismus die gesteigerte Antwort bei simultaner Stimulation, Sensitivierung die gesteigerte Antwort bei sequentieller Stimulation und Toleranz die abgeschwächte Antwort bei sowohl simultaner als auch sequentieller Stimulation (Bagchi *et al.*, 2007). In diesem Sinne werden die drei Begriffe auch in dieser Arbeit verwendet, wobei zusätzlich der Ausdruck Blockade zum Einsatz kommt. Dieser soll ausdrücken, dass die Immunantwort bei sequentieller Stimulation komplett ausfällt, da die Konditionierung eine maximale Abschwächung des Effekts der Restimulation bewirkt.

Zu beachten ist, dass unter sequentieller Stimulation in den verschiedenen Originalarbeiten ein unterschiedlich langes Zeitintervall zwischen den einzelnen Stimulationsschritten verstanden wird: acht (Suet Ting Tan *et al.*, 2013), zwölf (De Nardo *et al.*, 2009), 20 (Bagchi *et al.*, 2007), 24 (Dobrovolskaia *et al.*, 2003) oder 48 Stunden (Broad *et al.*, 2007). In dieser Arbeit liegt zwischen den beiden Stimulationsschritten eine 24-stündige Konditionierungsphase, da dieser Zeitraum für die Effektdarstellung als am geeignetsten identifiziert wurde (Hotz *et al.*, 2015). Konditionierung bezeichnet dabei den Zeitraum der ersten Stimulation (vgl. auch Abbildung 2), die letztlich die Reprogrammierung auslöst. Unter Reprogrammierung versteht man den Prozess, der ausgelöst durch die erste Stimulation dazu führt, dass die Reaktion auf die zweite Stimulation verändert ausfällt verglichen mit der Reaktion ohne vorherige Konditionierung. Ursprünglich wurde der Begriff Reprogrammierung zur Charakterisierung veränderter Rezeptorantworten nach Mehrfachstimulation innerhalb der Familie der TLRs eingeführt (Dobrovolskaia *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 2013; Shnyra *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Beispiele für synergistische und antagonistische Interaktionen

Beispiele für das Zusammenspiel von Mustererkennungsrezeptoren finden sich in der Literatur viele. Historisch betrachtet wurden zunächst Toleranzphänomene bei wiederholter Stimulation mit Pyogenen beschrieben (Beeson, 1947). Erst später wurde bekannt, dass es sich dabei um Toleranz für LPS bei wiederholter Stimulation von TLR4 handelt, was heute als Endotoxin-Toleranz bezeichnet wird (Biswas und Lopez-Collazo, 2009). Das gilt als klassisches Beispiel für Homotoleranz, d.h. Toleranz bei wiederholter Stimulation mit demselben Liganden. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich in einer früheren Arbeit mit Homotoleranz bei wiederholter Stimulation mit R848 (Bourquin *et al.*, 2011). Hetero- oder auch *cross*-Toleranz, also das verminderte Ansprechen von Rezeptoren bei Stimulation mit verschiedenen Liganden, wurde später für TLR2 und TLR4 entdeckt (Dobrovolskaia *et al.*, 2003; Lehner *et al.*, 2001; Sato *et al.*,



2000). Im Verlauf erfolgten zahlreiche Publikationen, die Toleranzmechanismen zwischen verschiedenen Vertretern der TLR-Familie beschrieben, unter anderem für TLR2 und TLR9 (Bagchi *et al.*, 2007), TLR4, 5, 7 und 9 untereinander (Broad *et al.*, 2007) oder TLR2 und TLR4, 7 bzw. 8 (Wenink *et al.*, 2009). Diesen Beispielen für Heterotoleranz war gemeinsam, dass die beteiligten Rezeptoren intrazellulär auf das gleiche Adaptorprotein (MyD88) und damit gemeinsame Signalwege zurückgriffen (Kawai und Akira, 2011).

Bereits Sato und Kollegen konnten zeigen, dass in Makrophagen die Art der wiederholten Stimulation eine entscheidende Auswirkung auf die ausgelösten Effekte hat: während die sequentielle Stimulation von TLR2 und TLR4 (24-stündiger Zeitabstand) im Bezug auf die TNF- $\alpha$ -Produktion durch Toleranz charakterisiert war, kam es bei simultaner Stimulation zu synergistischen Effekten (Sato *et al.*, 2000). Da in der Diskussion noch detaillierter auf die entsprechenden Originalarbeiten zum Thema Synergismus und Sensitivierung von TLRs eingegangen wird, soll entsprechende Literatur an dieser Stelle nicht genauer besprochen werden.

Es existieren jedoch auch wenige Beispiele für das synergistische Zusammenspiel zwischen PRRs aus verschiedenen Familien. So war nach poly(I:C)-Stimulation oder viraler Infektion NOD1/2 für seine Liganden sensitiviert, was bei bakterieller Superinfektion zu einer überschießenden Produktion proinflammatorischer Zytokine führte (Kim *et al.*, 2011). Eine andere Gruppe zeigte, dass die Konditionierung mit einem TLR2-Liganden eine verstärkte Typ-I-Interferon-Produktion nach Stimulation von TLRs und RLRs bewirkt (Perkins *et al.*, 2013). Genauso wurden auch Toleranzphänomene zwischen PRRs verschiedener Familien beschrieben: Influenza A-Virusinfektion führt zu einem verminderten Ansprechen von TLRs und damit einer eingeschränkten Produktion proinflammatorischer Zytokine (Didierlaurent *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen belegen, genauso wie die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, dass Reprogrammierung auch zwischen verschiedenen Klassen von Mustererkennungsrezeptoren stattfindet.

## 1.4 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Im Rahmen der Studien unserer Arbeitsgruppe zur TLR-Toleranz (Bourquin *et al.*, 2011) erfolgten auch Versuche zur sequentiellen Stimulation mit verschiedenen viralen RNA-Oligonukleotiden wie poly(I:C) und polyadenylic-polyuridylic acid (poly(A:U)). Dabei wurden Immunzellen nach Konditionierung mit einem ersten PRR-Stimulus mit einem anderen, unterschiedlichen Liganden stimuliert. Der hierbei beobachtete Einfluss der Konditionierung mit poly(I:C) auf die nachfolgende Aktivierung von TLR7, 8 und 9 sowie RIG-I und MDA5 in Immunzellen war neu und in diesem Maße in der Literatur bislang nicht vorbeschrieben: während TLRs für ihre Liganden sensibilisiert waren und entsprechend mit einer verstärkten proinflammatorischen Zytokinproduktion reagierten, führte die poly(I:C)-Konditionierung zu einem verminderten Ansprechen von RLRs und nachfolgend einer verminderten Produktion von Typ-I-Interferonen (Hotz *et al.*, 2015). Diese Reprogrammierung von TLRs und RLRs in entgegengesetzter Weise konnten von unserer Arbeitsgruppe erstmalig gezeigt werden.

Es schlossen sich zahlreiche Experimente zur genaueren Charakterisierung der Effekte an. Durch eine 24-stündige Konditionierung mit poly(I:C) ließen sich im Bezug auf die veränderten Immunantworten von TLRs und RLRs die stärkste Wirkung erzielen. Aufgrund des zeitlich verzögerten Auftretens der maximalen Ausprägung der Effekte war nicht von einer synergistischen Wirkung von poly(I:C) und den entsprechenden sekundären Stimuli, sondern vielmehr von Reprogrammierung der beteiligten Signalwege auszugehen (vgl. Kapitel 1.3). Dabei waren die Konditionierungseffekte nicht nur *in vitro* in naiven Knochenmarkszellen, sondern auch in dendritischen Zellen (DCs) und J774 Makrophagen und gleichzeitig auch *in vivo* reproduzierbar, was insgesamt auf eine breitere Gültigkeit der Reprogrammierung hinwies (Hotz *et al.*, 2015).

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse sind integraler Bestandteil der gemeinsamen Publikation (Hotz *et al.*, 2015), die die gesammelten Daten aller Arbeitsgruppenmitglieder zum Thema Reprogrammierung durch poly(I:C) beinhaltet und die hier vorgestellten Daten in einen breiteren Kontext einbettet.

## 1.5 Zielsetzung

Aufbauend auf den Ergebnissen der Vorarbeiten war es zunächst Ziel dieser Promotionsarbeit genauer aufzuklären, inwiefern das zuvor erstmals beschriebene Phänomen der entgegengesetzten Reprogrammierung von TLRs und RLRs breitere Gültigkeit für immunologische Abwehrprozesse besitzt. Dabei galt es zu untersuchen, ob die

Reprogrammierungseffekte spezifisch sind für Konditionierung mit poly(I:C) oder ob diese sich generell bei Konditionierung mit MyD88-unabhängigen Stimuli induzieren lassen. Das wurde anhand von LPS untersucht, welches ebenfalls, wenn auch nicht ausschließlich, den TRIF-abhängigen Signalweg aktiviert (Kawai und Akira, 2010).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde weiter der Frage nachgegangen, welche Bestandteile der oben beschriebenen Signalwege (vgl. Kapitel 1.2) an der Vermittlung der Effekte essentiell beteiligt sind. Dabei galt es zunächst unter Verwendung von TRIF-*knockout*-Mäusen zu klären, welche Rolle das Adaptorprotein TRIF bei poly(I:C)-Konditionierung *in vivo* für die beobachteten Effekte spielt. Im nächsten Schritt wurde die Bedeutung des Enzymkomplexes TBK1/IKKε genauer analysiert, der ein entscheidender Bestandteil MyD88-unabhängiger Signalwege unterhalb der Adaptorprotein-Ebene ist. Dies geschah durch den Einsatz des Inhibitors BX795 *in vitro*, der den Signalweg gezielt auf dieser Ebene pharmakologisch blockiert. Da durch Aktivierung beider MyD88-unabhängiger Signalwege, d.h. sowohl des TRIF- als auch des MAVS-abhängigen Signalwegs, die Produktion von Typ-I-Interferonen induziert wird, sollte mit rekombinanten Interferonen untersucht werden, ob diesen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des Konditionierungseffekts zukommt.

Der letzte Abschnitt der Experimente für diese Doktorarbeit widmete sich der Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die der Sensitivierung und Blockade der Rezeptoren auf Proteinebene zugrunde liegen. Dazu wurde mittels Western Blot der Expressions- und Aktivierungsstatus verschiedener Signalproteine analysiert. Zunächst sollte untersucht werden, ob die Effekte durch Veränderungen auf Rezeptorebene zu erklären sind. Anschließend war es Ziel nähere Aufschlüsse darüber zu erhalten, welche Signalproteine durch Konditionierung quantitativ oder qualitativ besonders stark verändert werden, um schließlich einzugrenzen zu können, auf welcher Ebene der entscheidende Schritt der Reprogrammierung stattfindet.

Diese Arbeit zielte insgesamt daraufhin ab, die molekularen Mechanismen, die der Reprogrammierung von Mustererkennungsrezeptor-Signalwegen zu Grunde liegen, näher zu charakterisieren und die Generalisierbarkeit des Phänomens der Reprogrammierung zu untersuchen. Sie solle einen Beitrag zum Verständnis der Interaktionen von Mustererkennungsrezeptoren bei der Pathogendetektion innerhalb des angeborenen Immunsystems leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Aqua ad injectabilia	Braun AG (Melsungen, D)
Aqua destillata (ddH <sub>2</sub> O)	aus eigenem Wasseraufbereitungssystem Direct-Q 3
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ciprofloxacin (Ciprobay® 200 mg)	Bayer Vital (Leverkusen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, D)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	PAA (Pasching, A)
ECL <i>Plex fluorescent rainbow markers</i> (Amersham)	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Ethanol (70 % vergällt)	Apotheke Innenstadt LMU (München, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>EZ-Run pre-stained rec protein ladder</i> (Fischer BioReagents)	Fischer Scientific (Loughborough, UK)
Fötales Kälberserum (FCS) (Gibco)	Invitrogen (Paisley, GB)
Fötales Kälberserum (FCS) Gold	PAA (Pasching, A)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Isofluran (Forene®)	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol (100 Vol %)	Merck (Darmstadt, D)
L-Glutamin 200 mM	PAA (Pasching, A)
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen (Paisley, GB)
Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, D)

Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, D)
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Opti-MEM I <i>reduced serum</i> Medium (Gibco)	Invitrogen (Paisley, GB)
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA (Pasching, A)
PharmLyse Lysereagenz	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	PAA (Pasching, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	PAA (Pasching, A)
Schwefelsäure 2 N (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Apotheke Innenstadt LMU (München, D)
<i>Sodium</i> -dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
TMB (= Tetramethylbenzidin) <i>substrate reagent Set</i>	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Tris-Hydrochlorid (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin (10x)	PAA (Pasching, A)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, D)

Die verwendeten Plastikmaterialien wurden von Brand (Wertheim, D), Becton Dickinson (Heidelberg, D), Corning (Kaiserslautern, D), Eppendorf (Hamburg, D), Greiner Bio-One (Frickenhausen, D), Henke-Sass, Wolf (Tuttlingen, D) und Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

### 2.1.2 Lösungen, Medien und Puffer

#### ELISA

<i>Blocking buffer/ assay diluent</i>	10 Vol % FCS in PBS (pH 7,0)
<i>Coating buffer</i> (für IFN- $\alpha$ )	0,2 M Natriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) in ddH <sub>2</sub> O (pH 6,5)
<i>Coating-buffer</i> (für IL-6)	0,1 M Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und NaHCO <sub>3</sub> ) in ddH <sub>2</sub> O (pH 9,5)
<i>Wash buffer</i>	0,05 Vol % Tween 20 in PBS (pH 7,0)
<i>Stop solution</i>	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Western blot

5 %ige Milch	5 % Milchpulver in TBS+T
BSA-NaN <sub>3</sub> -Lösung	5 % BSA, 0,05 % NaN <sub>3</sub> in TBS+T
Lämmli-Puffer (6x) ad 10 ml	6 mg Bromphenolblau, 0,93 g DTT, 4,7 ml Glycerol, 1,2 g SDS, 0,6 ml 0,5 M Tris-HCl in 4,7 ml ddH <sub>2</sub> O (pH 6,8)
Laufpuffer	192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris in ddH <sub>2</sub> O (pH 8,3)
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS in ddH <sub>2</sub> O (pH 6,8)
Transferpuffer	192 mM Glycin, 20 Vol % Methanol, 25 mM Tris in ddH <sub>2</sub> O (pH 8,0)
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS in ddH <sub>2</sub> O (pH 8,8)
Tris-buffered saline mit Tween (TBS+T)	25 mM Tris, 0,1 Vol % Tween 20 in ddH <sub>2</sub> O (pH 7,3)

Zellkultur

DMEM-Vollmedium	10 Vol % FCS Gold, 2 mM L-Glutamin, 10 µg/ml Ciprofloxacin in DMEM
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10 Vol % Lyse-Puffer (BD Pharm Lyse) in Aqua ad injectabilia
RMPI-Vollmedium	10 Vol % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in RPMI 1640 Medium
Trypsin-EDTA-Lösung	10 Vol % Trypsin (10x), 0,025 Vol % EDTA in PBS

**2.1.3 Immunstimulantien, Inhibitoren und Reagenziensätze**Immunstimulation

CpG Oligonukleotid 1826 (CpG)	InvivoGen (Toulouse, F)
<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)	tebu-bio (Offenbach, D)
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i> (poly I:C)	InvivoGen (Toulouse, F)
<i>Recombinant mouse</i> Interferon alpha (IFN- $\alpha$ )	PBL InterferonSource (Piscataway, USA)
<i>Recombinant mouse</i> Interferon beta (IFN- $\beta$ )	PBL InterferonSource (Piscataway, USA)
Resiquimod (R848)	Enzo Life Sciences (Lörrach, D)

5'-Triphosphat-RNA (5'ppp-RNA) wurde in unserem Labor wie vorbeschrieben (Hornung *et al.*, 2006; Poeck *et al.*, 2008) selbst hergestellt.

Inhibitor

BX795 InvivoGen (Toulouse, F)

Reagenziensätze

Mouse IL-6 ELISA Set (BD OptEIA™) Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Für den in unserem Labor selbst entwickelten, murinen IFN- $\alpha$  ELISA wurden folgende Materialien benötigt:

Goat anti-rabbit IgG Ab, horseradish peroxidase (HRP)-conjugate	Santa Cruz Biotech. (Heidelberg, D)
Rabbit anti-mouse Interferon Alpha pAb	PBL InterferonSource (Piscataway, USA)
Rat anti-mouse Interferon Alpha mAb (RMMA-1)	PBL InterferonSource (Piscataway, USA)
Recombinant mouse Interferon alpha A	PBL InterferonSource (Piscataway, USA)

**2.1.4 Antikörper**Primäre Antikörper für Western Blot

Alle im Folgenden aufgelisteten (monoklonalen) Antikörper (engl.: *antibody*; mAb und Ab) wurden von der Fa. Cell Signaling Technology (Danvers, USA) bezogen und wie rechts angegeben in BSA-NaN<sub>3</sub>-Lösung verdünnt eingesetzt.

$\beta$ -Actin (13E5) rabbit mAb	1:1000
$\beta$ -Actin (8H10D10) mouse mAb	1:1000
Phospho-IRF3 (Ser396) (4D4G) rabbit mAb	1:1000
IRF3 (D83B9) rabbit mAb	1:1000
MDA-5 (D74E4) rabbit mAb	1:1000
Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (93H1) rabbit mAb	1:1000
NF- $\kappa$ B p65 (L8F6) mouse mAb	1:1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP® rabbit mAb	1:1000
p38 MAPK rabbit Ab	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/ Tyr204) (D13.14.4E) XP® rabbit mAb	1:2000
p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) mouse mAb	1:2000
Rig-I (D14G6) rabbit mAb	1:1000
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) mouse mAb	1:2000

SAPK/JNK (56G8) <i>rabbit</i> mAb	1:1000
Phospho-TBK1/NAK (Ser172) (D52C2) XP <sup>®</sup> <i>rabbit</i> mAb	1:1000
TBK1/NAK (D1B4) <i>rabbit</i> mAb	1:1000

#### Sekundäre Antikörper für Western Blot

Beide unten gelisteten, mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten Antikörper stammten von der Fa. Thermo Scientific (Rockford, USA) und wurden in entsprechender Verdünnung in 5 %iger Milch (siehe rechts) eingesetzt.

(Pierce) <i>Goat anti-mouse</i> IgG Ab, DyLight 800 <i>conjugate</i>	1:10000
(Pierce) <i>Goat anti-rabbit</i> IgG Ab, DyLight 680 <i>conjugate</i>	1:10000

### 2.1.5 Geräte

<i>Vertical electrophoresis system</i>	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
<i>LI-COR Fluorescence Reader</i>	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
<i>Microplate reader Model 680</i>	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Mikroskop Aciouvert 25	Zeiss (Göttingen, D)
<i>Multimode microplate reader Mithras LB 940</i>	Berthold Technologies (Bad Wildbad, D)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
Spannungsgeber PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin (Berlin, D)

### 2.1.6 Software

Adobe Creative Suite 4 (CS4)	Adobe Systems (San Jose, USA)
Endnote X7	Thomson Reuter (Carlsbad, USA)
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft Office 2007	Mircosoft (Redmond, USA)

## 2.2 Tierversuche

#### Versuchstiere

Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden von der Fa. Harlan-Winkelmann (Borchen, D) bezogen. Homozygot die LPS2-Mutation im Trif-Gen tragende Mäuse (TRIF<sup>LPS2/LPS2</sup>), denen also ein



funktionelles Adaptorprotein TRIF fehlt (Hoebe *et al.*, 2003), wurden freundlicherweise von Prof. B. Holzmann (Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar) bereitgestellt. Sie wurden später im Tierstall der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV weiter gezüchtet. Das Alter der Mäuse bei Versuchsbeginn betrug in der Regel sechs Wochen.

### Rechtliche Bestimmungen

Alle Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern gemäß den Vorgaben des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### In vivo-Immunstimulation

Die Injektion von 250 µg poly(I:C) in 100 µl wurde subkutan (s.c.) in die rechte Flanke verabreicht. Hierbei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass nach der Injektion eine Vorwölbung sichtbar war und der Stimulus nicht wieder über den Stichkanal austrat.

### Euthanasierung und Organpräparation

Nach Euthanasierung der Versuchstiere und anschließend kurzer Desinfektion mit Isopropanol wurden die Hinterläufe der Tiere möglichst vollständig von Fell, Muskel- und Bindegewebe befreit und die Hüft-, Knie- und Sprunggelenke exartikuliert. Die so freipräparierten Femora und Tibiae wurden anschließend in einem mit PBS gefülltem Gefäß auf Eis zur Isolierung von Knochenmarkszellen in die Zellkultur transportiert.

## **2.3 Zellkultur**

### **2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen**

Sämtliche Zellen wurden unter gleichbleibenden Bedingungen (37 °C Temperatur, 95 % Luftfeuchtigkeit, Gemisch aus 95 % Raumluft und 5 % CO<sub>2</sub>) in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Sie wurden dazu in Kulturflaschen oder Multi-Well-Platten ausgesät. Alle Manipulationen erfolgten ausnahmslos in steriler Arbeit unter einer Sicherheitswerkbank. Die Bestimmung von Viabilität und Zellzahl erfolgte mittels Trypanblau-Ausschlusstests unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer und eines Mikroskops zur Auszählung.

### **2.3.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension von Knochenmarkszellen**

Der Markraum der freipräparierten und desinfizierten Femora und Tibiae (vgl. Kapitel 2.2) wurde an den Epiphysen mit einer Schere steril eröffnet, das Mark mit PBS heraus gespült und

durch eine Spritze mit 20 G Kanüle vereinzelt. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände verworfen und es erfolgte die Resuspension der Zellen in 2 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer. Etwa zwei bis maximal fünf Minuten später waren die Erythrozyten aufgelöst und der Vorgang des Lysierens wurde mit PBS (Verhältnis 10:1) abgestoppt. Die nach einem weiteren Zentrifugationsschritt fertig aufgereinigten Knochenmarkszellen wurden schließlich in RPMI-Vollmedium aufgenommen und für *in vitro*-Experimente verwendet.

### 2.3.3 Generierung von dendritischen Zellen

Die Differenzierung von murinen Knochenmarkszellen zu DCs erfolgte wie in älteren Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Bourquin *et al.*, 2011) mit kleineren Veränderungen des Protokolls. Zunächst wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml in RPMI-Vollmedium aufgenommen. Nach Zugabe von GM-CSF (20 ng/ml) wurden die Zellen für sieben Tage in Zellkulturflaschen im Brutschrank kultiviert. Die Kulturflaschen während dieser Zeit möglichst wenig zu bewegen, spielte für den Erfolg der Differenzierung eine wichtige Rolle. An Tag 8 wurden die ausdifferenzierten DCs geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen und die adhärenen Zellen mittels kaltem PBS vom Grund der Zellkulturflasche abgespült. Falls die Zellen sich so nicht lösen ließen, konnte behutsam mit einem Zellschaber nachgeholfen werden. Nach Zentrifugation wurden die Zellen für Versuche weiterverwendet.

### 2.3.4 Kultivierung von J774-Zellen

Die murine Makrophagen (ähnliche) Zelllinie J774A.1 (Balb/c-Hintergrund; *American Type Culture Collection* TIB-67<sup>TM</sup>) wurde freundlicherweise von Prof. J. Heesemann (Max-von-Pettenkofer Institut, LMU München) zur Verfügung gestellt. Sie wurde in DMEM-Vollmedium kultiviert und zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:10 passagiert. Das Ablösen der adhärenen Zellen vom Untergrund erfolgte mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung. Bei mikroskopisch sichtbarer Aktivierung wie etwa durch Mykoplasmen-Kontamination wurden die J774-Zellen nicht weiterverwendet, sondern eine frische Charge aus dem Stickstofftank aufgetaut. Das Einfrieren von Zellen erfolgte standardmäßig in Kryo-Röhrchen mit 40 % Medium, darin gelöst die Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml, und 60 % FCS mit 10 % DMSO.

### 2.3.5 Transfektion zur Stimulation intrazellulärer Rezeptoren

Damit RNA-Oligonukleotide von ihren Rezeptoren RIG-I oder MDA5 erkannt werden kann, müssen sie zunächst ins Zellinnere gelangen, was durch Transfektion der entsprechenden Stimuli, 5'ppp-RNA und poly(I:C), mit Hilfe des Reagenz Lipofectamine 2000 erreicht wurde. In einem möglichst geringen Volumen von Opti-MEM I *reduced serum* Medium mit 100 IU/ml Penicillin und Streptomycin bzw. 10 µg/ml Ciprofloxacin wurden Ligand und Lipofectamine bei Raumtemperatur in mehreren Schritten inkubiert. Dabei wurde für 24-Well-Platten 2 µl Lipofectamine je Well benötigt, für 96-Well-Platten nur 0,5 µl. Erst nach der Inkubation erfolgte die Stimulation der Zellen.

## 2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Grundsätzlich wurden die Überstände der Stimulationsexperimente in der Zellkultur direkt zur quantitativen Analyse der Zytokine mittels ELISA herangezogen. Sofern jedoch nicht anders möglich wurden sie zwischenzeitlich eingefroren.

### IL-6 ELISA

Für die Detektion der Konzentration von proinflammatorischem Interleukin (IL)-6 wurde das entsprechende BD OptEIA™ *Mouse* ELISA Set gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden dazu standardmäßig in einer 1:4 Verdünnung auf *halfwell*-Platten aufgetragen.

### IFN-α ELISA

Die Bestimmung der Konzentration von IFN-α in Proben erfolgte anhand eines laboreigenen Protokolls. Zuerst wurde der *capture antibody* (*rat anti-mouse* Interferon Alpha mAb, RMMA-1) in *coating buffer* (pH 6,5) auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt. Eine 96-Well ELISA-Platte wurde dann mit jeweils 50 µl dieser Lösung pro Well über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit *washing buffer* blockte man diese Platte für drei Stunden bei Raumtemperatur mit 150 µl *assay diluent* pro Well. In die wieder dreimal gewaschenen Platten füllte man nun in je 50 µl pro Well die Proben und das *recombinant mouse* Interferon alpha A für die Standardkurve. Die Proben wurden dazu in der Regel nicht verdünnt. Die Inkubation fand über Nacht bei 4 °C statt. Sobald man die Platte tags drauf zehnmals gewaschen hatte, konnte der *detection antibody* (*Rabbit anti-mouse* Interferon Alpha pAb) in einer Konzentration von 625 ng/ml und in 50 µl Volumen in die Wells gegeben werden. Er inkubierte für drei Stunden bei Raumtemperatur. In die erneut zehnmals gewaschenen Platten wurde daraufhin der enzymgekoppelte Antikörper (*Goat anti-rabbit* IgG Ab, HRP-*conjugate*) gegeben, eingesetzt in einer Konzentration von 7,5 µg/ml bei je 50 µl pro Well. Nach dem

letzten zehnmaligen Waschen konnten dann die ELISA-Platten wie oben beschrieben entwickelt und ausgewertet werden (Bourquin *et al.*, 2011; Hornung *et al.*, 2006).

## 2.5 Proteinanalyse mittels Western blot

### 2.5.1 Proteinvorbereitung

Zur Gewinnung der Proben für Western Blot wurden J774-Zellen oder DCs nach den Stimulationsschritten in der Zellkultur durch Waschen mit PBS von sämtlichen Medienrückständen befreit und anschließend direkt in Lämmli-Puffer (6x) aufgenommen (50 µl je Well einer 24-Well-Platte). Dies geschah auf Eis bei möglichst zügigem Arbeiten, um Veränderungen an sensitiven Proteinen möglichst zu verhindern. Die Proben wurden dann vor ihrem Kochen (10 Minuten bei 99 °C) zur DNA-Fraktionierung für dreimal 10 Sekunden im Ultraschallbad behandelt.

### 2.5.2 Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht eine gute Auftrennung von Proteinen mit einer Größe von 5 bis 250 kDa (Laemmli, 1970). Das für die später gezeigten Ergebnisse verwendete diskontinuierliche Gel setzte sich folgendermaßen zusammen:

#### 10 ml Trenngel (10 %)

4,1 ml dH<sub>2</sub>O  
3,3 ml Acrylamid (30 %)  
2,5 ml Trenngelpuffer  
0,2 ml APS (10 %)  
8 µl TEMED

#### 4 ml Sammelgel (5 %)

2,26 ml dH<sub>2</sub>O  
0,68 ml Acrylamid (30 %)  
1,00 ml Sammelgelpuffer  
0,08 ml APS (10 %)  
8 µl TEMED

Das Gel wurden mit 10 bis 25 µl Probe oder 5 µl Marker pro Tasche (fünfzehn Taschen je Gel) beladen. ECL *Plex fluorescent rainbow markers* (Amersham) und *EZ-Run pre-stained rec protein ladder* (Fischer BioReagents) dienten als Marker. Die Gelmatrix wurde ausreichend mit Laufpuffer umgeben und dann mit einem PowerPac Spannungsgeber ein elektrisches Feld angelegt. Dabei wurde das Gerät auf eine konstante Stromstärke von 45 mA für 90 Minuten eingestellt. Kurz vor dem Herauslaufen der mit Bromphenolblau angefärbten Front aus dem Gel wurde der Vorgang gestoppt.

### 2.5.3 Western Blot

Nach dem *wet transfer*-Verfahren wurden in den Experimenten für diese Doktorarbeit die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Transfer fand bei konstant 350 mA aus dem PowerPac Spannungsgeber für ungefähr 90 min statt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gel auf Markerrückstände untersucht und gegebenenfalls für weitere 10 Minuten transferiert. Vor der weiteren Verwendung wurde die Membran mehrmals mit TBS+T gewaschen.

### 2.5.4 Immundetektion einzelner Proteine

Zunächst wurde die frische Membran in 5 %ige Milch gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Anschließend inkubierte man sie über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (vgl. Kapitel 2.1.4). Am nächsten Tag erfolgte dann die Inkubation mit dem sekundären, durch einen fluoreszierenden Farbstoff markierten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Zwischen den soeben beschriebenen Arbeitsschritten wurde die Membran immer mindestens dreimal mit TBS+T für jeweils 10 Minuten gewaschen. Schließlich wurde ein letztes Mal gewaschen und die Membran dann getrocknet. Die vollständig trockene Membran legten wir in den Scanner des Odyssey *Imaging systems* von LI-COR ein. Mit dem gleichnamigen Programm wurde die Fluoreszenz der gebundenen Antikörper ausgelesen.

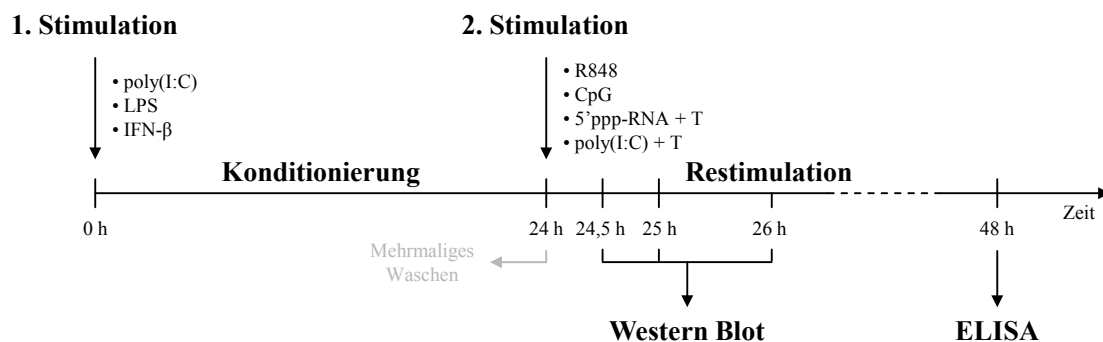
## 2.6 Statistische Analyse

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse mit der Software von GraphPad Prism 5 unter Verwendung des Zweistichproben t-Test statistisch analysiert. Die Messwerte werden in allen Abbildungen als Mittelwerte und Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) angezeigt. p-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant gewertet und mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Sterne auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Zur Erstellung der Abbildungen und Tabellen wurden GraphPad Prism 5 und Programme aus den Produktfamilien von Microsoft Office und Adobe Creative Suite (CS4) verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Experimenteller Aufbau

Ausgangspunkt für die Experimente im Rahmen dieser Doktorarbeit war die Entdeckung, dass die Konditionierung mit poly(I:C) endosomale TLRs für ihre Liganden sensibilisiert, während RIG-I und MDA5 in poly(I:C)-konditionierten Zellen auf nachfolgende Stimulation mit ihren Liganden stark vermindert reagieren (Hotz *et al.*, 2015). Diese Reprogrammierung von TLRs und RLRs in entgegengesetzter Weise war neu und in diesem Maße in der Literatur bis dato nicht vorbeschrieben. Die im Folgenden hier vorgestellten Experimente verliefen dabei alle nach einem ähnlichen Muster (Abbildung 2): zunächst erfolgte die Konditionierung mit einem ersten Stimulus für 24 Stunden, gefolgt von mehreren Waschschrritten. Danach wurde mit einem anderen Liganden restimuliert, wobei die Dauer abhängig von der Art der später verwendeten Methodik (ELISA oder Western Blot) zwischen 30 Minuten und maximal 24 Stunden lag.



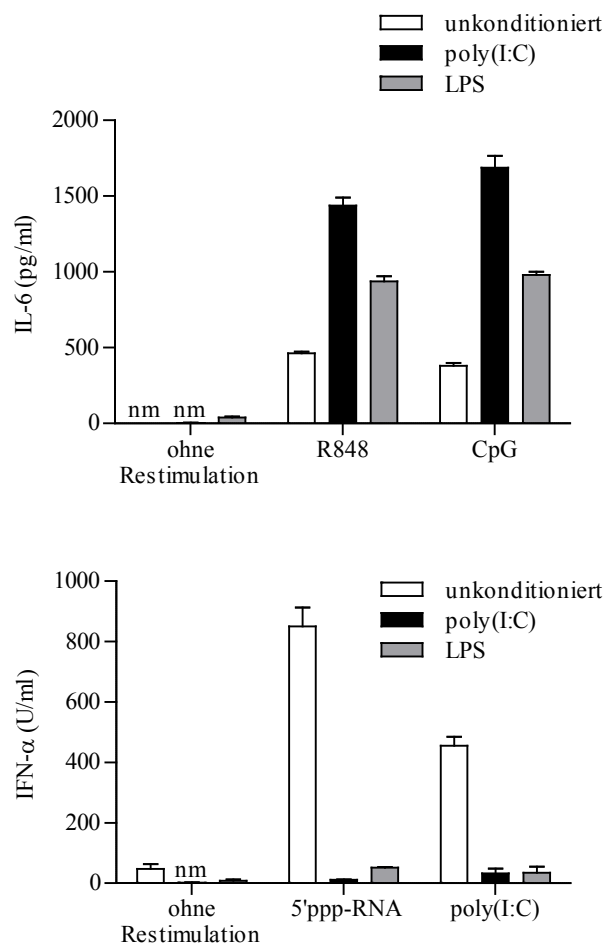
**Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Stimulationsexperimente**

Immunzellen wurden zunächst mit einem ersten PRR-Liganden (poly(I:C), LPS oder IFN-β) stimuliert und für 24 Stunden konditioniert. Daran schlossen sich mehrere Waschschrte an, um Rückstände des ersten Stimulus zu beseitigen und damit Artefakte durch simultane Stimulation zu vermeiden. In einem zweiten Schritt wurden die Immunzellen dann mit einem weiteren PRR-Liganden (R848, CpG, transfiziertem 5'ppp-RNA oder poly(I:C)) restimuliert. Nach einer Inkubationsdauer von erneut 24 Stunden für ELISA wurden die Überstände zur quantitativen Zytokinbestimmung mittels ELISA herangezogen. Im Rahmen der Probenvorbereitung für Western Blot erfolgte die Restimulation für 30, 60 oder 120 Minuten, wonach die Zellen direkt lysiert wurden. + T: transfiziert.

Als optimale Dauer für die Konditionierung von Immunzellen wurde ein 24-stündiges Intervall festgelegt, da hier in Vorversuchen die Reprogrammierungseffekte am deutlichsten ausgeprägt waren (Hotz *et al.*, 2015). Aus vorausgehenden Experimenten anderer Arbeitsgruppenmitglieder war außerdem bekannt, dass sich als *readout* zur Beurteilung der Aktivität endosomaler TLRs unter den proinflammatorischen Zytokinen am besten IL-6 eignet, zur Messung des Ansprechens von RLRs entsprechend am besten die Produktion von IFN-α (Hotz *et al.*, 2015).

### 3.2 Einheitliche Effekte durch Konditionierung mit poly(I:C)- und LPS *in vitro*

Zunächst war es im Rahmen dieser Doktorarbeit Ziel, die Frage zu klären, ob die entgegengesetzte Beeinflussung der Aktivität von TLRs und RLRs ausschließlich durch poly(I:C) zu erreichen ist oder ob sich durch Konditionierung mit anderen, verwandten PRR-Liganden ähnliche Effekte erzielen lassen. Als geeigneter Kandidat erschien LPS, welches von TLR4 erkannt wird (Poltorak *et al.*, 1998) und sich bei der Auslösung einer suffizienten Immunantwort ebenso wie poly(I:C), wenn auch nicht ausschließlich, des TRIF-abhängigen Signalwegs bedient (Kawai und Akira, 2010). Dies alles zielte daraufhin ab, Hinweise bezüglich einer möglichen Generalisierbarkeit des Phänomens der Reprogrammierung zu erhalten.



**Abbildung 3: Konditionierung mit poly(I:C) und LPS verändert das Ansprechen von PRRs auf ihre Liganden *in vitro***

J774-Zellen ( $4 \times 10^4$  Zellen pro Well in 96-Well-Platten) wurden für 24 Stunden mit poly(I:C) (200  $\mu\text{g/ml}$ ) oder LPS (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) konditioniert. Nach Waschen erfolgte die zweite Stimulation mit R848 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ), CpG (3  $\mu\text{g/ml}$ ), transfiziertem poly(I:C) (2  $\mu\text{g/ml}$ ) oder transfizierter 5'ppp-RNA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Mittels ELISA wurden in den Überständen der für 24 Stunden restimulierten Zellen die Konzentrationen von IL-6 und IFN- $\alpha$  gemessen. Die Daten zeigen die Mittelwerte von Triplets + SEM und sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. nm: nicht messbar.

J774-Zellen, die mit poly(I:C) konditioniert und später mit R848 oder CpG restimuliert wurden, produzierten dreimal so viel IL-6 wie die unkonditionierte Kontrolle. Dagegen reagierten die Makrophagen nach Konditionierung mit poly(I:C) auf transfiziertes 5'ppp-RNA oder poly(I:C) mit einer stark verminderten Ausschüttung von Typ-I-Interferonen (Abbildung 3). Es kam beinahe zu einer vollständigen Blockade der Interferon-Produktion. Beide Effekte entsprachen den ursprünglichen Ergebnissen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Hotz *et al.*, 2015), die durch den dargestellten Versuch erfolgreich bestätigt werden konnten.

Mit LPS als konditionierendem Reiz waren vergleichbare Effekte zu erzielen: nach Inkubation der J774-Makrophagen mit dem TLR4-Liganden reagierten diese auf die sekundären Stimuli R848 und CpG mit einer ebenfalls stark gesteigerten Sekretion von proinflammatorischem IL-6, etwa auf das Doppelte erhöht im Vergleich zur lediglich restimulierten Kontrolle. Auf transfizierte 5'ppp-RNA oder poly(I:C) sprachen sie nur wenig an, messbar an den niedrigen IFN- $\alpha$ -Spiegeln in entsprechenden Stimulationsüberständen, die jedoch minimal über denjenigen der poly(I:C)-konditionierten Proben lagen (Abbildung 3). Die durch Konditionierung mit LPS ausgelösten Effekte deckten sich also mit denen von poly(I:C), wenn auch im Hinblick auf deren Ausprägung mit poly(I:C) insgesamt stärkere Reprogrammierungsergebnisse zu erzielen waren als mit LPS. Dass die stark verminderte IFN- $\alpha$  Antwort nach Konditionierung mit poly(I:C) und LPS keinem toxischen Effekt der beteiligten Stimuli auf die J774-Zellen zuzuschreiben war, wird später in Kapitel 3.3.2 gezeigt werden. Außerdem ist anzumerken, dass sich ebenso in naiven Knochenmarkszellen die Reprogrammierung von Mustererkennungsrezeptoren durch LPS in gleicher Weise induzieren ließ wie durch poly(I:C) (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich im Hinblick auf die Auswirkungen einer Konditionierung mit LPS im Vergleich zu poly(I:C) auf das nachfolgende Ansprechen von endosomalen TLRs und intrazellulären RLRs auf ihre jeweiligen Liganden feststellen, dass die Effekte einander entsprechen. Das wiederum weist auf eine breitere Gültigkeit und Übertragbarkeit des beschriebenen Phänomens der Reprogrammierung von Mustererkennungsrezeptoren hin und lässt einen gemeinsamen Mechanismus vermuten, der hinter der Vermittlung der Effekte steckt.



### 3.3 Abhängigkeiten der Reprogrammierungseffekte

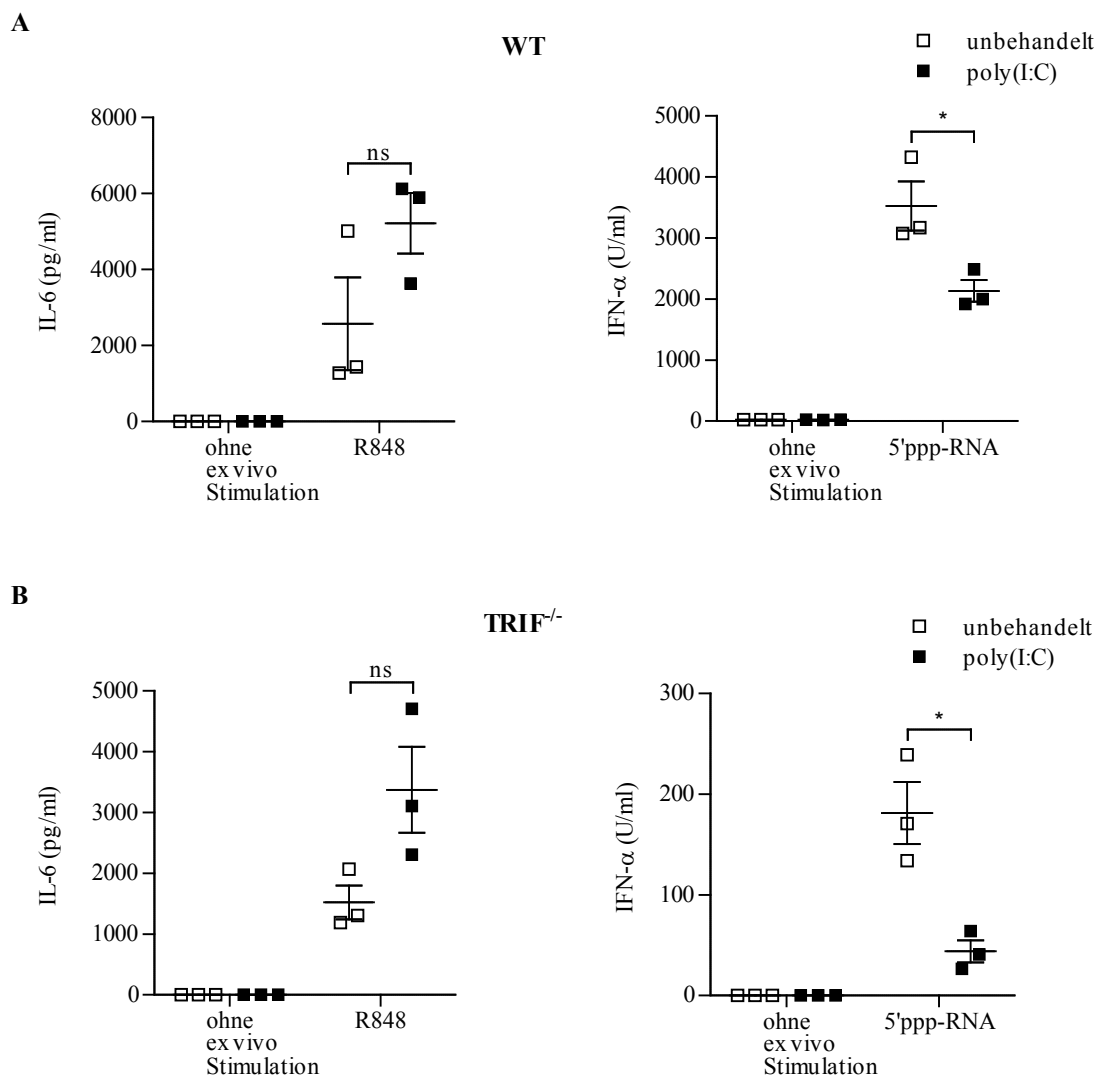
#### 3.3.1 Effekte in Zellen aus *in vivo* mit poly(I:C)-behandelten Wildtyp- und TRIF-*knockout*-Mäusen

In der Literatur werden sowohl TLR3, als auch MDA5 als Rezeptoren für nicht-transfiziertes poly(I:C) beschrieben (Alexopoulou *et al.*, 2001; Gitlin *et al.*, 2006). In der Arbeitsgruppe war unter Einsatz von TRIF- und MDA5-*knockout* DCs bereits gezeigt worden, dass beide Signalwege *in vitro* an der Vermittlung der Reprogrammierungseffekte beteiligt sind (Hotz *et al.*, 2015). Das folgende Experiment der Promotionsarbeit sollte klären, ob die durch poly(I:C)-Konditionierung ausgelösten Effekte auch für Zellen gelten, die nicht unmittelbar in der Zellkultur konditioniert wurden, sondern aus zuvor *in vivo* mit poly(I:C) behandelten Mäusen stammen. Es wurde hier also untersucht, ob Reprogrammierung von Immunzellen auch auf systemischer Ebene stattfindet. Neben den Versuchen mit Wildtyp-Mäusen erfolgten gleichzeitig auch Untersuchungen an TRIF-*knockout*-Mäusen (Hoebe *et al.*, 2003). TRIF dient als Adaptorprotein für TLR3 (Yamamoto *et al.*, 2003a). Dementsprechend ist in den Zellen dieser Tiere die Erkennung von poly(I:C) via TLR3 defekt. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, zu welchem Ausmaß TRIF *in vivo* an der Vermittlung der poly(I:C)-Effekte beteiligt ist.

Knochenmarkszellen aus *in vivo* mit poly(I:C) behandelten Wildtyp-Mäusen wurden nach ihrer Isolation in der Zellkultur, d.h. *ex vivo*, mit R848 oder 5'ppp-RNA stimuliert. Wie Abbildung 4A zeigt, sprachen Zellen aus vorbehandelten Mäusen im Vergleich zu denen aus unbehandelten Tieren verstärkt auf die Stimulation mit dem TLR7-Liganden an, messbar an einer um den Faktor zwei erhöhten IL-6-Produktion. Entsprechend war in Zellen poly(I:C)-behandelter Mäuse das Ansprechen auf 5'ppp-RNA-Stimulation stark reduziert, was sich in einer im Vergleich zu Wildtyp-Knochenmarkszellen deutlichen Reduktion von ausgeschüttetem IFN- $\alpha$  äußerte. Die *in vivo* Konditionierung mit poly(I:C) führt also ebenfalls zur Reprogrammierung von TLRs und RLRs in entgegengesetzter Weise.

Beim Vergleich der Auswirkung der poly(I:C)-Behandlung von TRIF-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen auf das nachfolgende Ansprechen von TLRs und RLRs auf ihre Liganden ließ sich für beide Stämme verhältnismäßig kein Unterschied erkennen (Abbildung 4A und B). Sie zeigten sich beide sensibilisiert für endosomale TLRs-Liganden bei gleichzeitig verminderter Empfindlichkeit von RLRs für ihre entsprechenden Liganden in den poly(I:C)-behandelten Gruppen. Proinflammatorisches IL-6 wurde auch aus Zellen poly(I:C)-behandelter Mäuse, die einen Defekt im TRIF-Protein trugen, nach TLR7-Stimulation verstärkt sezerniert. Entsprechend war in diesen Zellen auch die Produktion von IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit 5'ppp-

RNA sehr stark eingeschränkt. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die in Wildtyp-Zellen gemessenen  $\text{INF-}\alpha$ -Konzentrationen in der unbehandelten und auch poly(I:C)-behandelten Gruppe etwa 10-fach höher lagen als in den TRIF-*knockout*-Zellen. Wichtiger als die absoluten Werte ist für den Vergleich jedoch das Verhältnis der Werte aus der poly(I:C)-behandelten versus unbehandelten Gruppe. Dieses Verhältnis im Ansprechen von RLRs auf ihre Liganden mit und ohne Vorbehandlung war in beiden Stämmen vergleichbar. Daraus ergibt sich die logische Schlussfolgerung, dass TRIF an der Vermittlung der poly(I:C)-Effekte *in vivo* nicht entscheidend beteiligt zu sein scheint.



**Abbildung 4: Reprogrammierung von Immunzellen durch poly(I:C) ist *in vivo* unabhängig von TRIF**

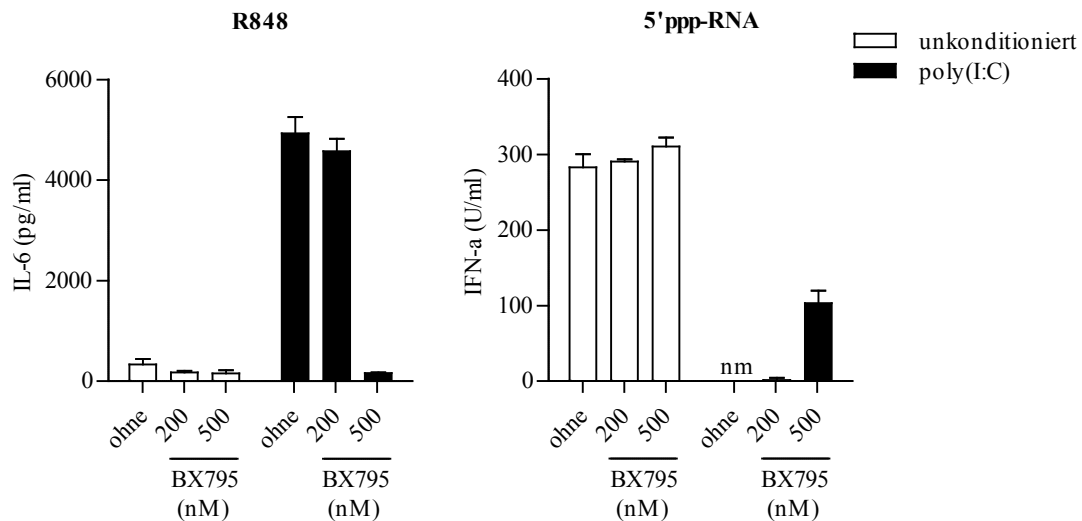
C57BL/6 Wildtyp- (A) und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse (B) wurden mit jeweils 125  $\mu\text{g}$  poly(I:C) subkutan injiziert oder unbehandelt gelassen (jeweils  $n=3$ ). Nach der 24-stündigen *in vivo*-Behandlung mit poly(I:C) erfolgte die Isolation von Knochenmarkszellen, die in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und anschließend *ex vivo* mit R848 (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder transfizierter 5'ppp-RNA (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert wurden. IL-6 und IFN- $\alpha$  wurden in den Überständen mittels ELISA quantifiziert. Gezeigt sind die Ergebnisse der einzelnen Mäuse als Mittelwerte + SEM in der jeweiligen Dreiergruppe. Die Statistik bezieht sich auf Unterschiede zwischen un- und poly(I:C)-behandelten Mäusen. \*:  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant.

Somit ist aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse von *in vitro* sequentiell stimulierten (vgl. Kapitel 3.2) und *in vivo* behandelten-*ex vivo* stimulierten Zellen davon auszugehen, dass Reprogrammierung auf systemischer Ebene abläuft und damit ein oder mehrere lösliche Faktoren für die Vermittlung der Effekte verantwortlich sein müssen. Dabei scheint TRIF *in vivo* nicht entscheidend an der Vermittlung der poly(I:C)-Effekte beteiligt zu sein. Daher lag der Verdacht nahe, dass weniger TLR3 und der TRIF-abhängige Signalweg, sondern stattdessen MDA5 und der MAVS-abhängige Signalwege die Reprogrammierung *in vivo* auslösen. Dies konnte schließlich auch mit entsprechenden Daten durch einen anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe bestätigt werden (Hotz *et al.*, 2015). Gleichzeitig ergaben weitere Untersuchungen aber auch, dass *in vitro* vermutlich sowohl der TRIF- als auch der MAVS-abhängige Signalweg an der Vermittlung der Reprogrammierung beteiligt sind (Hotz *et al.*, 2015).

### 3.3.2 Abhängigkeit der Effekte von TBK1/IKK $\epsilon$ *in vitro*

Beim Vergleich der Signalwege von TLR3 und MDA5 fällt auf, dass diese über eine gemeinsame Endstrecke verfügen: durch TRAF3 wird in beiden Fällen die nachgelagerte Kinase TBK1/IKK $\epsilon$  aktiviert (Pandey *et al.*, 2015). Deshalb war es wichtig in einem nächsten Schritt zu klären, welche Rolle dieser Enzymkomplex im Rahmen der poly(I:C)-Konditionierung spielt. Um den Signalweg von poly(I:C) eben auf dieser Ebene zu blockieren, setzten wir den Inhibitor BX795 (InvivoGen, San Diego, USA) ein. Dieser beeinträchtigt die katalytische Aktivität von TBK1/IKK $\epsilon$ , blockiert damit die Phosphorylierung von IRF3 und verhindert letztlich die Produktion von IFN- $\beta$  (Clark *et al.*, 2009).

Für diese Untersuchungen wurden J774-Zellen zunächst für 30 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert, bevor sich dann in unveränderter Weise die Konditionierung und nachfolgend die Restimulation anschlossen (vgl. Kapitel 3.2). Bei Betrachtung der in Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse lassen sich in den Bedingungen ohne Inhibitor sofort die charakteristischen Effekte der poly(I:C)-Konditionierung erkennen: das Ansprechen von TLRs auf ihre Liganden ist verbessert, das von RLRs reduziert. Dagegen kommt es in zuvor dem Inhibitor ausgesetzten Zellen zu einer Aufhebung der poly(I:C)-induzierten Reprogrammierungseffekte. Die Reversion der Effekte ist dabei abhängig von der Konzentration des Inhibitors und wird erst ab 500 nM erreicht. Dieser Wert lag im Bereich der vom Hersteller empfohlenen Dosierung (10 nM bis 1  $\mu$ M) und wurde in weiteren Versuchen als effektive Dosis bestätigt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5: Inhibition von TBK1/IKK $\epsilon$  hebt die Reprogrammierungseffekte von poly(I:C) und LPS *in vitro* auf**

J774-Zellen ( $4 \times 10^4$  Zellen pro Well in 96-Well-Platten) wurden zunächst für 30 Minuten mit dem TBK1/IKK $\epsilon$ -Inhibitor BX795 (200 nM oder 500 nM) inkubiert. Anschließend erfolgte die 24-stündige Konditionierung mit poly(I:C) (200 µg/ml) unter Einfluss des Inhibitors. Die Zellen wurden dabei zwischen den beiden Schritten nicht gewaschen. Nach Ablauf der 24 Stunden und mehreren Waschstufen wurden die J774-Zellen mit R848 (0,1 µg/ml) oder transkribierter 5'ppp-RNA (1 µg/ml) restimuliert. 24 Stunden später erfolgte die Abnahme von Überständen und die Messung der Konzentrationen von IL-6 und IFN- $\alpha$  mittels ELISA. Die Daten zeigen die Mittelwerte von Triplets + SEM und sind repräsentativ für insgesamt zwei unabhängige Versuche.

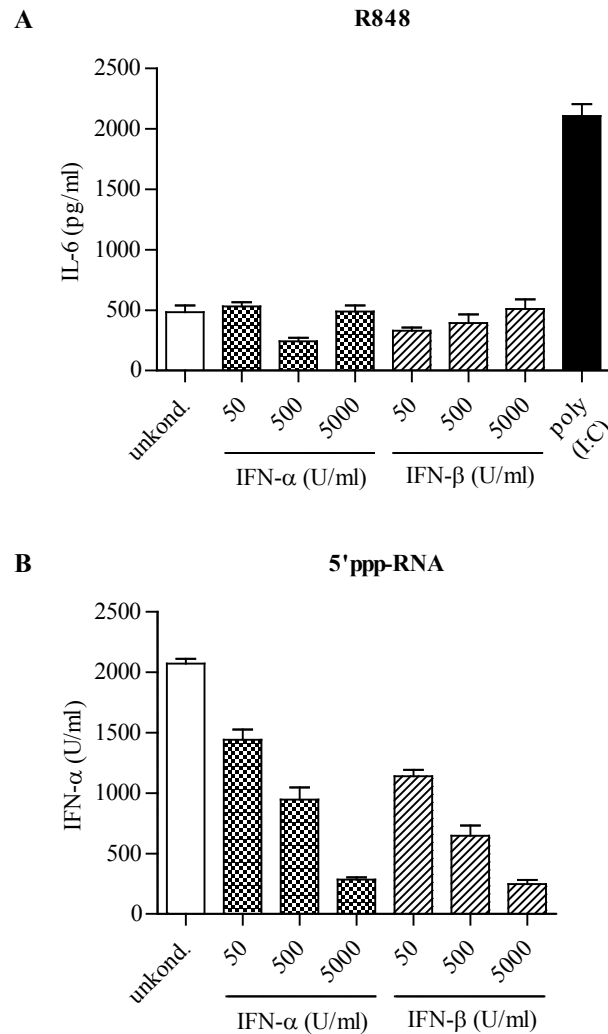
Der Einsatz des Inhibitors bewirkte also einerseits die Aufhebung der TLR7-Sensitivierung, erkennbar an dem fehlenden Anstieg der IL-6-Produktion trotz Konditionierung mit poly(I:C). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass BX795 selbst keinen relevanten Einfluss auf die IL-6 Produktion von Immunzellen hat (Daten nicht dargestellt). Andererseits reagierten auch RLRs wieder verstärkt auf die Restimulation mit 5'ppp-RNA. Es kam zur partiellen Aufhebung der IFN- $\alpha$ -Blockade, gleich hohe Werte für IFN- $\alpha$  wie in der unbedingten Kontrolle wurden jedoch nicht erreicht. Die Ursache dafür könnte darin liegen, dass sich der Inhibitor aufgrund seiner intrazellulären Bindung durch Waschen nicht vollständig von den Zellen entfernen ließ und es dadurch zu einer Abschwächung des RIG-I-Signals kam, da TBK1/IKK $\epsilon$  auch Bestandteil dieses Signalwegs ist (Paz *et al.*, 2006). Außerdem beweist der Anstieg der IFN- $\alpha$  Produktion unter Inhibitoreinsatz zum einen, dass BX795 in den gewählten Konzentrationen keine toxischen Effekte auf J774-Zellen ausübt, zum anderen aber auch, dass das standardmäßig in einer Konzentration von 200 µg/ml verwendete poly(I:C) die Zellen nicht schädigt. Ansonsten würde es nach der Konditionierung entsprechend nicht zu einem Anstieg der IFN- $\alpha$  Produktion kommen. Auch für die Konditionierung mit LPS ließ sich gleichermaßen eine Reversibilität der Reprogrammierungseffekte durch den Einsatz des Inhibitors BX795 nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Es kommt also durch Inhibition von TBK1/IKK $\epsilon$  zu einer Reversion der durch Konditionierung mit poly(I:C) induzierten Effekte, was darauf hinweist, dass dieser Enzymkomplex essentiell an der Vermittlung der Reprogrammierung beteiligt ist.

### 3.3.3 Bedeutung von Typ-I-Interferonen für die Vermittlung der poly(I:C)-Effekte

Die Aktivierung des Enzymkomplex TBK1/IKK $\epsilon$  ist also wie oben gezeigt essentiell für die Vermittlung der Reprogrammierung von Mustererkennungsrezeptoren. Die Aufgabe dieser Kinase besteht unmittelbar in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 (Paz *et al.*, 2006), die nach Dimerisierung und Translokation in den Nukleus Typ-I-Interferone induzieren (Kawasaki *et al.*, 2011). Damit lag der Gedanke nahe, dass Interferone als lösliche Faktoren die gesuchten Mediatoren der durch poly(I:C) ausgelösten Reprogrammierungseffekte darstellen. Auch in der Literatur wurden sie bereits mit einer Bedeutung für synergistische Effekte zwischen verschiedenen Mustererkennungsrezeptoren in Zusammenhang gebracht (Gautier *et al.*, 2005; Krummen *et al.*, 2010), wobei diese Rolle in anderen Berichten nicht bestätigt werden konnte (Bagchi *et al.*, 2007). Im nächsten Experiment wurde deshalb das zur Konditionierung eingesetzte poly(I:C) durch IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$  ersetzt. Es galt zu überprüfen, ob auch Interferone in der Lage sind, die Reprogrammierung von endosomalen TLRs und intrazellulären RLRs in entgegengesetzter Weise zu induzieren.

Für die Konditionierung wurde rekombinantes IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  in unterschiedlichen Konzentrationen (50 bis 5000 U/ml) verwendet. Auf die Restimulation mit R848 reagierten die konditionierten J774-Zellen nicht mit einer gesteigerten IL-6-Produktion als Ausdruck einer TLR7-Sensitivierung. Vielmehr lagen die IL-6-Spiegel in den Überständen IFN-konditionierter Makrophagen für alle getesteten Konzentrationen im Bereich der unkonditionierten Kontrolle (Abbildung 6A). In der Kontrollkondition mit poly(I:C) war dagegen entsprechend den Reprogrammierungseffekten ein verbessertes Ansprechen auf die R848-Stimulation zu sehen. Im Bezug auf die Sensitivierung endosomaler TLRs ließen sich durch den isolierten Einsatz rekombinanter Typ-I-Interferone also in diesem Versuch keine vergleichbaren Effekte erzielen wie durch Konditionierung mit poly(I:C).



**Abbildung 6: Typ-I-Interferone vermitteln den IFN- $\alpha$ -Block *in vitro***

J774-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 96-Well-Platten) wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN- $\alpha$  (50 - 5000 IU/ml) oder IFN- $\beta$  (50 - 5000 IU/ml) oder den Kontrollen stimuliert. Die gewaschenen Zellen wurden erneut stimuliert, diesmal mit R848 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) für IL-6-ELISA oder transfizierter 5'ppp-RNA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) für IFN- $\alpha$ -ELISA. Gezeigt sind die Mittelwerte von Triplets + SEM. Die Daten sind repräsentativ für insgesamt zwei unabhängige Experimente. unkond.: unconditioniert, d.h. ohne Konditionierung.

Dagegen ist schon auf den ersten Blick ein deutlicher Effekt der Konditionierung mit Interferonen auf die Empfindlichkeit für 5'ppp-RNA erkennbar: im Vergleich zur unconditionierten Kontrolle verringerte die Stimulation mit beiden Interferonen das Ansprechen von RIG-I für seinen Liganden, messbar an der reduzierten IFN- $\alpha$ -Produktion (Abbildung 6B). Dieser Effekt war eindeutig dosisabhängig: mit zunehmender Konzentration von rekombinatem IFN- $\alpha$  oder - $\beta$  nahm die Antwort auf die stets gleiche Stimulation mit 5'ppp-RNA deutlich ab. Die Ergebnisse zeigen eine für alle getesteten Konzentrationen leicht stärkere Wirkung für IFN- $\beta$  als konditionierendem Reiz als für IFN- $\alpha$ . Die in diesem Versuch beobachtete Reduktion des Ansprechens von RLRs durch Interferone entspricht genau dem Effekt von poly(I:C) auf die nachfolgende IFN- $\alpha$ -Produktion.

Mit dem Wissen aus Ergebnissen anderer Arbeitsgruppenmitglieder, dass sich durch Einsatz IFN- $\beta$  neutralisierender Antikörper die Effekte eines durch poly(I:C) induzierten, veränderten Ansprechens von TLRs und RLRs aufheben lassen (Hotz *et al.*, 2015), lässt sich aus diesen Ergebnissen zusammenfassend schließen, dass Typ-I-Interferone für die Vermittlung der Reprogrammierung essentiell, wenn auch nicht vollständig ausreichend sind, wobei letzteres besonders für die TLR-Sensitivierung gilt.

## 3.4 Modulation von Signalwegen auf Proteinebene

### 3.4.1 Aktivierungsstatus von MAPKs und NF $\kappa$ B

Im dritten Teil dieser Promotionsarbeit galt es die molekularen Mechanismen, die den beschriebenen Auswirkungen der Reprogrammierung durch poly(I:C) zugrunde liegen, näher zu charakterisieren. Im Bezug auf endosomale TLRs war das ein verbessertes Ansprechen für ihre Liganden im Sinne einer Sensitivierung, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde (vgl. Abbildung 3). In den nachfolgenden Versuchen wurde zur Konditionierung neben poly(I:C) auch jeweils IFN- $\beta$  verwendet, von dem in Vorarbeiten deutlich gezeigt worden war, dass es von essentieller Bedeutung für die Vermittlung der Reprogrammierungseffekte ist (vgl. Kapitel 3.3.3). Man wollte dadurch erkennen, ob und in welchen Bestandteilen der Signalwege auf Proteinebene Unterschiede zwischen diesen beiden, die Reprogrammierung auslösenden Stimuli auftreten, was wiederum Hinweise darauf geben könnte, welche weiteren Faktoren für die Vermittlung des Reprogrammierungsphänomens außerdem eine Rolle spielen.

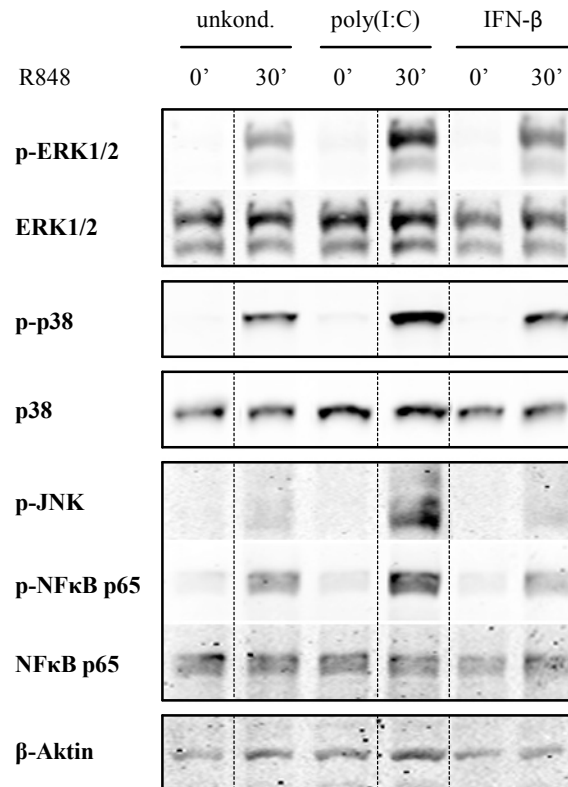
Im folgenden Experiment wurden DCs, die zuvor gemäß dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenem Protokoll generiert wurden, zunächst mit poly(I:C) oder IFN- $\beta$  konditioniert. Anschließend erfolgte im Unterschied zu den Stimulationsexperimenten für ELISA eine kurze Restimulation mit R848 (nur für 30 Minuten), um den Aktivierungsstatus der MAPKs ERK1/2, p38 und JNK sowie NF $\kappa$ B bzw. genauer seiner p65-Untereinheit zu analysieren. Dies geschah nach entsprechender Aufbereitung der Proben für Western Blot durch Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der entsprechenden Enzyme und Proteine mittels phosphospezifischer Antikörper (vgl. Kapitel 2.1.4 und 2.5.12.5). Ziel war es zunächst zu zeigen, welchen Einfluss die Konditionierung mit poly(I:C) oder IFN- $\beta$  auf die ganz am Ende der intrazellulären Signalwege gelegenen Transkriptionsfaktoren bzw. ihre Kinasen ausübt und inwiefern sich diese Veränderungen auf Proteinebene mit den Ergebnissen aus den ELISA-Experimenten decken. Darüber hinaus galt es zu klären, ob durch Konditionierung die MAPKs und NF $\kappa$ B in gleicher Weise induziert werden oder ob durch besonders deutliche Induktion eines oder

mehrerer dieser Faktoren Rückschlüsse auf eine entsprechend stärkere Rolle dieses Bestandteils für die Reprogrammierung möglich sind.

Sämtliche MAPKs poly(I:C)-konditionierter DCs waren nach TLR7-Stimulation stärker phosphoryliert als diejenigen in Proben unkonditionierter Zellen (Abbildung 7A). Bei Vergleich der Kontrollen fällt auf, dass die Menge an Protein in den sechs verschiedenen Proben weitestgehend einander entspricht, höchstens in den in beiden IFN- $\beta$ -konditionierten Proben leicht vermindert erscheint. Für NF $\kappa$ B (Abbildung 7B) deckten sich die Ergebnisse mit denen der MAPKs. Auch hier war die p65-Untereinheit in poly(I:C)-konditionierten Zellen nach Stimulaltung mit R848 deutlich stärker phosphoryliert als die Kontrolle. Vergleicht man diese vier Proteine nun in ihrem durch poly(I:C)-Konditionierung induziertem Aktivierungszustand lassen sich nur schwer Aussagen darüber machen, ob durch Reprogrammierung ein Protein stärker beeinflusst wird als die anderen. Lediglich bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Phosphorylierung von JNK durch poly(I:C)-Konditionierung stärker zunimmt als die von ERK1/2 oder p38, was als Hinweis auf dessen besondere Rolle für die Sensitivierung von TLRs durch Reprogrammierung gewertet werden kann, wobei anzumerken ist, dass verschiedene Proteine im Western Blot nur schwer miteinander verglichen werden können.

Weiter ist auffällig, dass sowohl die MAPKs, als auch NF $\kappa$ B der mit IFN- $\beta$  konditionierten DCs nach Stimulation mit R848 weniger stark aktiviert sind als bei Konditionierung mit poly(I:C). Außer für ERK1/2 lag die Phosphorylierung etwa auf dem Niveau der unkonditionierten Kontrolle. Das passt wiederum sehr gut zu den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.3, wonach rekombinante Interferone allein eine Sensitivierung endosomaler TLRs nicht auslösen können. Damit lässt sich auch auf Proteinebene der reprogrammierende Effekt der poly(I:C)-Konditionierung auf endosomale TLRs durch isoliert applizierte Interferone nicht vollständig phänokopieren. Interessant war dabei auch, dass sich gerade die Kinase JNK, die durch poly(I:C)-Konditionierung besonders deutlich induziert wurde, nach Vorbehandlung mit IFN- $\beta$  und Restimulation mit R848 nicht erkennbar stärker phosphoryliert zeigte als die unkonditionierte Kontrolle.





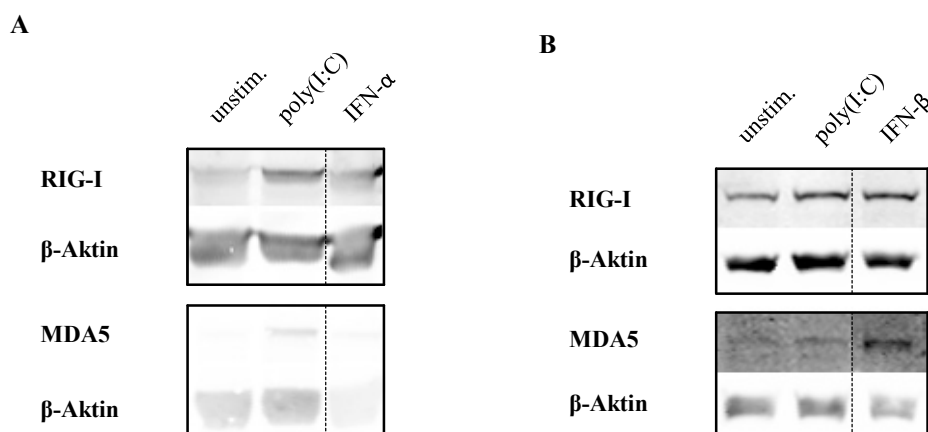
**Abbildung 7: Poly(I:C) verstärkt die Phosphorylierung von MAPKs und NF $\kappa$ B in DCs**

DCs aus C57BL/6 Wildtyp Mäusen ( $n=2$ ) wurden zu  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Konditionierung mit poly(I:C) (200  $\mu$ g/ml) und IFN- $\beta$  (500 IU/ml) erfolgte 21 Stunden in RPMI -Standard-Medium. Anschließend wurden die Zellen dreimal gründlich mit PBS gewaschen und für 3 h in OptiMEM ohne weitere Zusätze inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die zweite Stimulation der Zellen mit R848 (0,1  $\mu$ g/ml) für 30 Minuten ebenfalls in OptiMEM. Nach der Lyse der Proben und anschließendem Western Blot dienten die phosphospezifischen Antikörper anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK und anti-phospho-p65 der Analyse des Aktivierungsstatus von MAPK und NF $\kappa$ B. Die entsprechenden nicht phosphospezifischen Antikörper und anti- $\beta$ -Aktin kamen als Kontrollen zum Einsatz. Ein Rahmen um mehrere Blots zeigt an, dass die Ergebnisse von ein und derselben Membran stammen. Grundsätzlich gehen alle gezeigten Banden auf dieselbe Probenvorbereitung zurück. Vertikale, gestrichelte Linien geben die Stellen an, an denen im ursprüngliche Western Blot nicht unmittelbar nebeneinander zu liegen kommende Banden zur besseren Darstellung aneinander gefügt wurden. Die gezeigten Daten entsprechen weitestgehend den Ergebnissen eines identischen Versuchs mit J774-Makrophagen und sind somit repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. p-: phospho-; unkond.: unconditioniert.

Somit bestätigen diese Daten, dass die Reprogrammierung eine Wirkung auf die MAPKs und NF $\kappa$ B im Sinne einer verstärkten Aktivierung hat. Dabei könnten die Ergebnisse mechanistisch auf eine besondere Rolle von JNK für die TLR-Sensitivierung hinweisen. Dieser Versuch wurde in identischer Weise auch mit J774-Zellen durchgeführt, wo für IFN- $\beta$  als konditionierenden Reiz im Vergleich zu poly(I:C) ebenfalls nur eine abgeschwächte Aktivierung von MAPKs und NF $\kappa$ B nachzuweisen war (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.4.2 Expression von RIG-I-like-Rezeptoren

Die Auswirkung der Konditionierung mit poly(I:C) auf intrazelluläre RLRs war in den ELISA-Experimenten ein reduziertes Ansprechen für ihre Liganden, messbar an einer Blockade der IFN- $\alpha$ -Sekretion (vgl. Abbildung 3). Die Vermittlung dieser verringerten Empfindlichkeit ist grundsätzlich auf allen Ebenen des durch die RLRs-Liganden aktivierten Signalweges denkbar, die Rezeptorebene eingeschlossen. Somit war auch ein Mechanismus vorstellbar, der zu einer verringerten Rezeptorexpression bzw. zur Degradation von RLRs-Protein führt und dadurch die eingeschränkte Antwort auf weitere Stimulation erklärt. In der Literatur ist jedoch eine Induktion der Expression von RIG-I und MDA5 durch Typ-I-Interferone beschrieben (Kang *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2004). Mit dem vorliegenden Experiment sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Stimulation mit poly(I:C) verglichen zu IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$  auf den Expressionsstatus von intrazellulärer RLRs hat.



**Abbildung 8: Poly(I:C) induziert die Expression intrazellulärer RLRs in J774-Zellen und DCs**

(A) J774-Zellen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Well) oder (B) DCs ( $0,5 \times 10^6$ ) wurden in 24-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden mit poly(I:C) (200  $\mu\text{g/ml}$ ) oder (A) IFN- $\alpha$  ( $10^3$  IU/ml) bzw. (B) IFN- $\beta$  (500 IU/ml) stimuliert und danach lysiert. Die Lysate wurden anschließend Western Blot unterzogen und mit den Antikörpern anti-RIG-I und anti-MDA5 zur Analyse der Rezeptorproteine und anti- $\beta$ -Aktin als allgemeine Ladekontrolle inkubiert. Vertikale, gestrichelte Linien verweisen auf ein Aneinanderfügen von auf dem ursprünglichen Blot nicht benachbarten Banden zur besseren Darstellung. Durch Umrahmung werden von derselben Membran stammende Ergebnisse kenntlich gemacht. unstim.: unstimuliert, d.h. ohne jegliche Stimulation.

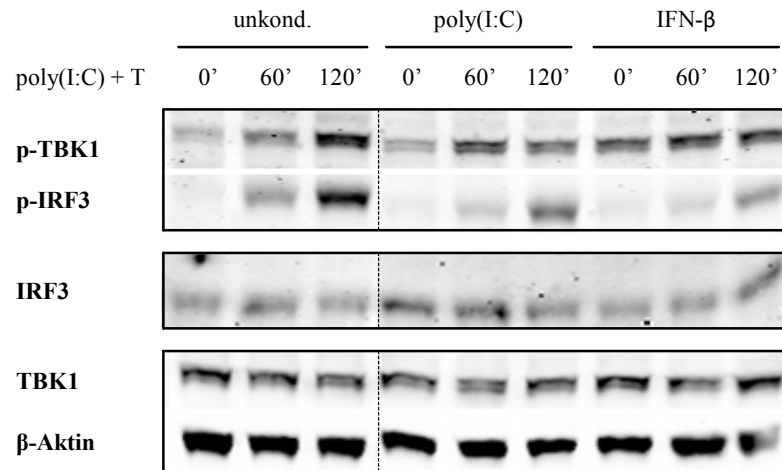
Sowohl in J774-Zellen (Abbildung 8A) als auch in DCs (Abbildung 8B) waren nach Stimulation mit poly(I:C) erhöhte Mengen an RIG-I- und MDA5-Protein nachweisbar. Wie in der Literatur vorbeschrieben, induzierte auch die Stimulation mit Typ-I-Interferonen die Proteinexpression von RLRs, besonders deutlich für IFN- $\beta$  in DCs. Daher ist auszuschließen, dass die Rezeptorexpression für die reduzierte RLRs-Antwort nach Konditionierung mit poly(I:C) verantwortlich ist. Aufgrund der verstärkten Expression von RLRs auf Rezeptorebene bei gleichzeitig insgesamt eingeschränkter Immunantwort war naheliegend, dass der

entsprechende Mechanismus weiter *downstream* in den Signalwegen von RIG-I und MDA5 zu suchen ist.

### 3.4.3 Aktivierungsstatus von TBK1/IKK $\epsilon$ und IRF3

Nachdem erfolgreich ausgeschlossen werden konnte, dass die RLR-Blockade nach poly(I:C)-Konditionierung durch Veränderungen auf Rezeptorebene vermittelt wird, rückten die nachgelagerten Ebenen des MAVS-abhängigen Signalwegs in den Fokus der Untersuchungen. Dabei stellten sich ähnliche Fragen wie zuvor schon bei der Analysierung der TLR-Sensitivierung: Sind die Veränderungen an den Signalproteinen mit den ELISA-Ergebnissen vereinbar? Inwieweit stimmen die durch Konditionierung mit poly(I:C) und IFN- $\beta$  induzierten Effekte auf molekularer Ebene überein oder wo lassen sich Unterschiede in den beteiligten Mechanismen erkennen? Auf welcher Ebene findet die entscheidende Veränderung an den Signalwegen statt, die letztlich für die Reprogrammierung verantwortlich ist? Dazu erfolgte die Analyse des Aktivierungsstatus von TBK1/IKK $\epsilon$  (im Folgenden nur noch TBK1) und IRF3 durch Stimulation mit transfiziertem poly(I:C) als MDA5-Liganden mit und ohne vorausgehender Konditionierung.

Die Stimulation mit transfiziertem poly(I:C) löste in nicht vorkonditionierten J774-Zellen für beide untersuchten Zeitpunkte (60 und 120 Minuten) eine deutliche Aktivierung von TBK1 und IRF3 aus, erkennbar an dem verstärkten Phosphorylierungsgrad (Abbildung 9). Nach Konditionierung mit poly(I:C) wurde TBK1 durch 60 minütige MDA5-Stimulation stärker aktiviert als die unkonditionierte Kontrolle, gleiches galt für IFN- $\beta$ . Bei Stimulation für 120 Minuten war keine verstärkte Phosphorylierung von TBK1 in den konditionierten Proben verglichen mit der Kontrolle zu beobachten. Anzumerken ist auch, dass die IFN- $\beta$ -Konditionierung den Phosphorylierungsgrad von TBK1 auch unabhängig von weiterer RLRs-Stimulation deutlich zu steigern scheint. Die Ergebnisse zum Aktivierungsstatus von IRF3 unterschieden sich davon deutlich: im Vergleich zur nicht konditionierten Kontrolle führte die Konditionierung mit poly(I:C) und IFN- $\beta$  in J774-Zellen gleichermaßen zu einer reduzierten Phosphorylierung von IRF3 bei Stimulation mit transfiziertem poly(I:C). Dies war unabhängig von der Dauer der MDA5-Stimulation. Beim Vergleich der Ladekontrollen (vgl. Blots mit den Antikörpern anti-IRF3, anti-TBK1 und anti- $\beta$ -Aktin in Abbildung 9) waren für alle Bedingungen in etwa gleiche Proteinkonzentrationen nachweisbar.



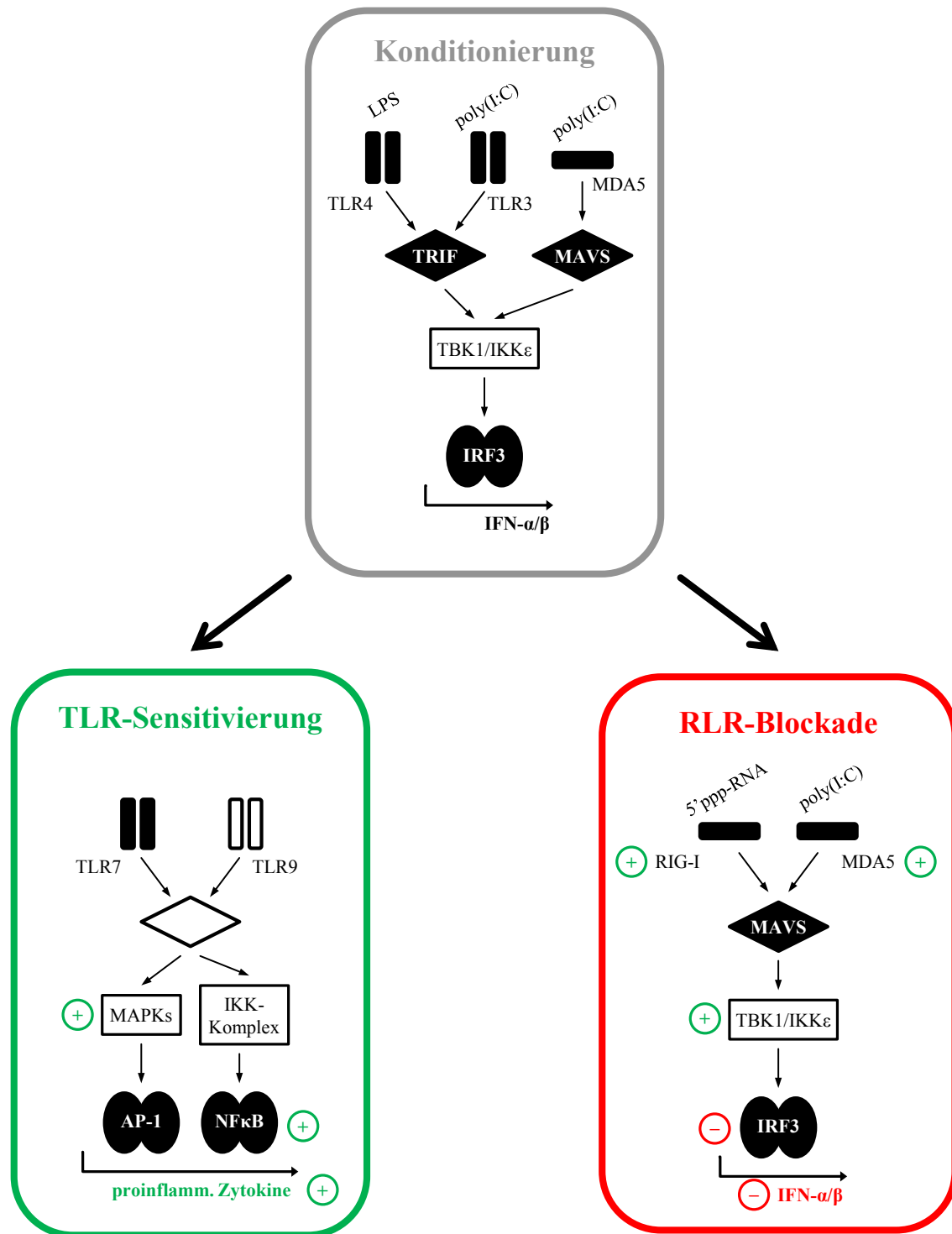
**Abbildung 9: Poly(I:C) vermindert die Phosphorylierung von IRF3 nach MDA5-Stimulation in J774-Zellen**

J774-Zellen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte) wurden nach der Aussaat für 24 Stunden mit den Stimuli poly(I:C) (200  $\mu\text{g/ml}$ ) oder IFN- $\beta$  (500 IU/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Restimulation mit transfiziertem poly(I:C) (4  $\mu\text{g/ml}$ ) für 60 oder 120 Minuten. Die Proben wurden zu Western Blot herangezogen. Die Proteinanalyse gelang mit folgenden Antikörpern: anti-phospho-TBK1/IKK $\epsilon$  und anti-phospho-IRF3 zur Detektion des Aktivierungsstatus, anti-TBK1/IKK $\epsilon$  und anti-IRF3 als zugehörige Kontrollen und anti- $\beta$ -Aktin als Standard-Ladekontrolle. Alle Proben stammen aus derselben Probenvorbereitung, wobei Rahmen um mehrere Blots deren gemeinsamen Ursprung von einer Membran angeben. Gestrichelte, vertikale Linien bilden Stellen ab, an denen verschiedene Banden zur besseren Übersicht aneinander gefügt wurden. T: Transfektionsreagenz Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000; unkond.: unkonditioniert.

Der gerade für 60-minütige Stimulation deutlich in entgegengesetzter Richtung veränderte Phosphorylierungsgrad von TBK1 und IRF3 nach poly(I:C)-Konditionierung spricht für eine Vermittlung des Reprogrammierungseffekts auf der Ebene dieser beiden Signalproteine. Diese folgen in der intrazellulären Signaltransduktionskaskade unmittelbar aufeinander (Fitzgerald *et al.*, 2003). TBK1 ist die Kinase von IRF3, welcher als Transkriptionsfaktor unmittelbar die Produktion von IFN- $\alpha/\beta$  im Nukleus induziert (Loo und Gale, 2011; Paz *et al.*, 2006). Daraus ist zu schließen, dass sich ein wesentlich an der Reprogrammierung beteiligter Mechanismus auf dieser Ebene des Signalweges abspielt und letztlich zur verminderten Aktivierung von IRF3 führt. Grundsätzlich kann die einstündige Stimulation von RLRs für ausreichend zur Induktion einer Phosphorylierung und damit Aktivierung entsprechender Signalproteine erachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Tatsache, dass sich Bestandteile der Signalwege von intrazellulären RLRs durch Konditionierung mit IFN- $\beta$  in gleicher Weise beeinflussen lassen wie mit poly(I:C), beweist erneut, dass Interferone essentiell an der Vermittlung der reprogrammierenden Effekte auf RLRs, aber auch endosomale TLRs (vgl. Kapitel 3.3.3) beteiligt sind.

### 3.4.4 Übersicht über die Veränderungen auf Proteinebene

Zusammenfassend ergaben die hier vorgestellten Experimente zu den Auswirkungen der Konditionierung auf der Ebene der Signalproteine folgende Hinweise auf die beteiligten molekularen Mechanismen: MAPKs und NF $\kappa$ B sind beide an der Vermittlung der TLR-Sensitivierung beteiligt, wobei sich JNK besonders deutlich aktiviert darstellt. Durch Stimulation mit poly(I:C) wird die Expression der RLRs RIG-I und MDA5 induziert, verringerte Rezeptorexpression als Mechanismus für das reduzierte Ansprechen von RLRs scheidet damit als Mechanismus aus. Die Konditionierung führt zu einer verstärkten Aktivierung von TBK1/IKK $\epsilon$  bei gleichzeitig reduziertem Phosphorylierungsgrad von IRF3, was für eine entscheidende Beteiligung dieser Ebene des Signalwegs an der Vermittlung des Reprogrammierungseffekts spricht. Die folgende Übersicht (Abbildung 10) fasst die Effekte der Konditionierung auf verschiedene Bestandteile der Signalwege von endosomalen TLRs und intrazellulären RLRs systematisch und grafisch vereinfacht zusammen.



**Abbildung 10: Grafische Zusammenfassung der Effekte der Reprogrammierung**

Dargestellt sind die verschiedenen, an der Reprogrammierung durch poly(I:C) und LPS beteiligten Mustererkennungsrezeptoren mit ihren jeweiligen Liganden und Signalwegen (überblicksartig). Mittig und grau unterlegt die in der Induktion von Typ-I-Interferonen resultierende Konditionierung mit LPS bzw. poly(I:C). Links die in der Folge sensibilisierten TLRs (grün unterlegt), rechts die desensibilisierten RLRs (rot unterlegt). Der positive bzw. negative Einfluss der Konditionierung auf die verschiedenen Bestandteile der Signalwege wird durch eingekreiste + (grüne Farbe) oder- (rote Farbe) dargestellt. Der Übersicht halber wurde auf die Darstellung weiterer, für das Verständnis der Reprogrammierung nicht unmittelbar notwendiger Signalwege verzichtet (Rekrutierung von NFκB durch TLR4/3 und RLRs sowie von IRF7 durch TLR7/9 in pDCs und standardmäßig durch alle RLRs).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenspiel von MyD88-ab- und unabhängigen Signalwegen

In dieser Arbeit gelang es zu zeigen, dass sich die Reprogrammierung von TLRs und RLRs neben poly(I:C) auch durch LPS induzieren lässt (vgl. Abbildung 3). Auch die Konditionierung mit transfiziertem poly(I:C) erzielte vergleichbare Effekte, was in Experimenten anderer Arbeitsgruppenmitglieder nachgewiesen wurde (Hotz *et al.*, 2015). Den drei PRR-Liganden poly(I:C), LPS und transfiziertem poly(I:C) ist gemeinsam, dass sie intrazellulär über Signalwege vermittelt werden, die nicht bzw. im Falle von LPS nicht ausschließlich auf MyD88 als Adaptorprotein zurückgreifen (Pandey *et al.*, 2015). Somit lag der Schluss nahe, dass das Phänomen der Reprogrammierung generell durch Konditionierung mit einem MyD88-unabhängigen Stimulus auslösbar ist. Ganz bewusst erfolgt hier die Verwendung des Begriffs MyD88-unabhängig anstelle von TRIF-abhängig, da einerseits Reprogrammierung auch unter Konditionierung mit transfiziertem poly(I:C) auftritt (Hotz *et al.*, 2015), wodurch nachgewiesenermaßen in erster Linie MDA5 stimuliert wird, das auf MAVS und nicht TRIF als Adaptorprotein zurückgreift (Kato *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2005). Andererseits konnte erfolgreich demonstriert werden, dass die Reprogrammierungseffekte auch bei poly(I:C)-Konditionierung von Immunzellen aus TRIF-*knockout*-Mäusen auftreten, und zwar in keinem nennenswerten Unterschied im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (vgl. Abbildung 4). Das war als Hinweis darauf zu interpretieren, dass die Achse TLR3-TRIF im Vergleich zu MDA5-MAVS für die poly(I:C)-Erkennung und damit auch Auslösung der Reprogrammierung eine untergeordnete Rolle spielt. In der Arbeitsgruppe gelang es schließlich auch dies zu zeigen: in Zellen von MDA5-*knockout*-Tieren waren bei poly(I:C)-Konditionierung keine Reprogrammierungseffekte nachweisbar (Hotz *et al.*, 2015).

Die Sensitivierung von TLRs durch Konditionierung mit einem MyD88-unabhängigen Liganden war in der Literatur bereits für verschiedene Kombinationen bekannt: TLR3 und TLR2/5/9 (Bagchi *et al.*, 2007), TLR4 und TLR9 (De Nardo *et al.*, 2009) sowie TLR3 und TLR7 (Suet Ting Tan *et al.*, 2013). In diesen Publikationen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es bei sequentieller Stimulation zu einer durch Reprogrammierung gesteigerten proinflammatorischen Immunantwort kommt, sofern auf die initiale Konditionierung mit einem MyD88-unabhängigen Liganden die Stimulation mit einem MyD88-abhängigem Liganden folgte. Es war auch vorbeschrieben, dass die Konditionierung von TLR3 nachfolgend TLR4 für weitere Stimulation sensibilisiert (Nansen und Randrup Thomsen, 2001). Zur Erklärung postulierten Bagchi und Kollegen folgendes Modell: die Stimulation eines PRR führt in der Folge zu einer Desensibilisierung der proximalen Anteile des entsprechenden Signalweges bei

gleichzeitiger Sensibilisierung der distalen Bestandteile (Bagchi *et al.*, 2007). Da MyD88-abhängige und -unabhängige Liganden zur Induktion proinflammatorischer Immunantworten weitestgehend auf die gleichen Transkriptionsfaktoren, jedoch auf unterschiedliche Adaptorproteine und vorgeschaltete Enzymkomplexe zurückgreifen (Kawai und Akira, 2010), kann durch dieses Modell der Effekt der Reprogrammierung wie in dieser Arbeit beschrieben gut erklärt werden.

Interessanterweise finden sich in der Literatur auch Beispiele, dass Sensitivierung bei Stimulation in umgekehrter Reihenfolge im Bezug auf die Interferon-Produktion auftritt. So verbessert die Konditionierung mit TLR4, 5, 7 oder 9 das nachfolgende Ansprechen von TLR3 und führt zu einer verstärkten Produktion antiviraler Interferone (Broad *et al.*, 2007). Auch für die Kombination aus TLR2- und nachfolgender TLR4-Stimulation gelang es eine Induktion der Typ-I-Interferon-Produktion nachzuweisen (Bagchi *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 2013). Zu beachten ist, dass es bei sequentieller Stimulation von TLR2 und TLR4 im Bezug auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine dagegen zur Entwicklung von Toleranzeffekten kommt, da in diesem Fall beide Rezeptoren vergleichbare MyD88-abhängige Signalwege aktivieren (Dobrovolskaia *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2000).

Auch der Toleranzeffekt auf intrazelluläre RLRs im Rahmen der Reprogrammierung lässt sich durch die Hypothese der wechselweisen Aktivierung MyD88-ab- und -unabhängiger Signalwege gut erklären. In diesem Fall führt die wiederholte Aktivierung MyD88-unabhängiger Signalwege zur Blockade der Typ-I-Interferon-Produktion. Mit MDA5 als hauptverantwortlichem Rezeptor für poly(I:C) (vgl. Abbildung 4), was von einem anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe für *in vivo*-Versuche gezeigt werden konnte (Hotz *et al.*, 2015), liegt bei Restimulation mit einem weiteren RLRs-Liganden ein Beispiel von Homo- bzw. Heterotoleranz vor. Bei Konditionierung mit LPS und späterer Restimulation von RLRs werden unmittelbar *downstream* der jeweiligen Adaptorproteine dieselben Signalwege aktiviert, weshalb es zur Ausbildung von Heterotoleranz kommt. Entsprechende Literaturverweise fehlen an dieser Stelle, wurde doch die Blockade der Typ-I-Interferon-Produktion nach Konditionierung mit einem MyD88-unabhängigen Stimulus von unserer Arbeitsgruppe erstmalig gezeigt.

Insgesamt können diese Erkenntnisse als Hinweis dafür gelten, dass die sequentielle Stimulation dann zum Phänomen der Reprogrammierung führt, wenn eine wechselweise Aktivierung MyD88-ab- und -unabhängiger Signalwege stattfindet, wobei abhängig von der Reihenfolge entweder antivirale oder proinflammatorische Zytokine induziert werden. Reprogrammierung ist somit als allgemein gültiges Phänomen beim Zusammenspiel verschiedener



Mustererkennungssignalwege innerhalb des angeborenen Immunsystems zu verstehen. Dass Reprogrammierung sowohl *in vitro* in verschiedenen APCs, als auch *in vivo* nachweisbar ist (Hotz *et al.*, 2015), muss als weiterer Beleg für die breitere Gültigkeit des Phänomens der Reprogrammierung gelten.

## 4.2 Endogene Interferone als Mediatoren

Der Stimulation von TLR3, TLR4 und MDA5 ist weiter gemeinsam, dass in der Folge die Produktion von Typ-I-Interferonen induziert wird, wobei in allen drei Fällen der Enzymkomplex TBK1/IKK $\epsilon$  dabei eine entscheidende Rolle spielt (Pandey *et al.*, 2015). Durch dessen spezifische Inhibition ließen sich wie in dieser Arbeit gezeigt, die RLRs-Blockade und die TLRs-Sensitivierung aufheben (vgl. Abbildung 5). Daraus ist zu schließen, dass an der Vermittlung der Reprogrammierung maßgeblich Faktoren beteiligt sind, die *downstream* dieser Signalebene zu finden sind. Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass Reprogrammierung gleichermaßen auch auf systemischer Ebene stattfindet (vgl. Abbildung 4). Das deutet darauf hin, dass es sich um lösliche Faktoren handeln muss, die an der Vermittlung der Reprogrammierungseffekte beteiligt sind. Die Kinase TBK1/IKK $\epsilon$  aktiviert direkt, d.h. ohne einen weiteren, zwischengeschalteten Schritt, den Transkriptionsfaktor IRF3, der in der Folge die Typ-I-Interferon-Produktion induziert (Fitzgerald *et al.*, 2003; Hemmi *et al.*, 2004). Somit mussten nach den oben dargestellten Ergebnissen Typ-I-Interferone als potentielle Kandidaten für die Vermittlung der Reprogrammierungseffekte betrachtet werden.

Daher erfolgten entsprechende Versuche mit rekombinantem IFN- $\alpha$  und - $\beta$  als konditionierendem Reiz. Während die RLRs-Blockade nach Stimulation mit IFN- $\alpha$  und - $\beta$  in gleichem Maße zu beobachten war wie für poly(I:C), ließ sich die TLR-Sensitivierung durch Konditionierung mit Interferonen in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisen (vgl. Abbildung 6). Wiederholungsexperimente in der Arbeitsgruppe ergaben zumindest eine abgeschwächte Sensitivierung unter Konditionierung mit Typ-I-Interferonen (Hotz *et al.*, 2015). Zudem zeigten auch die Ergebnisse zum Aktivierungsstatus von MAPKs und NF $\kappa$ B, dass nach Konditionierung mit IFN- $\beta$  die Phosphorylierung deutlich schwächer ausgeprägt war als nach poly(I:C) (vgl. Abbildung 7). Das mag entweder an einer zu langen Konditionierungsphase (hier 24 Stunden) liegen, da in anderen Versuchen bei einer nur achtstündigen Konditionierung durchaus eine Sensitivierung endosomaler TLRs durch IFN- $\beta$  erzielt werden konnte (Hotz *et al.*, 2015). Oder aber bedeuten, dass rekombinante Interferone die Effekte von Stimuli, die die endogene Interferonproduktion induzieren, nicht vollständig phänotypisch kopieren können. Ergänzende, umfangreiche Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit IFN- $\beta$ -neutralisierenden Antikörpern, Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor (IFN $\alpha$ R)-Blockade und IFN $\alpha$ R-*knockout*-DCs konnten

generell die essentielle Rolle von Typ-I-Interferonen für die Reprogrammierung bestätigen (Hotz *et al.*, 2015).

In der Literatur wurde die Bedeutung von Typ-I-Interferonen für die Sensitivierung von Mustererkennungsrezeptor-Signalwegen im Rahmen sequentieller Stimulation bereits früh erkannt (Nansen und Randrup Thomsen, 2001). Erklärungen dafür, wie Interferone die Reprogrammierung bewirken könnten, findet man vor allem in Untersuchungen zu synergistischen Effekten bei simultaner Stimulation. Dabei wurde postuliert, dass endogene Interferone in einer autokrin-parakrinen Feedback-Schleife den TLR-Synergismus auslösen (Gautier *et al.*, 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass endogene Interferone die Produktion proinflammatorischer Zytokine über Interaktion mit dem  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweg positiv beeinflussen (Krummen *et al.*, 2010). Die Ergebnisse bezogen sich dabei auf die synergistische Produktion von IL-12, für andere proinflammatorischen Zytokine wie IL-6 oder TNF- $\alpha$  konnte eine Rolle von Typ-I-Interferonen bei der Vermittlung des Synergismus nicht ausreichend belegt werden (Bagchi *et al.*, 2007; Bohnenkamp *et al.*, 2007). Eine einfache Erklärung mag darin liegen, dass lediglich der IL12-Promotor über sogenannte *interferon-sensitive response elements* verfügt (Makela *et al.*, 2009). Außerdem konnte keine gesteigerte Produktion von IL-12 mehr festgestellt werden, wenn man den endogene Interferone induzierenden Stimulus durch exogen hinzugefügtes IFN- $\beta$  ersetzte (Napolitani *et al.*, 2005; Suet Ting Tan *et al.*, 2013). Daneben belegten andere Autoren, dass die synergistischen Effekte auf die proinflammatorische Zytokinproduktion Interferon-unabhängig sind (Whitmore *et al.*, 2004).

All diese Berichte in der Literatur, die sich vorwiegend auf simultane Stimulation beziehen, decken sich in weiten Teilen mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zur essentiellen Rolle von Interferonen bei der Sensitivierung endosomaler TLRs. Es ist denkbar, dass die auto- bzw. parakrine Wirkung von Interferonen auch im Kontext sequentieller Stimulation eine wichtige Rolle spielt. Insgesamt beweisen die Berichte und vorgestellten Ergebnisse jedoch auch, dass Interferone allein den Effekt der TLR-Sensitivierung nicht ausreichend erklären können, sondern dafür noch andere Faktoren, die am ehesten intrazellulär im Bereich der Signalwege eingreifen, von Bedeutung sein müssen. Der Toleranzeffekt auf RLRs scheint durch Interferone allein in größerem Ausmaß vermittelt zu werden als die TLR-Sensitivierung (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 9). Dabei ist jedoch auch hier höchst wahrscheinlich, dass noch weitere Faktoren gegebenenfalls in geringerem Umfang an der Vermittlung des Reprogrammierungseffekts beteiligt sind.

Bei all dem ist interessant, dass es Juang und Kollegen bereits 1999 gelang, Reprogrammierung ohne genaue Kenntnis der beteiligten Rezeptoren oder Signalwege zu beschreiben: sie

untersuchten den Effekt der Vorbehandlung mit LPS auf die NDV-induzierte Genexpression von Zytokinen. Dabei konnten sie ebenfalls eine Reduktion der Typ-I-Interferon-Antwort bei gleichzeitig erhöhter IL-6-Expression zeigen (Juang *et al.*, 1999). Im Folgenden sollen nun genauer die molekularen Mechanismen beleuchtet werden, die dem in dieser Arbeit präsentierten Phänomen der Reprogrammierung zugrunde liegen könnten, und mögliche mechanistische Erklärungen für die beschriebenen Effekte diskutiert werden.

### 4.3 Molekulare Mechanismen der TLR-Sensitivierung

#### 4.3.1 Rolle von MAPKs und NFκB

Die gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation endosomaler TLRs vorkonditionierter Zellen beruht, wie entsprechende Experimente gezeigt haben, auf einer verstärkten Aktivierung von NFκB und MAPKs (vgl. Abbildung 7). Dabei stellte sich JNK im Vergleich zu den anderen MAPKs und NFκB als stärker phosphoryliert dar. Dies kann als Hinweis darauf gelten, dass JNK an der Vermittlung der hier beschriebenen Sensitivierung endosomaler TLRs besonders stark beteiligt ist, reicht aber keinesfalls als ausreichender Nachweis für diese besondere Rolle aus, da sich unterschiedliche Antikörper (hier JNK gegenüber ERK, p38 und NFκB) im jeweiligen Phosphorylierungsstatus bekanntlich nur sehr schwer bzw. nicht miteinander vergleichen lassen. Somit gilt die Hypothese einer besonderen Rolle von JNK für die Sensitivierung nur mit starken Einschränkungen. Beim Blick in die Literatur findet man unterschiedliche Angaben, welche MAPKs im Rahmen von Stimulationsexperimenten eine herausragende Rolle spielen. So wurde gezeigt, dass bei TLR4-Konditionierung und nachfolgender TLR9-Stimulation von Makrophagen JNK ebenfalls übermäßig stark aktiviert wird (De Nardo *et al.*, 2009). Auch bei simultaner Stimulation von TLR3 und TLR2 bzw. 9 in DCs vermittelte JNK den synergistischen Effekt im Bezug auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine (Zhu *et al.*, 2008). Der von den Autoren beschriebene Mechanismus besteht in einer unidirektionalen, intrazellulären Interaktion, die JNK-vermittelt zur Hochregulierung MyD88-abhängiger Signalwege nach Aktivierung TRIF-abhängiger Signalwege führt (Zhu *et al.*, 2008). An anderer Stelle wurde die Abhängigkeit der synergistischen Effekte von MyD88 gezeigt (Theiner *et al.*, 2008). Daraus lässt sich wie schon weiter oben ableiten, dass für die TLR-Sensitivierung ein Zusammenspiel von MyD88-abhängigem und -unabhängigem Signalwegen notwendig ist.

Dagegen konnte gezeigt werden, dass ERK eine besondere Bedeutung bei sequentieller Stimulation von TLR3 und TLR7 zukommt (Suet Ting Tan *et al.*, 2013). Es wurde auch eine genauere mechanistische Erklärung für die verstärkte Aktivierung von ERK geliefert: durch

*downregulation* von *Dual specificity phosphatase* (DUSP)-6 wird die Dephosphorylierung von ERK verhindert (Suet Ting Tan *et al.*, 2013). DUSPs sind allgemein als Phosphatasen von MAPKs bekannt, weshalb sich durch deren *downregulation* auch der hier demonstrierte gesteigerte Phosphorylierungsstatus von MAPKs gut erklären ließe. Wiederum an anderer Stelle wurde auf Proteinebene die Sensitivierung auf eine verstärkte Translokation von NF $\kappa$ B in den Nukleus zurückgeführt (Bagchi *et al.*, 2007). Im Kontext von simultaner Stimulation konnte gezeigt werden, dass die Kinase p38 für synergistische Effekte nach Kostimulation von TLR4 und TLR8 in DCs besonders stark aktiviert ist (Bohnenkamp *et al.*, 2007). An anderer Stelle wurde p38 neben JNK wiederum in Zusammenhang gebracht mit einer synergistischen Produktion von antiinflammatorischem IL-10 nach gleichzeitiger Stimulation von TLR2 und TLR4 (Hirata *et al.*, 2008). Zusammenfassend könnten die geschilderten Hinweise darauf, dass einer bestimmten MAPK oder NF $\kappa$ B für den synergistischen Effekt bei simultaner Stimulation bzw. für die Sensitivierung bei sequentieller Stimulation eine besondere Rolle zukommt, darin begründet sein, dass Antworten des angeborenen Immunsystems hochgradig Pathogen- und Zelltyp-spezifisch sind (Kumar *et al.*, 2011; Trinchieri und Sher, 2007). Demnach wären detailliertere Untersuchungen in verschiedenen Zelltypen mit verschiedenen Pathogenen als PRR-Liganden oder ein systembiologischer Ansatz notwendig, um einen umfassenden Einblick in die unterschiedliche Bedeutung verschiedener MAPKs und NF $\kappa$ B zu erhalten und letztlich die Mechanismen hinter der besonders starken Rolle im konkreten Fall besser verstehen zu können.

### 4.3.2 Kooperation auf Transkriptionsfaktorebene

Die maximale Genexpression wird grundsätzlich dadurch erreicht, dass möglichst viele der einen bestimmten Genabschnitt aktivierenden Transkriptionsfaktoren an das entsprechende Promotorsegment binden. Durch gleichzeitige Stimulation mehrerer PRRs kann dies bewirkt werden: TLR7-Stimulation aktiviert die Transkriptionsfaktoren JunB und CCAAT/*enhancer-binding protein* (CREB)  $\beta$ , TLR3-Stimulation aktiviert IRF1. Durch die Bindung aller drei Transkriptionsfaktoren an den entsprechenden Promotor kommt es zur synergistischen Produktion von IL-6 und IL-12 (Liu *et al.*, 2015). Weiter wurde auf Transkriptionsfaktorebene auch IRF5 als essentieller Bestandteil für die Induktion maximaler Synergieeffekte bei simultaner Stimulation von TLR3 oder 4 und TLR7 oder 9 identifiziert (Ouyang *et al.*, 2007). Darüber hinaus wiesen Makela und Kollegen nach, dass die gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine bei gleichzeitiger Stimulation von TLR3 und TLR8 das Ergebnis des Zusammenspiels verschiedener Signalwege und ihrer Transkriptionsfaktoren ist, nämlich IRF1, IRF8, NF $\kappa$ B, p38, JNK und *phosphoinositide 3 kinase* (PI3K) (Makela *et al.*, 2009). Es ist durchaus vorstellbar, dass ein vergleichbarer Mechanismus auch an der hier

beschriebenen TLR-Sensitivierung beteiligt ist: während der erste, konditionierende Stimulus einen entsprechenden Genabschnitt durch Bindung der durch ihn aktivierten Transkriptionsfaktoren sozusagen zunächst voraktiviert, wird die gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine erst nach Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren an den Promotor ausgelöst, die als Ergebnis der zweiten Stimulation aktiviert wurden.

Tabelle 2 fasst sämtliche oben beschriebene Beispiele zu Sensitivierung und Synergismus bei TLRs als Übersicht zusammen inklusive Auflistung der in den jeweiligen Originalarbeiten aufgedeckten bzw. teilweise nur postulierten mechanistischen Erklärungen.

	Zelltyp	Rezeptoren	Effekt	Mechanismus	Referenz
Sensitivierung	MP	TLR3 + TLR2/5/9	↑ TNF- $\alpha$ , IL-6	↑ NF $\kappa$ B-Translokation	(Bagchi <i>et al.</i> , 2007)
	MP	TLR4/5/7/9 + TLR3/4	↑ IFN- $\beta$ (= IL-12 und TNF- $\alpha$ )	-	(Broad <i>et al.</i> , 2007)
	MP	TLR4 und TLR9	↑ TNF- $\alpha$ , IL-6	↑ JNK-Aktivität	(De Nardo <i>et al.</i> , 2009)
	Tier- versuch	TLR3 + TLR4	↑ TNF- $\alpha$	IFN- $\alpha/\beta$ -abhängig	(Nansen und Randrup Thomsen, 2001)
	MP	TLR2 + TLR4	↑ IFN- $\beta$ (+ ↓IL-6 und IL-12)	↑ TRAF3-Expression	(Perkins <i>et al.</i> , 2013)
	MP	TLR3 + TLR7	↑ IL-6, IL-10, IL12p40, TNF- $\alpha$	↑ Erk-Aktivität	(Suet Ting Tan <i>et al.</i> , 2013)
Synergie	DC	TLR3/4 + TLR8	↑ IL-12p70 (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ )	↑ p38-Aktivität	(Bohnenkamp <i>et al.</i> , 2007)
	DC	TLR3/4 + TLR8	↑ IL-12p70	autokrin-parakrine Typ-I- Interferon-Schleife	(Gautier <i>et al.</i> , 2005)
	DC	TLR2 + TLR4	↑ IL-10	↑ p38- und JNK-Aktivität	(Hirata <i>et al.</i> , 2008)
	DC	TLR3+ TLR9	↑ IL-12p70, IL-6, IL-10	autokrine Interferon- Wirkung	(Krummen <i>et al.</i> , 2010)
	MP	TLR3 + TLR7	↑ IL-6, IL-12	synchronisierte Interaktion von IRF1, JunB und CEBP $\beta$	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
	DC	TLR3/4 + TLR8	↑ IL-12p70, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$	↑ p38-, NF $\kappa$ B-, PI3K- Aktivität	(Makela <i>et al.</i> , 2009)
	DC	TLR3/4 + TLR7/8/9	↑ IL-12p70, IL-23, Delta-4	↑ JNK-Aktivität	(Napolitani <i>et al.</i> , 2005)
	MP	TLR3/4 + TLR7/9	↑ IL12p40, IL23p19, IL-6	IRF5-abhängig	(Ouyang <i>et al.</i> , 2007)
	DC	TLR9 + TLR4	↑ IL-12p70, IL12p40	MyD88-abhängig	(Theiner <i>et al.</i> , 2008)
	MP	TLR3 + TLR9	↑ IL-6, IL12, TNF- $\alpha$	Typ-I-Interferon unabhängig	(Whitmore <i>et al.</i> , 2004)
DC	TLR3 + TLR2/9	↑ IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12	JNK-abhängig	(Zhu <i>et al.</i> , 2008)	

**Tabelle 2: Beispiele für TLR-Sensitivierung und -synergismus incl. Erkenntnissen zu beteiligten Mechanismen**

Dargestellt sind die in Kapitel 4.1 bis 4.3 erwähnten Beispiele von sequentieller und simultaner Stimulation verschiedener TLRs (dritte Spalte) mit der entsprechend gesteigerten Immunantwort (vierte Spalte) sowie die Erkenntnisse bzgl. des beteiligten Mechanismus für die gezeigten Effekte bzw. deren Abhängigkeit von bestimmten Faktoren (fünfte Spalte). Die Angaben in der ersten Spalte verweisen auf den für die Untersuchungen verwendeten Zelltyp (DC: dendritische Zellen; MP: Makrophagen) bzw. einmalig Tierversuch. In der sechsten Spalte wird auf die entsprechende Originalliteratur verwiesen. Für Abkürzungen vergleiche Fließtext.

## 4.4 Molekulare Mechanismen der RLR-Blockade

### 4.4.1 Beeinflussung auf Rezeptorebene

Im Gegensatz zur TLR-Sensitivierung wurde die durch Konditionierung mit einem MyD88-unabhängigen Stimulus induzierte Blockade von RLRs von unserer Arbeitsgruppe erstmalig beschrieben (Hotz *et al.*, 2015). Die naheliegendste Erklärung für die verminderte bzw. aufgehobene Produktion von Interferonen wäre eine durch die Konditionierung bewirkte Beeinflussung auf Rezeptorebene. Die Hypothese einer reduzierten Expression von RLR-Protein wurde durch hier gezeigte Ergebnisse widerlegt (vgl. Abbildung 8). Vielmehr war der Expressionsstatus von RIG-I und MDA5 nach Konditionierung deutlich gesteigert, was sich mit der Literatur deckt, wonach die Gene für RIG-I und MDA5, *Ddx58* bzw. *Ifih1*, durch Interferone induziert werden (Haller *et al.*, 2006; Loo und Gale, 2011; Yoneyama *et al.*, 2004).

Daneben finden sich mehrere Originalarbeiten, die Veränderungen auf Rezeptorebene beschreiben, die zur Deaktivierung von RLRs bzw. zum Abbau von RIG-I-*like*-Rezeptorprotein führen. In der Mehrzahl der Beispiele geschieht das durch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Ubiquitylierung, SUMOylierung oder ISGylierung. Exemplarisch sei hier auf die Arbeit von Kim und Kollegen verwiesen, die zeigen konnten, dass die Interferon-induzierte Konjugation von RIG-I mit ISG15 als negativer Regulationsmechanismus antiviraler Signalwege dient (Kim *et al.*, 2008a). ISGylierung senkt dabei die Menge an nicht-konjugiertem und damit funktionsfähigem RIG-I-Protein in der Zelle, wodurch letztlich die Interferon-Produktion gedrosselt wird. In dieser Arbeit wurde RIG-I-Protein jedoch wie oben ausführlich dargelegt verstärkt exprimiert (vgl. Abbildung 8). Die RLR-Blockade kann somit nicht durch Veränderungen auf Rezeptorebene erklärt werden.

Auch Veränderungen an den Signalproteinen *downstream* des Rezeptors im Rahmen von mehrfacher Stimulation von Mustererkennungsrezeptoren (simultan und sequentiell) werden in zahlreichen Originalarbeiten beschrieben (Loo und Gale, 2011). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei wiederholter Stimulation von TLR7 IRAK1 als zentraler Bestandteil des Komplexes, der für die Signaltransduktion vom Adaptorprotein MyD88 auf weiter *downstream* gelegene Kinasen verantwortlich ist (auch „*Mydosome*“ genannt), herabreguliert wird (Bourquin *et al.*, 2011). Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit weisen aber aufgrund des unterschiedlichen Aktivierungsstatus von TBK1/IKK $\epsilon$  und IRF3 (vgl. Abbildung 9) bei der Tatsache, dass beide Komponenten im Signalweg unmittelbar aufeinander folgen (Fitzgerald *et al.*, 2003), stark darauf hin, dass die entscheidende Modifikation des RLR-Signalwegs erst auf der Ebene dieser beiden Proteine stattfindet. Somit lassen sich die

potentiellen Kandidaten zur Erklärung des Reprogrammierungseffekts nachfolgend entscheidend eingrenzen.

#### 4.4.2 Veränderungen auf der Ebene von TBK1/IKK $\epsilon$ und IRF3

##### 4.4.2.1 Regulation durch postrtranslationale Modifikationen

Die Veränderungen auf dieser Ebene des Signalwegs könnten erneut gut durch postrtranslationale Modifikationen erklärt werden. Ubiquitylierung erscheint zur Erklärung der RLR-Blockade nach Konditionierung auf den ersten Blick ungeeignet, da sie letztlich die proteasomale Degradation von IRF3-Protein bewirkt (Davis und Gack, 2015). Dagegen waren die Proteinmengen im entsprechenden, hier vorgestellten Experiment in sämtlichen Bedingungen stabil (vgl. Abbildung 9). Der Ligase *tripartite motif containing* (TRIM) 26 kommt aber eine Sonderstellung zu: sie bewirkt spezifisch die Ubiquitylierung von phosphoryliertem IRF3 im Zellkern und dessen konsekutiven Abbau (Wang *et al.*, 2015), was somit keinen Einfluss auf die zytosolische IRF3-Gesamtproteinmenge hat. Dass TRIM26 selbst durch IFN- $\beta$  als Antwort auf Virusinfektion bzw. TLR3/4-Stimulation verstärkt exprimiert wird, macht es zu einem potentiellen Kandidaten für die Erklärung der RLR-Blockade.

Negative Regulation von IRF3 kann zudem auch durch Dephosphorylierung erfolgen. In der Literatur wurde gezeigt, dass die *protein phosphatase* (PP) 2A limitierend in die IFN-Produktion eingreift, indem sie nach Stimulation mit poly(I:C), LPS oder SeV aktiviertes IRF3 dephosphoryliert. Es kommt zur Deaktivierung ohne gleichzeitigen Abbau von IRF3-Protein. Vermittelt wird die Interaktion von PP2A und IRF3 durch das Adaptorprotein receptor for activated C kinase 1 (RACK1) (Long *et al.*, 2014). Die Autoren postulierten darüber hinaus, dass der Dephosphorylierung von aktiviertem IRF3 für die Terminierung der IFN-Produktion eine wesentlich größere Bedeutung zukommt als der Degradation von IRF3 (Long *et al.*, 2014). Beachtet man nun, dass sich auch in unseren Versuchen kein Abbau von unphosphoryliertem IRF3 nach RLR-Stimulation poly(I:C)-behandelter Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachweisen ließ (vgl. Abbildung 9), erklärt die Dephosphorylierungstheorie sehr gut die von uns beobachtete Blockade der IFN-Produktion. Die Bedeutung von Phosphatasen, die spezifisch IRF3 dephosphorylieren, wird durch die Entdeckung eines zweiten Vertreters, PP1, gestützt (Gu *et al.*, 2014).



#### 4.4.2.2 Regulation durch direkte Proteininteraktion

Daneben findet man auf der Ebene des Transkriptionsfaktors IRF3 in der Literatur auch einige Berichte zu negativer Regulation durch direkte Proteininteraktion, die für eine mechanistische Erklärung der hier demonstrierten RLR-Blockade von Interesse sind. Gerade im Hinblick auf die Erklärung der in entgegengesetzter Weise reprogrammierten Signalwege von TLRs und RLRs wäre eine Interaktion von Bestandteilen beider Signalwegs miteinander besonders vielversprechend. Dazu wurde in der Literatur gezeigt, dass MyD88 spezifisch die Aktivierung von IRF3 durch IKK $\epsilon$ , nicht jedoch durch TBK1, verhindert und damit zu einer reduzierten Interferon-Antwort nach TLR3-Stimulation führt (Siednienko *et al.*, 2011a). Bei auf diese Weise beeinträchtigter Funktion von IKK $\epsilon$  wäre auch eine abgeschwächte Interferon-Antwort nach Stimulation von RLRs zu erwarten. Erklärt wäre dadurch jedoch nicht, warum durch Konditionierung mit LPS die gleichen Effekte auslösbar sind wie für poly(I:C). MyD88 kommt wie in dieser Originalarbeit beschrieben der Funktion eines negativen Regulators von TLR3 bzw., wenn man die These weiter verallgemeinern will, von MyD88-unabhängigen Signalwegen nach. Vermittelt durch die spezifische Inhibition von IRF7 fungiert auch TIRAP als negativer Regulator der TLR3-induzierten Interferon-Produktion (Siednienko *et al.*, 2010).

In diesem Kontext soll auch A20, ein Ubiquitin-*editing*-Protein, erwähnt werden. Dieses interagiert mit TBK1/IKK $\epsilon$  und verhindert die Dimerisierung von IRF3, wodurch dessen Aktivierung und damit die weitere Genexpression blockiert wird (Saitoh *et al.*, 2005). Genauso wie TRIM26 ist es induzierbar durch dsRNA. Gleichzeitig wurde es jedoch auch als negativer Regulator von NF $\kappa$ B identifiziert (Lin *et al.*, 2006), was einen A20-abhängigen Mechanismus als Erklärung für die durch Reprogrammierung gleichzeitig ausgelöste RLR-Blockade und TLR-Sensitivierung ausschließt.

#### 4.4.3 Weitere Einflussfaktoren auf Transkriptionsfaktorebene

Ob neben der reduzierten Aktivität von IRF3 noch weitere Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der beschriebenen Blockade der IFN-Produktion spielen, lässt sich nicht abschließend klären. In der Literatur wurde beschrieben, dass auch Prozesse, die an IRF7 oder IRF2 angreifen, die Interferon-Produktion negativ beeinflussen können. So nimmt nach Stimulation von TLR3 die Expression von YinYang1 (YY1) zu, wahrscheinlich vermittelt durch die NF $\kappa$ B-Untereinheiten RelB und c-Rel (Siednienko *et al.*, 2011b). Im Zellkern interagiert YY1 mit IRF7 und verhindert so dessen Bindung an den IFN- $\beta$ -Promotor. An anderer Stelle wurde beschrieben, dass bei Virusinfektion IRF2 verstärkt an den IFN- $\beta$ -Promotor rekrutiert wird (Senger *et al.*, 2000). Sowohl die Bindung von IRF2, als auch die fehlende Rekrutierung von IRF7

unterdrücken die weitere Transkription von IFN- $\beta$ -Gen, dessen Zweck die Verhinderung einer überschießenden Produktion von Typ-I-Interferonen sein könnte. Es ist vorstellbar, dass sich beide Prozesse durch Konditionierung mit einem MyD88-unabhängigen Stimulus induzieren lassen würden.

Zusammenfassend erklärt die Dephosphorylierung von IRF-3 durch Phosphatasen wie PP2A (Long *et al.*, 2014) oder die selektive Degradation von phosphoryliertem IRF3 durch TRIM26 (Wang *et al.*, 2015) von den verschiedenen, oben beschriebenen potentiellen Mechanismen die neu beschriebene RLR-Blockade am besten. Vollständig unerwähnt blieb bisher die Möglichkeit, dass *microRNAs* (miRNAs) für die Reprogrammierung relevant sein könnten. In der Literatur existieren viele Beispiele für die Regulation von PRR-Signalwegen durch diese kleinen RNA-Moleküle (Li und Shi, 2013). Es ist vorstellbar, dass die Hochregulation von bestimmten miRNAs auch an der Vermittlung der hier dargestellten Effekte der Konditionierung auf die Signalwege von TLRs und RLRs beteiligt sein könnte. Da das in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde und die detaillierte Diskussion darüber ein neues, komplexes Feld innerhalb der Immunologie eröffnen würde, sei hier nicht weiter auf die mögliche Bedeutung von miRNAs eingegangen.

## 4.5 Klinische Relevanz

Im Bezug auf die Relevanz von Reprogrammierung ist davon auszugehen, dass sie innerhalb des angeborenen Immunsystems einen bedeutenden Mechanismus darstellt, um bei wiederholter Stimulation von Mustererkennungsrezeptoren letztlich eine wirkungsvolle, dosierte Immunantwort auszulösen. Denn erst das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Immunsystems ermöglicht dauerhaft die erfolgreiche Abwehr mikrobieller Infektionen (Janeway, 1989; Janeway und Medzhitov, 2002). Ganz allgemein formuliert liegt die biologische Relevanz der Redundanz in der Mustererkennung und des Zusammenspiels der verschiedenen Signalwege darin, Robustheit und Feinjustierung von Immunantworten zu gewährleisten (Underhill, 2007).

Geht man bei poly(I:C) von einem Modell für Virusinfektion aus (Loo und Gale, 2011), entspricht die durch Reprogrammierung vermittelte Sensitivierung von endosomalen TLRs einer Strategie zur Steigerung der Effizienz der Pathogenabwehr. Bei Virusinfektion kommt es zunächst unabhängig vom befallenen Zelltyp zur Induktion antiviraler Abwehrmechanismen wie der Ausschüttung von Typ-I-Interferonen. Das wird vermittelt durch die Aktivierung von RLRs, die ubiquitär exprimiert werden (Yoneyama und Fujita, 2009). Im Verlauf der Virusinfektion wird es für das Immunsystem jedoch zunehmend entscheidend, nicht nur die

primäre Virusinfektion zu detektieren, sondern die befallenen Zellen auszumachen und gezielt auszuschalten. Dies erfolgt durch verschiedene APCs, die gezielt virusinfizierte Zellen phagozytieren, wodurch virale Bestandteile in Endosomen gelangen, wo sie von TLR3, 7, 8 und 9 erkannt werden. Da diese Rezeptoren durch Reprogrammierung für ihre Liganden sensitiviert werden, kommt es zur Schaffung eines stark proinflammatorischen Milieus, wodurch weitere Immunzellen angelockt werden und letztlich die Viruselimination begünstigt wird (vgl. auch (Hotz *et al.*, 2015)). Man könnte somit die intrazellulären RLRs als erste und die endosomalen TLRs als zweite Instanz der Virusabwehr des angeborenen Immunsystems ansehen, wobei Reprogrammierung im zeitlichen Verlauf der Infektion den Wechsel von der primären antiviralen Immunantwort hin zur sekundären Abwehr virusinfizierter Zellen bewirkt.

Die zweite wichtige Bedeutung der Reprogrammierung liegt vermutlich in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Wie oben bereits geschildert führt die TLR-Sensitivierung zur Schaffung eines stark proinflammatorischen Zytokinmilieus. Dabei wird nicht nur das in dieser Arbeit als *readout* verwendete IL-6 verstärkt ausgeschüttet, sondern auch aktives IL-12, was in weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Hotz *et al.*, 2015). Dieses Zytokin bewirkt in erster Linie die Typ1-T-Helfer ( $T_H1$ )-Zell-Differenzierung, stimuliert aber auch die Proliferation verschiedener natürlicher Killerzelltypen sowie im weiteren Verlauf die Aktivierung von B-Zellen zur Antikörperproduktion (Trinchieri, 2003). Auch in anderen Arbeiten konnte demonstriert werden, dass poly(I:C) als Adjuvans das adaptive Immunsystem aktiviert: es induziert in MyD88-unabhängiger Weise die Antigen-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort und Antikörperproduktion (Kumar *et al.*, 2008) und stimuliert gleichzeitig die Reifung von DCs und die Entwicklung einer  $T_H1$ -Zell-Antwort, wodurch es zwei für höhere Immunleistungen notwendige Prozesse wirkungsvoll miteinander koppelt (Longhi *et al.*, 2009). Weiter haben Negishi und Kollegen beschrieben, dass die Aktivierung von RLRs die Transkription des Il12b-Gens unterdrückt, wohingegen durch die Stimulation von TLRs das Gegenteil erreicht wird (Negishi *et al.*, 2012). In diesem Sinne könnte Reprogrammierung durch die beschriebene TLR-Sensitivierung zu einer weiteren Verstärkung der IL12-Expression führen, was damit auch die  $T_H1$ - und Typ17-T-Helfer-Zell-Antwort steigern würde. Reprogrammierung kann damit als Beispiel dafür gewertet werden, wie angeborene Abwehrmechanismen die Aktivierung des adaptiven Immunsystems auslösen und somit die beiden Anteile des Immunsystems wirkungsvoll miteinander gekoppelt werden.

Gleichzeitig wird durch Reprogrammierung auch sicher gestellt, dass die eingeleiteten Abwehrprozesse langfristig keine negativen Auswirkungen auf das Immunsystem haben. So führt Reprogrammierung durch die RLR-Blockade zu einer Begrenzung der Interferonantwort. Das ist von entscheidender Bedeutung, da eine überschießende Interferon-Produktion

nachweislich zu pathologischen Immunprozessen bzw. immunsuppressiven Zuständen führt und die Entwicklung von chronisch-entzündlichen oder autoimmunen Erkrankungen begünstigt (Trinchieri, 2010). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die exzessive IFN- $\beta$ -Ausschüttung von Makrophagen bei Influenza-Pneumonie epithelialen Zellschaden bewirkt (Hogner *et al.*, 2013). Außerdem wurde beschrieben, dass die chronische Aktivierung von Signalwegen, die durch Typ-I-Interferone aktiviert werden, zu immunsuppressiven Zuständen bei Infektion mit lymphozytärem Choriomeningitisvirus führt und durch ihre gezielte Blockade eine erneute Kontrolle der Virusinfektion zu erreichen ist (Wilson *et al.*, 2013). Die Eindämmung der IFN-Ausschüttung durch Mechanismen wie die durch Reprogrammierung ausgelöste RLR-Blockade unterstützt damit die kontrollierte Viruselimination und reduziert das Risiko der Auslösung pathologischer Immunzustände. Heute ist bekannt, dass chronisch erhöhte Interferon-Spiegel an der Entwicklung zahlreicher chronisch-entzündlicher oder autoimmuner Erkrankungen wie beispielsweise dem systemischem Lupus erythematoses (Shrivastav und Niewold, 2013), der Lyme-Arthritis (Miller *et al.*, 2008) oder auch der Interface-Dermatitis (Wenzel und Tuting, 2008) entscheidend beteiligt sind. Reprogrammierung führt aber nicht zu einem vollständigen Sistieren der Interferonproduktion, vielmehr wird im Verlauf der Virusinfektion diese Aufgabe zunehmend von pDCs übernommen, die bei Aktivierung ihrer endosomalen TLRs aufgrund einer anderen Signalwegsausstattung Typ-I-Interferone ausschütten (Hotz *et al.*, 2015; Kawai und Akira, 2010). Diese Zellen sichern also langfristig die kontrollierte, antivirale Immunantwort.

Neben den soeben ausgeführten Vorteilen, die dem Immunsystem aus der Reprogrammierung entstehen, können jedoch im Rahmen des veränderten Ansprechens von Mustererkennungsrezeptoren nach Konditionierung auch negative Effekte auftreten. Dabei sei besonders auf das erhöhte Risiko für bakterielle Superinfektionen und den potentiell schwerwiegenden Verlauf dieser Infektionen verwiesen. Kim und Kollegen konnten zeigen, dass nach Infektion mit murinem Norovirus-1 oder Behandlung mit poly(I:C) bzw. IFN- $\beta$  direkt der Rezeptor Nod1/2 und das Nod-Adaptormolekül Rip2 verstärkt exprimiert werden. Eine Superinfektion mit E.coli resultierte in ihren Versuchen in einer deutlich stärkeren Produktion proinflammatorischer Zytokine (Kim *et al.*, 2011), was für den Wirt durchaus letal sein kann. Bereits zuvor gelang es zu demonstrieren, dass bei VSV-Infektion ausgeschüttete Interferone eine Sensitivierung von Mäusen für LPS bewirken. Bei Superinfektion mit gramnegativen Bakterien, die alle LPS als zentrales PAMP tragen, war dann eine überschießende, schnell ein toxisches Ausmaß annehmende Produktion von TNF- $\alpha$  und anderen proinflammatorischen Zytokinen die Folge (Nansen und Randrup Thomsen, 2001). So erweckt es den Eindruck, dass sich das Immunsystem die zahlreichen positiven Effekte von Reprogrammierung (vgl. obige drei

Absätze) zu Lasten einer eingeschränkten Abwehr von sekundären bakteriellen Infektionen erkaufte.

Zusammenfassend kann Reprogrammierung als Phänomen zur Erhaltung eines Gleichgewichts innerhalb des Immunsystems verstanden werden. Zunächst dient sie einer effizienten Pathogenabwehr, weiter ist sie für die Etablierung eines proinflammatorischen Milieus und langfristig die Aktivierung des adaptiven Immunsystems von großer Bedeutung. Diese Effekte beruhen auf der in dieser Arbeit vorgestellten TLR-Sensitivierung. Durch die RLR-Blockade wird auf der anderen Seite die überschießende Interferonproduktion verhindert, wodurch der Entwicklung von pathologischen Immunprozessen vorgebeugt wird. Schließlich lassen sich (Selektions-)Vorteile in der Natur meist nur durch Kompromisse erkaufen. Im Fall der Reprogrammierung scheint das die erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Superinfektionen zu sein.

#### **4.6 Ausblick**

Hinsichtlich des grundsätzlichen Effekts bei kombinierter Stimulation verschiedener Mustererkennungsrezeptoren, d.h. Synergismus bzw. Sensitivierung oder Toleranz bzw. Blockade, lässt sich eine gewisse Systematik erkennen (Kawai und Akira, 2011). Die genauen Mechanismen, wie diese Interaktionen erfolgen, stellen sich jedoch als komplex und schwierig zu systematisieren dar wie kürzlich in einer umfangreichen Übersichtsarbeit zum Thema dargelegt wurde (Cao, 2016). Weitere Forschung in diesem Bereich wird zeigen müssen, ob die beteiligten Mechanismen soweit generalisiert werden können, dass sich die Effekte von PRR-Interaktionen vollumfänglich voraussagen lassen. Daneben ist auch eine genauere Betrachtung des Netzwerks von Mustererkennungsrezeptoren und ihrer Signalwege unter systembiologischen Gesichtspunkten notwendig, um die Mechanismen hinter den Interaktionen von PRRs besser zu verstehen (Liu und Ding, 2016). Nur so kann die Bedeutung von Reprogrammierung für die einzelne Zelle und auch den gesamten Organismus vollständig erfasst werden.

Konkret ließe sich das Wissen um die hier vorgestellten Reprogrammierungseffekte und die dadurch bedingte Veränderung von Immunantworten durch sequentielle Stimulation von PRRs zukünftig einsetzen, um durch neue Therapiestrategien bessere Erfolge bei Impfungen und der Immuntherapie von Tumorerkrankungen zu erzielen (Trinchieri und Sher, 2007). In der Literatur wurde beschrieben, dass durch den Einsatz eines neuen Adjuvans, bestehend aus einem TLR4- und einem TLR7-Liganden, andauernde Immunität gegen Influenza-Virus induziert werden kann (Goff *et al.*, 2015). Als *cancer vaccine adjuvant* wird poly(I:C) aktuell in zahlreichen Studien untersucht (Ammi *et al.*, 2015). Bereits vor längerer Zeit konnte gezeigt

werden, dass die gleichzeitige Stimulation von TLR3 und TLR9 die Entwicklung von pulmonalen Metastasen in einem murinen Tumormodell kontrollieren kann (Whitmore *et al.*, 2004). Betrachtet man die Ergebnisse einer anderen Originalarbeit unserer Arbeitsgruppe, so hat die zeitliche Abfolge der Stimulation von PRRs erhebliche therapeutische Konsequenz (Bourquin *et al.*, 2011). Im Vergleich zur simultanen Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden, wie es der Fall ist bei beiden oben aufgelisteten Beispielen, könnte die sequentielle Stimulation die Immunantwort sogar noch potenzieren und sich hierdurch im Hinblick auf Vakzinierung und Tumorimmuntherapie bessere Ergebnisse erzielen lassen.

## 5 Zusammenfassung

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen bestimmte molekulare Muster von Pathogenen. Bei Infektionen werden oft gleichzeitig oder aufeinanderfolgend verschiedene dieser Mustererkennungsrezeptoren aktiviert. Deren Zusammenspiel ist für die Auslösung einer optimalen Immunantwort essentiell. Bekannt war, dass die Konditionierung mit dem doppelsträngigen RNA-Analogen poly(I:C), einem Modell für Virusinfektion, die Antwort von Immunzellen auf weitere Stimulation verändert, was als Reprogrammierung bezeichnet wird. So sprechen endosomale Toll-*like*-Rezeptoren (TLRs) nachfolgend verstärkt auf ihre Liganden an, wohingegen intrazelluläre RIG-I-*like*-Rezeptoren (RLRs) stark vermindert reagieren. Dass, wie in dieser Arbeit gezeigt, bei Konditionierung mit Lipopolysaccharid, einer bakteriellen Erkennungsstruktur, vergleichbare Effekte auftreten, muss als starker Hinweis für die breitere Gültigkeit des Phänomens der Reprogrammierung gelten.

Die Mechanismen, die hinter der veränderten Immunantwort bei aufeinanderfolgender Stimulation verschiedener Rezeptoren stecken, sind generell wenig erforscht. Auch die Bedeutung der einzelnen Bestandteile der intrazellulären Signalwege für die Reprogrammierung war weitestgehend unbekannt. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sich beide Effekte, TLR-Sensitivierung und RLR-Blockade, *in vitro* durch Inhibition des Enzymkomplexes TBK1/IKK $\epsilon$  aufheben lassen. TBK1/IKK $\epsilon$  ist ein zentraler Bestandteil der Signalwege von RLRs und TLRs im Hinblick auf die Induktion von Interferonen. Gleichzeitig wurde demonstriert, dass Reprogrammierung *in vivo* unabhängig vom Adaptorprotein TRIF erfolgt und dass Typ-I-Interferone für die Vermittlung der entgegengesetzten Effekte von essentieller Bedeutung sind. Für die RLR-Blockade ließ sich außerdem die molekulare Ebene identifizieren, auf der durch Reprogrammierung die Modifikation des Signalwegs bewirkt wird. Das erfolgte anhand des Nachweises von deutlichen Unterschieden im Aktivierungsstatus von TBK1/IKK $\epsilon$  und dem unmittelbar *downstream* davon gelegenen Transkriptionsfaktor IRF3.

Es gelang somit in dieser Arbeit die molekularen Mechanismen, die der Reprogrammierung von Mustererkennungsrezeptor-Signalwegen durch Konditionierung mit MyD88-unabhängigen Liganden zu Grunde liegen, näher zu charakterisieren. Dadurch konnte ein Beitrag zum Verständnis der Interaktionen von Mustererkennungsrezeptoren bei der Pathogendetektion innerhalb des angeborenen Immunsystems geleistet werden. Das Wissen um die hier vorgestellten Reprogrammierungseffekte könnte zukünftig zur Verbesserung von Impfstrategien und zur Entwicklung neuer Immuntherapien bei Tumorerkrankungen beitragen.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die Signalwege endosomaler TLRs und intrazellulärer RLRs .....	5
Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Stimulationsexperimente .....	22
Abbildung 3: Konditionierung mit poly(I:C) und LPS verändert das Ansprechen von PRRs auf ihre Liganden <i>in vitro</i> .....	23
Abbildung 4: Reprogrammierung von Immunzellen durch poly(I:C) ist <i>in vivo</i> unabhängig von TRIF .....	26
Abbildung 5: Inhibition von TBK1/IKK $\epsilon$ hebt die Reprogrammierungseffekte von poly(I:C) und LPS <i>in vitro</i> auf.....	28
Abbildung 6: Typ-I-Interferone vermitteln den IFN- $\alpha$ -Block <i>in vitro</i> .....	30
Abbildung 7: Poly(I:C) verstärkt die Phosphorylierung von MAPKs und NF $\kappa$ B in DCs .....	33
Abbildung 8: Poly(I:C) induziert die Expression intrazellulärer RLRs in J774-Zellen und DCs34	
Abbildung 9: Poly(I:C) vermindert die Phosphorylierung von IRF3 nach MDA5-Stimulation in J774-Zellen .....	36
Abbildung 10: Grafische Zusammenfassung der Effekte der Reprogrammierung .....	38
Tabelle 1: Wichtige Mustererkennungsrezeptoren und ihre Liganden sowie Adaptorproteine ....	2
Tabelle 2: Beispiele für TLR-Sensitivierung und -synergismus incl. Erkenntnissen zu beteiligten Mechanismen.....	46



## 7 Abkürzungsverzeichnis

5'ppp-RNA	5'-Triphosphat-RNA
Ab	Antikörper
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
bzw.	Beziehungsweise
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
CEBP $\beta$	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CLR	<i>C-type lectin-Rezeptor</i>
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Cytosin-phosphat-Guanin(-Dinukleotid)
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA/RNA	Doppelsträngige DNA/RNA
DUSP	<i>Dual specificity phosphatase</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis-Virus</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HSV	<i>Herpes simplex-Virus</i>
IFN	Interferon
IFN $\alpha$ R	Interferon- $\alpha$ / $\beta$ -Rezeptor
IKK( $\epsilon$ )	<i>I<math>\kappa</math>B kinase (<math>\epsilon</math>)</i>
IL	Interleukin
IRAK	<i>IL-1R1-associated protein kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated gene</i>
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
J774	Zellen der murinen Makrophagen (ähnlichen) Zelllinien J774
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
LPG2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i> = <i>interferon promoter stimulator 1 (IPS-1)</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>

miRNA	<i>MicroRNA</i>
MMTV	<i>Mouse mammary tumor-Virus</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NDV	<i>Newcastle-Disease-Virus</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
p38	<i>p38 MAP kinase</i>
pAb	<i>Polyklonaler Antikörper</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDC	<i>Plasmazytoiden dendritischen Zelle</i>
PI-3K	<i>Phosphoinositide 3 kinase</i>
poly(A:U)	<i>Polyadenylic-polyuridylic acid</i>
poly(I:C)	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PP1/ PP2A	<i>Protein phosphatase 1/ 2A</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
R848	<i>Resiquimod</i>
RACK1	<i>Receptor for activated C kinase 1</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP1	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RLR	<i>RIG-I-like-Rezeptor</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial-Virus</i>
s.c.	<i>Subkutan</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SeV	<i>Sendai-Virus</i>
siRNA	<i>Small interfering-RNA</i>
ssDNA/RNA	<i>Einzelstängige (englisch: single stranded) DNA/RNA</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor β-associated kinase 1</i>
TANK	<i>TRAF family member-associated NFκB activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS+T	<i>Tris-buffered saline mit Tween</i>
T <sub>H</sub> 1-Zelle	<i>Typ1-T-Helfer-Zelle</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 Rezeptor</i>
TIRAP	<i>TIR-domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-β</i>

TRIM	<i>Tripartite motif containing</i>
vgl.	Vergleiche
VSV	<i>Vesicular stomatitis-Virus</i>
WNV	<i>West Nile-Virus</i>
YY1	YinYang1

## 8 Literaturverzeichnis

- Akira, S., Takeda, K. und Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675-680.
- Akira, S., Uematsu, S. und Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. und Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.
- Ammi, R., De Waele, J., Willemen, Y., Van Brussel, I., Schrijvers, D. M., Lion, E. und Smits, E. L. (2015). Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol Ther* 146: 120-131.
- Bagchi, A., Herrup, E. A., Warren, H. S., Trigilio, J., Shin, H. S., Valentine, C. und Hellman, J. (2007). MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol* 178: 1164-1171.
- Barton, G. M. und Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 9: 535-542.
- Beeson, P. B. und Technical Assistance of Elizabeth, R. (1947). Tolerance to bacterial pyrogens: Role of the reticulo-endothelial system. *J Exp Med* 86: 39-44.
- Bibeau-Poirier, A., Gravel, S. P., Clement, J. F., Rolland, S., Rodier, G., Coulombe, P., Hiscott, J., Grandvaux, N., Meloche, S. und Servant, M. J. (2006). Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation. *J Immunol* 177: 5059-5067.
- Biswas, S. K. und Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30: 475-487.
- Bohnenkamp, H. R., Papazisis, K. T., Burchell, J. M. und Taylor-Papadimitriou, J. (2007). Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses. *Cell Immunol* 247: 72-84.
- Bourquin, C., Hotz, C., Noerenberg, D., Voelkl, A., Heidegger, S., Roetzer, L. C., Storch, B., Sandholzer, N., Wurzenberger, C., Anz, D. und Endres, S. (2011). Systemic cancer therapy with a small molecule agonist of toll-like receptor 7 can be improved by circumventing TLR tolerance. *Cancer Res* 71: 5123-5133.
- Broad, A., Kirby, J. A., Jones, D. E., Applied, I. und Transplantation Research, G. (2007). Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production. *Immunology* 120: 103-111.
- Cao, X. (2016). Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat Rev Immunol* 16: 35-50.

- Chang, L. und Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40.
- Clark, K., Plater, L., Peggie, M. und Cohen, P. (2009). Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IkappaB kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. *J Biol Chem* 284: 14136-14146.
- Coban, C., Igari, Y., Yagi, M., Reimer, T., Koyama, S., Aoshi, T., Ohata, K., Tsukui, T., Takeshita, F., Sakurai, K., Ikegami, T., Nakagawa, A., Horii, T., Nunez, G., Ishii, K. J. und Akira, S. (2010). Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* 7: 50-61.
- Davis, M. E. und Gack, M. U. (2015). Ubiquitination in the antiviral immune response. *Virology* 479-480: 52-65.
- De Nardo, D., De Nardo, C. M., Nguyen, T., Hamilton, J. A. und Scholz, G. M. (2009). Signaling crosstalk during sequential TLR4 and TLR9 activation amplifies the inflammatory response of mouse macrophages. *J Immunol* 183: 8110-8118.
- Didierlaurent, A., Goulding, J., Patel, S., Snelgrove, R., Low, L., Bebien, M., Lawrence, T., van Rijt, L. S., Lambrecht, B. N., Sirard, J. C. und Hussell, T. (2008). Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 205: 323-329.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. und Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-1531.
- Dixit, E., Boulant, S., Zhang, Y., Lee, A. S., Odendall, C., Shum, B., Hacohen, N., Chen, Z. J., Whelan, S. P., Fransen, M., Nibert, M. L., Superti-Furga, G. und Kagan, J. C. (2010). Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 141: 668-681.
- Dobrovolskaia, M. A., Medvedev, A. E., Thomas, K. E., Cuesta, N., Toshchakov, V., Ren, T., Cody, M. J., Michalek, S. M., Rice, N. R. und Vogel, S. N. (2003). Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol* 170: 508-519.
- Dong, C., Davis, R. J. und Flavell, R. A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20: 55-72.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B. und Svanborg, C. (2006). Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur J Immunol* 36: 267-277.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. und Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4: 491-496.

- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A. und O'Neill, L. A. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413: 78-83.
- Fredericksen, B. L., Keller, B. C., Fornek, J., Katze, M. G. und Gale, M., Jr. (2008). Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J Virol* 82: 609-616.
- Gautier, G., Humbert, M., Deauevieu, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E., Trinchieri, G., Caux, C. und Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201: 1435-1446.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S. und Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8459-8464.
- Goff, P. H., Hayashi, T., Martinez-Gil, L., Corr, M., Crain, B., Yao, S., Cottam, H. B., Chan, M., Ramos, I., Eggink, D., Heshmati, M., Krammer, F., Messer, K., Pu, M., Fernandez-Sesma, A., Palese, P. und Carson, D. A. (2015). Synthetic Toll-like receptor 4 (TLR4) and TLR7 ligands as influenza virus vaccine adjuvants induce rapid, sustained, and broadly protective responses. *J Virol* 89: 3221-3235.
- Gohda, J., Matsumura, T. und Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol* 173: 2913-2917.
- Gu, M., Zhang, T., Lin, W., Liu, Z., Lai, R., Xia, D., Huang, H. und Wang, X. (2014). Protein phosphatase PP1 negatively regulates the Toll-like receptor- and RIG-I-like receptor-triggered production of type I interferon by inhibiting IRF3 phosphorylation at serines 396 and 385 in macrophage. *Cell Signal* 26: 2930-2939.
- Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., Kamps, M. P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M. und Karin, M. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439: 204-207.
- Haller, O., Kochs, G. und Weber, F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344: 119-130.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. und Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745.

- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K. und Akira, S. (2004). The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 199: 1641-1650.
- Hirata, N., Yanagawa, Y., Ebihara, T., Seya, T., Uematsu, S., Akira, S., Hayashi, F., Iwabuchi, K. und Onoe, K. (2008). Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. *Mol Immunol* 45: 2734-2742.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J. und Beutler, B. (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424: 743-748.
- Hogner, K., Wolff, T., Pleschka, S., Plog, S., Gruber, A. D., Kalinke, U., Walmrath, H. D., Bodner, J., Gattenlohner, S., Lewe-Schlosser, P., Matrosovich, M., Seeger, W., Lohmeyer, J. und Herold, S. (2013). Macrophage-expressed IFN-beta contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS Pathog* 9: e1003188.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. und Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434: 772-777.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. und Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314: 994-997.
- Hotz, C., Roetzer, L. C., Huber, T., Sailer, A., Oberson, A., Treinies, M., Heidegger, S., Herbst, T., Endres, S. und Bourquin, C. (2015). TLR and RLR signaling are reprogrammed in opposite directions after detection of viral infection. *J Immunol* 195: 4387-4395.
- Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 987-995.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
- Jensen, S. und Thomsen, A. R. (2012). Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol* 86: 2900-2910.
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K. und Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol* 22: 7158-7167.

- Juang, Y. T., Au, W. C., Lowther, W., Hiscott, J. und Pitha, P. M. (1999). Lipopolysaccharide inhibits virus-mediated induction of interferon genes by disruption of nuclear transport of interferon regulatory factors 3 and 7. *J Biol Chem* 274: 18060-18066.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Lin, L., Randolph, A., Valerie, K., Pestka, S. und Fisher, P. B. (2004). Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 23: 1789-1800.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T. und Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 205: 1601-1610.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. und Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-105.
- Kawai, T. und Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
- Kawai, T. und Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637-650.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O. und Akira, S. (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5: 1061-1068.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. und Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6: 981-988.
- Kawasaki, T., Kawai, T. und Akira, S. (2011). Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol Rev* 243: 61-73.
- Kim, M. J., Hwang, S. Y., Imaizumi, T. und Yoo, J. Y. (2008a). Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *J Virol* 82: 1474-1483.
- Kim, Y. G., Park, J. H., Reimer, T., Baker, D. P., Kawai, T., Kumar, H., Akira, S., Wobus, C. und Nunez, G. (2011). Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. *Cell Host Microbe* 9: 496-507.
- Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E. und Ploegh, H. L. (2008b). UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452: 234-238.
- Krummen, M., Balkow, S., Shen, L., Heinz, S., Loquai, C., Probst, H. C. und Grabbe, S. (2010). Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88



- signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. *J Leukoc Biol* 88: 189-199.
- Kumar, H., Kawai, T. und Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16-34.
- Kumar, H., Koyama, S., Ishii, K. J., Kawai, T. und Akira, S. (2008). Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 180: 683-687.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lehner, M. D., Morath, S., Michelsen, K. S., Schumann, R. R. und Hartung, T. (2001). Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 166: 5161-5167.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983.
- Li, Y. und Shi, X. (2013). MicroRNAs in the regulation of TLR and RIG-I pathways. *Cell Mol Immunol* 10: 65-71.
- Lin, R., Yang, L., Nakhaei, P., Sun, Q., Sharif-Askari, E., Julkunen, I. und Hiscott, J. (2006). Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *J Biol Chem* 281: 2095-2103.
- Lin, S. C., Lo, Y. C. und Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465: 885-890.
- Liu, Q. und Ding, J. L. (2016). The molecular mechanisms of TLR-signaling cooperation in cytokine regulation. *Immunol Cell Biol* 94: 538-542.
- Liu, Q., Zhu, Y., Yong, W. K., Sze, N. S., Tan, N. S. und Ding, J. L. (2015). Cutting edge: Synchronization of IRF1, JunB, and C/EBPbeta activities during TLR3-TLR7 cross-talk orchestrates timely cytokine synergy in the proinflammatory response. *J Immunol* 195: 801-805.
- Long, L., Deng, Y., Yao, F., Guan, D., Feng, Y., Jiang, H., Li, X., Hu, P., Lu, X., Wang, H., Li, J., Gao, X. und Xie, D. (2014). Recruitment of phosphatase PP2A by RACK1 adaptor protein deactivates transcription factor IRF3 and limits type I interferon signaling. *Immunity* 40: 515-529.
- Longhi, M. P., Trumpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, A. M., Colonna, M. und Steinman, R. M. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* 206: 1589-1602.

- Loo, Y. M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M. A., Garcia-Sastre, A., Katze, M. G. und Gale, M., Jr. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 82: 335-345.
- Loo, Y. M. und Gale, M., Jr. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34: 680-692.
- Makela, S. M., Strengell, M., Pietila, T. E., Osterlund, P. und Julkunen, I. (2009). Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 85: 664-672.
- Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G. und Beninati, C. (2009). Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 10: 587-594.
- McCartney, S. A., Thackray, L. B., Gitlin, L., Gilfillan, S., Virgin, H. W. und Colonna, M. (2008). MDA-5 recognition of a murine norovirus. *PLoS Pathog* 4: e1000108.
- Miller, J. C., Ma, Y., Bian, J., Sheehan, K. C., Zachary, J. F., Weis, J. H., Schreiber, R. D. und Weis, J. J. (2008). A critical role for type I IFN in arthritis development following *Borrelia burgdorferi* infection of mice. *J Immunol* 181: 8492-8503.
- Nansen, A. und Randrup Thomsen, A. (2001). Viral infection causes rapid sensitization to lipopolysaccharide: central role of IFN-alpha beta. *J Immunol* 166: 982-988.
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6: 769-776.
- Negishi, H., Yanai, H., Nakajima, A., Koshiba, R., Atarashi, K., Matsuda, A., Matsuki, K., Miki, S., Doi, T., Aderem, A., Nishio, J., Smale, S. T., Honda, K. und Taniguchi, T. (2012). Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat Immunol* 13: 659-666.
- Nish, S. und Medzhitov, R. (2011). Host defense pathways: role of redundancy and compensation in infectious disease phenotypes. *Immunity* 34: 629-636.
- O'Neill, L. A. und Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7: 353-364.
- Ouyang, X., Negishi, H., Takeda, R., Fujita, Y., Taniguchi, T. und Honda, K. (2007). Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 1045-1051.
- Palsson-McDermott, E. M. und O'Neill, L. A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162.
- Pandey, S., Kawai, T. und Akira, S. (2015). Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5: a016246.

- Paz, S., Sun, Q., Nakhaei, P., Romieu-Mourez, R., Goubau, D., Julkunen, I., Lin, R. und Hiscott, J. (2006). Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cell Mol Biol* 52: 17-28.
- Perkins, D. J., Polumuri, S. K., Pennini, M. E., Lai, W., Xie, P. und Vogel, S. N. (2013). Reprogramming of murine macrophages through TLR2 confers viral resistance via TRAF3-mediated, enhanced interferon production. *PLoS Pathog* 9: e1003479.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. und Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314: 997-1001.
- Poock, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S. S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., Schmidt, A., Anz, D., Bscheider, M., Schwerd, T., Berking, C., Bourquin, C., Kalinke, U., Kremmer, E., Kato, H., Akira, S., Meyers, R., Hacker, G., Neuenhahn, M., Busch, D., Ruland, J., Rothenfusser, S., Prinz, M., Hornung, V., Endres, S., Tuting, T. und Hartmann, G. (2008). 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 14: 1256-1263.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. und Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y. M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T. und Gale, M., Jr. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 582-587.
- Saitoh, T., Yamamoto, M., Miyagishi, M., Taira, K., Nakanishi, M., Fujita, T., Akira, S., Yamamoto, N. und Yamaoka, S. (2005). A20 is a negative regulator of IFN regulatory factor 3 signaling. *J Immunol* 174: 1507-1512.
- Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O., Muhlradt, P. F., Takeda, K. und Akira, S. (2000). Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 165: 7096-7101.
- Scott, I. (2010). The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion* 10: 316-320.
- Senger, K., Merika, M., Agaloti, T., Yie, J., Escalante, C. R., Chen, G., Aggarwal, A. K. und Thanos, D. (2000). Gene repression by coactivator repulsion. *Mol Cell* 6: 931-937.
- Shnyra, A., Brewington, R., Alipio, A., Amura, C. und Morrison, D. C. (1998). Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL-10 and IL-12. *J Immunol* 160: 3729-3736.
- Shrivastav, M. und Niewold, T. B. (2013). Nucleic Acid sensors and type I interferon production in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* 4: 319.

- Siednienko, J., Gajanayake, T., Fitzgerald, K. A., Moynagh, P. und Miggin, S. M. (2011a). Absence of MyD88 results in enhanced TLR3-dependent phosphorylation of IRF3 and increased IFN-beta and RANTES production. *J Immunol* 186: 2514-2522.
- Siednienko, J., Halle, A., Nagpal, K., Golenbock, D. T. und Miggin, S. M. (2010). TLR3-mediated IFN-beta gene induction is negatively regulated by the TLR adaptor MyD88 adaptor-like. *Eur J Immunol* 40: 3150-3160.
- Siednienko, J., Maratha, A., Yang, S., Mitkiewicz, M., Miggin, S. M. und Moynagh, P. N. (2011b). Nuclear factor kappaB subunits RelB and cRel negatively regulate Toll-like receptor 3-mediated beta-interferon production via induction of transcriptional repressor protein YY1. *J Biol Chem* 286: 44750-44763.
- Suet Ting Tan, R., Lin, B., Liu, Q., Tucker-Kellogg, L., Ho, B., Leung, B. P. und Ling Ding, J. (2013). The synergy in cytokine production through MyD88-TRIF pathways is coordinated with ERK phosphorylation in macrophages. *Immunol Cell Biol* 91: 377-387.
- Takeuchi, O. und Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
- Tan, R. S., Ho, B., Leung, B. P. und Ding, J. L. (2014). TLR cross-talk confers specificity to innate immunity. *Int Rev Immunol* 33: 443-453.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J. und Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 249: 158-175.
- Theiner, G., Rossner, S., Dalpke, A., Bode, K., Berger, T., Gessner, A. und Lutz, M. B. (2008). TLR9 cooperates with TLR4 to increase IL-12 release by murine dendritic cells. *Mol Immunol* 45: 244-252.
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A. und Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3: 920-940.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-146.
- Trinchieri, G. (2010). Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 207: 2053-2063.
- Trinchieri, G. und Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7: 179-190.
- Underhill, D. M. (2007). Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol Rev* 219: 75-87.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. und Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412: 346-351.

- Wang, J. P., Asher, D. R., Chan, M., Kurt-Jones, E. A. und Finberg, R. W. (2007). Cutting Edge: Antibody-mediated TLR7-dependent recognition of viral RNA. *J Immunol* 178: 3363-3367.
- Wang, P., Zhao, W., Zhao, K., Zhang, L. und Gao, C. (2015). TRIM26 negatively regulates interferon-beta production and antiviral response through polyubiquitination and degradation of nuclear IRF3. *PLoS Pathog* 11: e1004726.
- Wenink, M. H., Santegoets, K. C., Broen, J. C., van Bon, L., Abdollahi-Roodsaz, S., Popa, C., Huijbens, R., Remijn, T., Lubberts, E., van Riel, P. L., van den Berg, W. B. und Radstake, T. R. (2009). TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. *J Immunol* 183: 6960-6970.
- Wenzel, J. und Tuting, T. (2008). An IFN-associated cytotoxic cellular immune response against viral, self-, or tumor antigens is a common pathogenetic feature in "interface dermatitis". *J Invest Dermatol* 128: 2392-2402.
- Whitmore, M. M., DeVeer, M. J., Edling, A., Oates, R. K., Simons, B., Lindner, D. und Williams, B. R. (2004). Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 64: 5850-5860.
- Wilson, E. B., Yamada, D. H., Elsaesser, H., Herskovitz, J., Deng, J., Cheng, G., Aronow, B. J., Karp, C. L. und Brooks, D. G. (2013). Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* 340: 202-207.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. und Akira, S. (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. und Akira, S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420: 324-329.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. und Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4: 1144-1150.
- Yoneyama, M. und Fujita, T. (2008). Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity* 29: 178-181.
- Yoneyama, M. und Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 227: 54-65.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. und Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5: 730-737.

- Yoneyama, M., Onomoto, K., Jogi, M., Akaboshi, T. und Fujita, T. (2015). Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol* 32: 48-53.
- Zhu, Q., Egelston, C., Vivekanandhan, A., Uematsu, S., Akira, S., Klinman, D. M., Belyakov, I. M. und Berzofsky, J. A. (2008). Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16260-16265.
- Zhu, Z., Zhang, X., Wang, G. und Zheng, H. (2014). The laboratory of genetics and physiology 2: emerging insights into the controversial functions of this RIG-I-like receptor. *Biomed Res Int* 2014: 960190.

## 9 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

### 9.1 Originalarbeit

Hotz, C., Roetzer, L. C., Huber, T., **Sailer, A.**, Oberson, A., Treinies, M., Heidegger, S., Herbst, T., Endres, S. und Bourquin, C. (2015). TLR and RLR signaling are reprogrammed in opposite directions after detection of viral infection. *J Immunol* 195: 4387-4395.

### 9.2 Poster

C. Hotz, L. Roetzer, T. Huber, **A. Sailer**, S. Heidegger, T. Herbst, S. Endres, C. Bourquin. Viral infection reprograms pattern recognition receptor signaling to augment T<sub>H</sub>1 cell priming. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Mainz, 2013

C. Hotz, L. Roetzer, T. Huber, **A. Sailer**, A. Oberson, M. Treinies, S. Heidegger, T. Herbst, S. Endres, C. Bourquin. Pattern-recognition receptor reprogramming is a host response to viral infection to augment TH1 cell differentiation. 44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Bonn, 2014

C. Hotz, L. Roetzer, T. Huber, **A. Sailer**, A. Oberson, M. Treinies, I. Mottas, T. Herbst, C. Bourquin. Sequential pattern recognition receptor stimulation for cancer immunotherapy. 12th Charles Rodolphe Brupbacher Symposium, Zürich (Schweiz), 2015

C. Hotz, L. Roetzer, T. Huber, **A. Sailer**, A. Oberson, M. Treinies, I. Mottas, T. Herbst, S. Endres, C. Bourquin. Timing and sequence of pattern-recognition receptor stimulation determines efficacy of cancer immunotherapy with TLR ligands. 13th CIMT Annual Meeting, Mainz, 2015

C. Hotz, L.C. Roetzer, T. Huber, **A. Sailer**, A. Oberson, M. Treinies, S. Heidegger, T. Herbst, S. Endres, C. Bourquin. TLR and RLR signaling is reprogrammed in opposite directions after detection of viral infection. TOLL2015 conference, Marbella (Spanien), 2015

### 9.3 Vorträge

#### **A. Sailer.**

Reprogramming of pattern recognition receptor signaling in sepsis and cancer. Immunopharmacology Workshop of the Division of Clinical Pharmacology, Tutzing, 2011

#### **A. Sailer.**

Reprogramming of pattern recognition receptor signaling through poly(I:C). Ergebniskolloquium des Graduiertenkollegs 1202, München, 2012

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. Carole Bourquin für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung und das Vorleben von wissenschaftlicher Exzellenz und Effizienz. Zu tiefem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Professor Stefan Endres für die Aufnahme in die Abteilung für Klinische Pharmakologie und in das Graduiertenkolleg 1202, wodurch sich mir ein einzigartiges Umfeld für die Durchführung dieser Promotionsarbeit bot. Beide förderten meine wissenschaftliche, medizinische und persönliche Entwicklung entscheidend und ihre Unterstützung war für mich von größtem Wert.

Außerordentlich dankbar bin ich auch Dr. Christian Hotz, der mich in das wissenschaftliche Arbeiten einführte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen für die stimulierende Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinen Kommilitonen, Freunden und meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Schwester, deren Rückhalt, Unterstützung und stete Motivation über die Jahre hinweg für das Gelingen dieser Promotion entscheidend war.



## Eidesstattliche Versicherung

**Sailer, Andreas**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Reprogrammierung von Mustererkennungsrezeptor-Signalwegen durch  
Konditionierung mit Lipopolysaccharid und poly(I:C): molekulare Mechanismen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Mittenwald, 26.11.2016**

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand