

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Charakterisierung der immunmodulatorischen Rezeptoren für methylierte Adenosine in Nukleosiden und RNA

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ruben Schleberger

aus Wuppertal

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. Bourquin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. V. Heissmeyer
Prof. Dr. med. T. Knösel

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2015

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1	Einführung	1
1.1.2	Mustererkennungsrezeptoren	2
1.1.2.1	Toll-like-Rezeptoren	2
1.1.2.1.1	Überblick	2
1.1.2.1.2	Signalweg.....	4
1.1.2.2	NOD-like-Rezeptoren und Inflammasome.....	7
1.1.2.2.1	Überblick	7
1.1.2.2.2	Signalweg.....	9
1.1.3	Erkennung bakterieller Bestandteile.....	12
1.1.3.1	Erkennung von Nukleinsäuren	12
1.1.3.2	Erkennung von Oberflächenstrukturen.....	13
1.2	Regulation des Immunsystems durch Adenosin.....	14
1.2.1	Vorkommen und Bedeutung.....	14
1.2.2	Purinerge Rezeptoren Gruppe 1	15
1.2.3	Purinerge Rezeptoren Gruppe 2	17
1.2.4	Erkennung modifizierter Nukleoside.....	18
1.2.4.1	Allgemeines	19
1.2.4.2	Modifizierte Adenosin-Nukleoside	19
1.3	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	21
1.4	Fragestellung.....	22
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Technische Geräte	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	27
2.1.5	Stimuli, Inhibitoren und Zytokine	28
2.1.6	Antikörper	29
2.1.7	Primer.....	29
2.1.8	Reagenziensets.....	30
2.1.9	Software	30
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur.....	30
2.2.1.1	Isolation von Knochenmarkzellen.....	31

2.2.1.2	Generierung von pDCs und Makrophagen	31
2.2.1.3	Kultivierung von Zelllinien	32
2.2.2	Zellstimulationsassays	32
2.2.3	ELISA	33
2.2.4	RNA-Isolation	33
2.2.5	Stimulation mit Bakterienkulturen	34
2.2.6	Magnetische Zellseparation	34
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.8	Statistische Analyse	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Der Signalweg der Erkennung von 2-Methyladenosin	37
3.1.1	Stimulation von Immunzellen mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten.....	39
3.1.2	Stimulation einzelner Stationen des Signalwegs der Adenosin-Rezeptoren.....	40
3.1.3	Inflammasom-Aktivierung durch 2-Methyladenosin	49
3.1.4	Zusammenfassung der Erkenntnisse zur Erkennung von 2-Methyladenosin	51
3.2	Der Einfluss von 2-Methyladenosin auf die Erkennung von bakterieller RNA.....	52
3.2.1	Stimulation von Immunzellen mit Bakterien	54
3.2.2	Stimulation von Immunzellen mit bakterieller RNA	57
4	Diskussion.....	62
4.1	2-Methyladenosin als neues <i>pathogen-associated molecular pattern</i>?	62
4.1.1	Vorkommen und Bedeutung von 2-Methyladenosin	62
4.1.2	Erkennung von 2-Methyladenosin durch Immunzellen	64
4.1.3	Adenosin-Rezeptoren als neue Muster-Erkennungs-Rezeptoren?	65
4.1.4	Von der Erkennung von 2-Methyladenosin zur Sekretion von Interleukin-1 β	68
4.1.4.1	Die Rolle der Adenylylcyclase	68
4.1.4.2	Die Rolle der Proteinkinase A.....	70
4.1.4.3	Die Suche nach dem verantwortlichen Inflammasom.....	72
4.2	Der Effekt von 2-Methyladenosin als Bestandteil von bakteriellen Molekülen	73
4.2.1	Der Einfluss von 2-Methyladenosin auf die Erkennung von Bakterien.....	73
4.2.2	Der Einfluss von 2-Methyladenosin auf die Erkennung bakterieller RNA	76
5	Ausblick und offene Fragen.....	79
6	Zusammenfassung	81
7	Abkürzungsverzeichnis.....	83
8	Abbildungsverzeichnis.....	87
8.1	Abbildungen	87

8.2 Tabellen.....	88
9 Literaturverzeichnis.....	89
10 Appendix.....	100
10.1 Publikationen und Präsentationen	100
10.1.1 Mündliche Präsentationen	100
10.2 Danksagung.....	101

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

1.1.1 Einführung

Seit jeher wird der Verlauf der Geschichte der Menschheit durch Erkrankung und Genesung des menschlichen Körpers mitbestimmt. Die Zellen unseres Körpers sind ständig der Bedrohung durch Mikroorganismen und entartete körpereigene Zellen ausgesetzt. Diese Bedrohung wird durch das Immunsystem kontrolliert. Man unterscheidet bei Vertebraten zwei ineinandergreifende Komponenten der Immunität. Während die angeborene Immunität schon bei einfach strukturierten Mehrzellern gefunden wird, ist die adaptive Immunität evolutionär jünger und spezifisch für höher entwickelte Lebewesen. Charakteristisch für das angeborene Immunsystem ist eine schnelle Immunantwort nach Aktivierung der Zelle durch typische körperfremde molekulare Muster. Beim adaptiven System vergehen drei bis fünf Tage bis zu einer erregerspezifischen Erstantwort, später bildet sich ein auf Gedächtniszellen beruhendes immunologisches Gedächtnis.

Bei den durch das angeborene Immunsystem erkannten Strukturen handelt es sich um *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs, Janeway (1989)). Sie werden von den Immunzellen mittels Mustererkennungsrezeptoren (PRR – *pattern recognition receptors*) gebunden und führen zur Freisetzung von Zytokinen, Phagozytose, Antigenpräsentation sowie zur Aktivierung der adaptiven Immunität. Den Mustern ist gemeinsam, dass sie nur im Mikroorganismus und nicht im Wirt vorkommen. Weiterhin sind sie oft essentiell für Überleben oder Pathogenität der Erreger. Sie sind häufig unveränderlich und in ähnlicher Form oft in ganzen Klassen von Mikroorganismen zu finden (Medzhitov et al. 2000).

Die Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen im Gegensatz zu den Zellen der adaptiven Immunität über verschiedene keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren. Da das Rezeptorspektrum somit wie auch bei vielen nicht-Immunzellen genetisch determiniert ist, ist es bei allen Zellklonen eines Zelltyps gleich. Die Rezeptoren sind Bestandteile verschiedener Subsysteme und können in Protein-Familien wie die *leucine rich receptors* (Kobe et al. 1994), *calcium dependent lectin domains* (Kingeter et al. 2012), *RIG-I-like-Rezeptoren* (Loo et al. 2011),

scavenger receptors (Peiser et al. 2002) und *Toll-like-Rezeptoren* (Kawai et al. 2010; Kawai et al. 2011) eingeteilt werden. Sie liegen als Transmembranrezeptoren im Zytosol oder auch als lösliche sekretierbare Komponenten vor. Lösliche Komponenten wie die Akutphase-Proteine oder Komplement-Faktoren werden von Hepatozyten produziert. Sie führen nach Bindung an die Erreger zu Lyse, Opsonierung oder chemotaktischer Attraktion von Leukozyten.

1.1.2 Mustererkennungsrezeptoren

1.1.2.1 *Toll-like-Rezeptoren*

1.1.2.1.1 *Überblick*

Die am besten charakterisierten Rezeptoren sind die Verwandten der in den 1990er Jahren im Genom der *Drosophila* Fliege entdeckten *Toll*-Rezeptoren (Lemaitre et al. 1996). Diese sogenannten *Toll-like-Rezeptoren* sind Typ-1 Transmembran-Proteine und bestehen aus einer leucinreichen Ektodomäne, einer Transmembran-Region sowie einer zytosolischen Toll-Interleukin-1-Rezeptor Domäne (TIR) (Rock et al. 1998). Während die Ektodomäne für die Erkennung der PAMPs zuständig ist, übernimmt die TIR-Domäne die Kopplung zu nachgeschalteten Signalwegen. TLRs werden sowohl auf der Zelloberfläche, als auch in der Membran von Vesikeln wie Endosomen, Lysosomen, Endolysosomen und dem Endoplasmatischen Retikulum gefunden (zusammengefasst durch Blasius et al. (2010)).

Die TLRs bilden einen der ersten Schutzmechanismen des Immunsystems gegen Erreger. Ihre Aktivierung führt zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine sowie antimikrobieller Peptide und Chemokine. Letztlich führt dies zur Anlockung von Makrophagen und neutrophilen Zellen und somit zur Tötung der eindringenden Mikroben. Weiterhin wird die Maturierung dendritischer Zellen induziert, welche die adaptive Immunantwort koordinieren. Die Rezeptoren werden vornehmlich durch immunaktives Gewebe der Milz, periphere Immunzellen sowie auf Grenzflächen des Körpers, wie Epithelien exprimiert (zusammengefasst durch Kawai et al. (2011)).

Bei Mensch und Maus sind zehn bzw. dreizehn TLRs bekannt. Die Rezeptoren TLR 1 bis 9 sind in beiden Spezies vorhanden, TLR 8 und 10 sind in Mäusen aufgrund einer retroviralen Insertion

nicht funktionell und TLR 11 bis 13 fehlen im menschlichen Genom (Überblick in Kawai et al. (2010)). Die PAMPs, welche der Ektodomäne der TLRs als Liganden dienen, können sowohl bakteriellen, viralen, fungalen als auch parasitären Ursprungs sein. Mittels der Rekrutierung unterschiedlicher Adapterproteine wie MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) oder TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- β*) kann das Immunsystem individuell auf die Bedrohung durch verschiedene Arten von Mikroorganismen reagieren. Die Signalwege differieren sowohl zwischen den einzelnen *Toll-like*-Rezeptor-Typen als auch zwischen Zelltypen. So nehmen zum Beispiel plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) und Monozyten mittels spezifischer Signalwege eine Sonderrolle bei der Generierung antiviraler Immunantworten ein (Colonna et al. 2004).

Zur Untergruppe der Rezeptoren an der Zelloberfläche zählen die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6. Sie erkennen hauptsächlich Bestandteile mikrobieller Membranen, wie zum Beispiel Lipide, Proteine oder Lipoproteine. Die Rezeptoren 3, 7, 8, 9, 11 und 13 werden in der Membran intrazellulärer Vesikel, wie den Endosomen, exprimiert. Ihre intrazelluläre Lage ermöglicht die Erkennung aufgenommener Zellbestandteile und Viren. Autoimmunität wird dadurch vermieden, dass extrazellulär vorliegende Eigen-DNA schnell durch Nukleasen abgebaut wird und nicht in den Intrazellulärraum gelangt (zusammengefasst durch Blasius et al. (2010)). Die Rezeptoren TLR4 und TLR11 werden sowohl auf der Zelloberfläche als auch in vesikulären Strukturen exprimiert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bekanntesten Liganden.

Rezeptorbezeichnung:	Ligand:	Spezies:	Referenz
TLR1	Heterodimer mit TLR2		
TLR2	Diacyllipolypeptide, Triacyllipolypeptide, Zymosan	Mycoplasma Bakterien Pilze	(Takeuchi et al. 2001) (Takeuchi et al. 1999) (Ozinsky et al. 2000)
TLR3	dsDNA	DNA Virus	(Alexopoulou et al. 2001)
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS) Strukturproteine	Bakterien Virus	(Poltorak et al. 1998) (Kurt-Jones et al. 2000)
TLR5	Flagellin	Bakterien	(Hayashi et al. 2001)
TLR6	Heterodimer mit TLR2		
TLR7	ssRNA	RNA Virus	(Hemmi et al. 2002)
TLR8 (human)	ssRNA	RNA Virus	(Heil et al. 2004)
TLR9	CpG DNA DNA Malaria Hämozoïn	Bakterien DNA Virus Parasiten	(Hemmi et al. 2000) (Lund et al. 2003) (Coban et al. 2005)
TLR10 (human)	Unbekannt		
TLR11 (murin)	Unbekannt <i>Profilin like molecules</i>	Uropathogene Bakterien Parasiten	(Zhang et al. 2004) (Yarovinsky et al. 2005)
TLR12 (murin)	Unbekannt		
TLR13 (murin)	Bakterielle RNA	Bakterien	(Hidmark et al. 2012)

Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten Liganden der *Toll-like*-Rezeptoren

1.1.2.1.2 Signalweg

Die *Toll-like*-Rezeptoren dimerisieren nach Bindung ihres spezifischen PAMP-Liganden und setzen eine auf den zu bekämpfenden Mikroorganismus zugeschnittene Immunantwort in Gang. Hierzu leiten die Rezeptoren das Signal durch Rekrutierung von *TIR-domain-containing*-Adapterproteinen weiter. Je nach Adapter lassen sich die Rezeptoren in Subgruppen aufteilen: TLR3 interagiert mit TRIF, alle übrigen Rezeptoren mit dem Protein MyD88. TLR4 kann beide Adapterproteine nutzen (Übersicht des Signalwegs siehe Abb. 1).

MyD88 ist über weitere Zwischenschritte mit NF- κ B (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells*) sowie den MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein*) verknüpft. Ihre Aktivierung

führt zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-10, IL12 und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α).

Das Protein TRIF, welches ausschließlich von TLR3 und TLR4 genutzt wird, kann zusätzlich zu NF- κ B die Faktoren IRF3 und IRF7 (*interferon regulatory factor 3/7*) rekrutieren. Diese bewirken die Ausschüttung von Typ-1-Interferonen (IFN-1) und setzen somit eine antivirale Immunantwort in Gang.

TLR4 nimmt durch die Möglichkeit, sowohl den MyD88- als auch den TRIF-Signalweg zu nutzen, eine Sonderrolle ein. Während die Bindung der übrigen TLRs an MyD88 und TRIF direkt vermittelt wird, benötigt TLR4 zusätzliche zwischengeschaltete Proteine. Die Bindung zu MyD88 stellt es mittels des Adapters TIRAP (*TIR-domain containing adaptor protein*) her. Zwischen TLR4 und TRIF liegt das Protein TRAM (*TRIF-related adapter molecule*). Bindet LPS an den in der Zellmembran lokalisierten Rezeptor, führt dies zunächst zur frühen Aktivierung von MyD88 und somit NF- κ B und den MAP-Kinasen. Anschließend wird das gebundene LPS samt Rezeptor durch Endozytose aufgenommen. In Vesikeln eingeschlossen, aktiviert es über TRAM den TRIF Signalweg mit daraus folgender IFN-1 Produktion. Durch TRAM/TRIF werden zusätzlich erneut NF- κ B und MAP-Kinasen aktiviert. Eine negative Rückkopplung wird durch eine Splicevariante von TRAM, dem Protein TAG (*TRAM-adaptor with GOLD-domain*) gewährleistet. TAG bindet an LPS und unterbricht so die Kopplung mit TRAM/TRIF (Review der bekannten TLR-Signalwege in Kawai et al. (2010)).

Einige Zelltypen sind durch Modifikationen der *Toll-like*-Rezeptor-Signalwege auf die Bekämpfung bestimmter mikrobieller Organismen spezialisiert. Die Erkennung von Nukleinsäuren viralen Ursprungs ist beispielsweise eine wichtige Funktion der plasmazytoiden dendritischen Zellen. Sie sind bei Infektionen für die Ausschüttung von bis zu 95 % des Typ-1-Interferons verantwortlich. Dies ist möglicherweise von großer Bedeutung für die frühzeitige Bekämpfung und Eindämmung eindringender Viren (Pietras et al. 2006; Reizis et al. 2011; Swiecki et al. 2010). Die hohe sekretorische Kapazität der pDCs wird unter anderem durch die Fähigkeit, DNA prolongiert in den frühen Endosomen zu halten, erreicht (Gilliet et al. 2008; Honda et al. 2005). Dieser Mechanismus führt zur ausgiebigen Aktivierung der endosomalen TLRs. TLR7 und TLR9 rekrutieren daraufhin den in pDCs konstitutionell exprimierten Faktor IRF7, welcher nach Phosphorylierung durch IRAK1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) oder IKK α (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha*) vom Proteinkomplex

dissoziiert. Im Zellkern aktiviert er schließlich die für die IFN-1-Ausschüttung notwendigen Gene (Kawai et al. 2010). Konträr zum hohen Expressionsniveau von TLR7 und TLR9 wird in pDCs TLR4 nicht exprimiert. Der TLR4-Ligand LPS, ein Bestandteil gramnegativer Bakterien, führt somit zu keiner Reaktion (Hoshino et al. 1999; Piccioli et al. 2009). Der Fokus der immunologischen Aktivität der pDCs liegt somit eher auf der Erkennung viraler Infektionen (Review der immunologischen Funktion von pDCs in Colonna et al. (2004)).

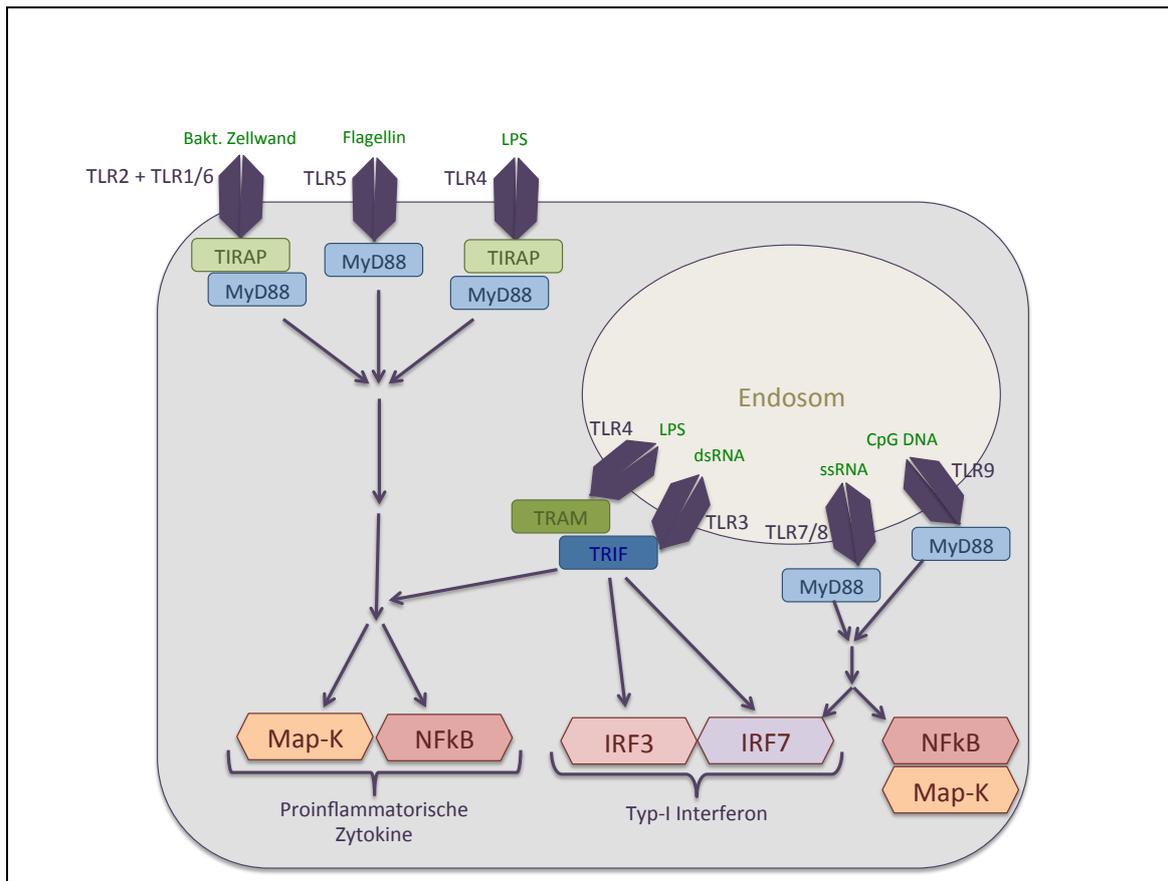


Abbildung 1: Überblick über die Signalwege der *Toll-like*-Rezeptoren.

TLR2, 4, 5, 7, 8 und 9 sind mit dem Adapter-Protein MyD88 verknüpft und führen über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung von NF-κB und MAP-Kinasen. Diese sind für die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine verantwortlich. TLR4 kann, in das Endosom aufgenommen, neben MyD88 auch TRIF aktivieren und somit über Zwischenschaltung von IRF3 die Ausschüttung von Typ-I Interferon bewirken. Plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren nicht TLR4, aktivieren allerdings über TLR7 und 9 den Faktor IRF7 und produzieren über diesen Weg IFN α . TLR3 ist ausschließlich mit TRIF verknüpft und bewirkt somit die Hochregulation der für die Interferon-Produktion verantwortlichen Gene. (Graphik in Anlehnung an Kawai et al. (2011))

1.1.2.2 *NOD-like-Rezeptoren und Inflammasome*

1.1.2.2.1 *Überblick*

Neben den membranständigen *Toll-like-Rezeptoren* liegen weitere Rezeptoren, wie zum Beispiel die *RIG-I-like-Helikasen* (*retinoic acid inducible gene 1 like helicases*; RLHs) oder die *NOD-like-Rezeptoren* (*nucleotide oligomerization domain like receptors*; NLRs), frei gelöst im Zytosol vor. Während die RLHs RIG-I und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) maßgeblich an der Erkennung viraler Nukleinsäuren im Zytoplasma beteiligt sind, erkennen die NLRs ein breites Spektrum sogenannter *danger-associated molecular patterns* (DAMPs). Hierzu gehören Moleküle, die bei Zellstress und -tod frei werden, wie zum Beispiel ATP. Die zwei am besten erforschten NLRs, NOD1 und NOD2, erkennen Peptidoglykane bakterieller Zellmembranen und führen zur Aktivierung pro-inflammatorischer Gene über NF- κ B (Girardin et al. 2003a; Girardin et al. 2003b). Die NLR-Familie besteht bislang aus mehr als 20 humanen und mehr als 30 murinen Rezeptoren (Ting et al. 2008). Die funktionelle und strukturelle Verwandtschaft mit dem Pflanzenprotein R sowie das Vorliegen in Echinoderm Phylum weisen auf den evolutionär alten Ursprung hin.

Die NLRs setzen sich aus drei unterschiedlichen Teilen zusammen. Am C-Terminus befindet sich eine variable *Leucine-rich-repeats*-Domäne, welche als Bindungsstelle zu den DAMPs fungiert. Eine Bindung an spezielle Liganden, wie etwa bei den TLRs, konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Der zentrale Teil wird von einer NACHT-Domäne (NAIP, CIITA, HET-E, TP-1) sowie meist einer NACHT-assoziierten-Domäne (NAD) gebildet. Zusammen sind beide als *Nucleotide-binding*-Domäne (NBD) eng mit der Signaltransduktion durch dNTPasen verknüpft. Anhand der effektorischen Domäne am N-Terminus erfolgt die Klassifizierung der NLRs in Untergruppen NLRA (*acidic activation domain*), NLRB (*Baculovirus inhibitor of apoptosis domain*; BIR), NLRC (*caspase recruitment domain*; CARD), NLRP (*pyrin domain*; PYD) und NLRX (nicht zuzuordnen). Die meisten NLRs gehören zu den Gruppen NLRC und NLRP. Über gruppenspezifische Adapterproteine erfolgt schließlich die Signaltransduktion (Review der NLRs in Chen et al. (2009)).

Eine Sonderrolle nehmen *NOD-like-Rezeptoren*, die gemeinsam mit anderen Proteinkomponenten die sogenannten Inflammasome bilden, ein (zusammengefasst durch Davis et al. (2011)). Diese Proteinkomplexe sind zentrale Elemente des angeborenen Immunsystems.

Die Hauptfunktion der Inflammasome ist die Regulierung der Aktivität von Caspase-1 und damit der Ausschüttung des Zytokins Interleukin-1 β . Ein Überblick über den Signalweg der Inflammasome findet sich in Abbildung 2. IL-1 β ist ein potentes endogenes Pyrogen und Aktivator von Leukozyten und Epithelzellen. Unter anderem induziert es die Expression von Adhäsionsmolekülen und unterstützt dadurch die Immigration der Immunzellen ins Gewebe. Weitere Zytokine, die durch Caspase-1 maturiert werden, sind IL-18, IL-33 und IL-1F7.

Innerhalb der NLR-Familie sind fünf Kandidaten mit der Fähigkeit zur Bildung von Inflammasomen bekannt: NLRP1(b), NLRP3, NLRP6, NLRP12 und NLRC4. Der bekannteste Vertreter, das NLRP3-Inflammasom, reagiert auf zahlreiche DAMPs, wie zum Beispiel ATP, Cholesterin-Kristalle, bakterielle und virale Bestandteile sowie Poren-formende Toxine (Boyden et al. 2006; Lamkanfi et al. 2012; Poyet et al. 2001). Das NLRP1-Inflammasom (in Mäusen NLRP1b) setzt sich als Antwort auf die Stimuli Muramyldipeptid und Anthrax-Toxin zusammen (Boyden et al. 2006). NLRC4 erkennt Flagellin. Weiterhin können sich auch aus nicht zu den NLRs gehörenden Bausteinen Inflammasome zusammensetzen. So wurde 1997 das Protein AIM2 (*absent in melanoma gene 2*) entdeckt, welches zytosolische DNA erkennt und ein Inflammasom bildet (DeYoung et al. 1997). Eine Übersicht über die wichtigsten Liganden der Inflammasome findet sich nachfolgend in Tabelle 2.

Inflammasom:	Ligand:	Referenz:
NLRP1b	<i>Anthrax-lethal</i> -Toxin Muramyldipeptide	(Boyden et al. 2006) (Bruey et al. 2007)
NLRP3	Poren-formende Toxine (Nigericin, Streptolysin) Ionenkanäle bzw. deren Aktivatoren (ATP, Influenza M2 Kanal Protein) Phagozytierte Materialien (Kristalle, kristallines Material, Partikel, Proteinaggregate)	(Mariathasan et al. 2006) (Harder et al. 2009) (Mariathasan et al. 2006) (Ichinohe et al. 2010) (Martinon et al. 2006) (Dostert et al. 2008) (Düwell et al. 2010)
NLRC4 (IPAF)	Flagellin	(Franchi et al. 2006)
NLRP6	Unbekannter Ligand	
NLRP12	Faktor assoziiert mit <i>Yersinia pestis</i>	(Vladimer et al. 2012)
AIM2	dsDNA	(Hornung et al. 2009)

Tabelle 2: Überblick über die wichtigsten Liganden der murinen Inflammasome.

1.1.2.2 Signalweg

Der genaue Mechanismus der Aktivierung von Inflammasomen ist bislang unklar. Beispielsweise scheinen für das NLRP3-Inflammasom aufgrund der verschiedenen Arten von DAMPs mehrere Mechanismen möglich zu sein. So gibt es Hinweise darauf, dass die Bildung sowohl durch reaktive Sauerstoff-Metabolite als auch die Ruptur von Phagolysosomen oder durch Porenbildung in der Plasmamembran ausgelöst wird. Letztere Theorie wird durch die Tatsache bestärkt, dass sich das Inflammasom nicht zusammensetzt, wenn der Kaliumefflux durch die Poren mittels einer hyperosmolaren Kaliumlösung blockiert wird (Lamkanfi et al. 2012). Dies scheint auch für NLRP1, NLRC4 und AIM2 zu gelten (Arlehamn et al. 2010; Fink et al. 2008; Muruve et al. 2008; Perregaux et al. 1994). Vor wenigen Jahren entstand eine vierte, bislang nicht bestätigte Hypothese. Die Gruppe um Geun-Shik Lee postulierte, auch der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration sowie der Abfall des cAMP-Spiegels (cycloAdenosinmonophosphat) führe zur Aktivierung (Lee et al. 2012). Dies könnte eine Verbindung zu den unten besprochenen Adenosin-Rezeptoren darstellen, die sowohl Calcium-Konzentration als auch cAMP-Spiegel beeinflussen.

Die Inflammasom-bildenden NLRs einer Subgruppe liegen im Zytoplasma häufig als Di- oder Multimere vor. Nach Erkennung des spezifischen Liganden assemblieren spontan die Komponenten des Inflammasoms: Über eine CARD-CARD Bindung können die NLRs Kontakt zur proCaspase-1 aufnehmen. Die CARD-Domäne liegt lediglich bei NLRs, die zur NLRC-Familie gehören sowie im murinen NLRP1b vor. Inflammasome mit Pyrin-Domäne benötigen für die Verbindung zur proCaspase-1 daher den Adapter ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD-domain*). Die räumliche Nähe, die durch die Verbindung von NLR, ASC und proCaspase-1 hergestellt wird, ermöglicht die autoproteolytische Teilung von proCaspase-1 in seine aktiven Fragmente. Die abgespaltene Caspase-1 trennt schließlich das reife Zytokin Interleukin-1 β von der Vorstufe Pro-Interleukin-1 β ab. Eine graphische Darstellung des Signalwegs am Beispiel des NLRP3-Inflammasoms findet sich in Abbildung 2.

Interleukin-1 β ist einer der zentralen Mediatoren der Immunantwort. Es ist essentiell für die Resistenz gegenüber Pathogenen und birgt dabei gleichzeitig das Potential chronisch-entzündliche Erkrankungen zu exazerbieren und den Wirt zu schädigen. Die Sekretion von IL-1 β

muss daher streng überwacht werden, um Schäden am Gewebe durch überbordende Inflammation zu verhindern (Bauernfeind et al. 2011). Dies wird durch drei Mechanismen erreicht:

1. proIL-1 β wird nicht konstitutionell, sondern nur als Antwort auf inflammatorische, NF κ B-abhängige Signale, wie zum Beispiel die Erkennung von LPS durch den *Toll-like*-Rezeptor 4 bereitgestellt.
2. Reifes IL-1 β verfügt über kein spezifisches sekretorisches Signalpeptid. Bislang ist unklar, wie die Sekretion genau vonstattengeht. Möglicherweise erfolgt sie z.B. mittels spezialisierter sekretorischer Lysosomen oder durch *shedding* IL-1 β enthaltender Mikrovesikel von der Plasmamembran (Andrei et al. 1999; MacKenzie et al. 2001).
3. Die Bestandteile der Inflammasome, welche zur Aktivierung der IL-1 β -Vorstufe führen, werden streng reguliert.

Es sind mehrere Enzyme bekannt, die unabhängig von Inflammasomen das biologisch aktive IL-1 β freisetzen können. Es handelt sich unter anderen um die in Neutrophilen exprimierten Proteine Kathepsin G, Neutrophilen-Elastase und die Proteinase 3 (Black et al. 1991; Hazuda et al. 1990). Des Weiteren besitzen die Mastzell-Enzyme Granzym A und Chymase die Funktion proIL-1 β zu maturieren (Irmiler et al. 1995; Mizutani et al. 1991). Dies spielt insbesondere bei der Entstehung der akuten Neutrophilen-predominanten Arthritis eine Rolle (Guma et al. 2009).

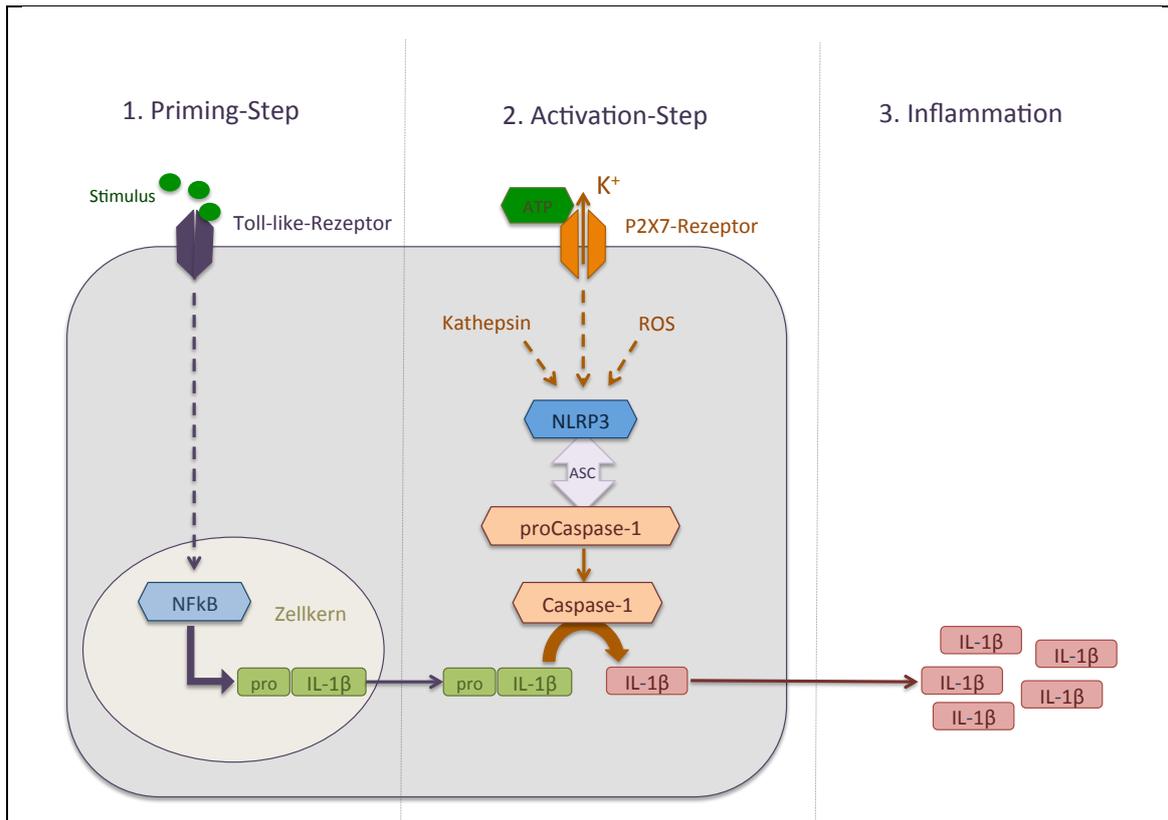


Abbildung 2: Überblick über Aktivierung und Signalwege der Inflammation am Beispiel des NLRP3-Inflammasoms.

Die Expression der einzelnen Bestandteile der Inflammation wird in den Zellen streng reguliert. Zunächst führt Stimulation von PRRs oder Zytokinrezeptoren zur verstärkten Expression der Untereinheiten sowie von proIL-1 β (*Priming-Step*). Die Zusammensetzung und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wird erst durch einen zweiten Vorgang (*Activation-Step*) initiiert. Dieser wird durch Stimuli, wie Poren-formende Toxine, ATP, oder mikrobielle RNA gestartet. Der schlussendliche molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, man geht jedoch davon aus, dass die Stimuli zu Kalium-Efflux, ROS-Produktion oder der Freisetzung lysosomaler Enzyme führen. Die Aktivierung des Inflammasoms geht schließlich mit der Rekrutierung von proCaspase-1 über das Adapterprotein ASC einher. proCaspase-1 aktiviert sich daraufhin autoproteolytisch und spaltet das bioaktive, reife IL-1 β von der Vorstufe proIL-1 β ab (Graphik in Anlehnung an Bauernfeind et al. (2011)).

1.1.3 Erkennung bakterieller Bestandteile

1.1.3.1 Erkennung von Nukleinsäuren

Die oben genannten Rezeptoren dienen der Erkennung verschiedenster Bestandteile von Mikroorganismen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Erkennung und Wirkung von bakteriellen Bestandteilen. Im Folgenden erfolgt eine Beschreibung der Funktion der wichtigsten Erkennungsmechanismen bakterieller Molekülstrukturen.

Die Erkennung von Nukleinsäuren mikrobiellen Ursprungs ist essentiell für die Gesundheit des Wirtorganismus. Sie ermöglicht den rechtzeitigen Start einer angemessenen Immunantwort. Ebenso wichtig ist es allerdings auch, eine überschießende Reaktion auf körpereigene Antigene zu vermeiden (zusammengefasst durch Gurtler et al. (2013)). Zur Unterscheidung zwischen körpereigenen bzw. -fremden Nukleinsäuren dienen unter anderem spezifische Nukleosidmuster und Nukleosidmodifikationen. Diese können als *pathogen-associated molecular patterns* für die *Pattern recognition*-Rezeptoren fungieren, oder auch die Reaktion auf körpereigenes Material verhindern (Jockel et al. 2012; Li et al. 2012).

Für die Erkennung bakterieller RNA sind sowohl Rezeptoren aus der TLR-Familie als auch zytosolische RNA-Helikasen zuständig. Während TLR3 doppelsträngige RNA bindet, reagieren TLR7 und 8 auf GU-reiche, einzelsträngige RNA und RNA-Oligonukleotide wie das artifizielle R848 (Alexopoulou et al. 2001; Hemmi et al. 2002). Vor wenigen Jahren wurde bakterielle RNA (*S. aureus*) auch als Stimulus für TLR13 entdeckt (Hidmark et al. 2012). Hidmark et al. konnten zeigen, dass die Ausschüttung von IL-6 und IL-12p40 signifikant sinkt, wenn die Expression von TLR13 in dendritischen Zellen durch siRNA gehemmt wird. Als spezifische Zielstruktur des Rezeptors wurden Nukleosidmuster in der bakteriellen 23s rRNA ausgemacht (Li et al. 2012; Oldenburg et al. 2012). Wird ein PAMP durch die Toll-like-Rezeptoren erkannt, kann dies über die Adapterproteine MyD88 oder TRIF zur Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6 oder IFN α /b führen. Diese wiederum aktivieren die Abwehrmechanismen des Wirts.

Weitere Proteine, die als Rezeptoren für fremde Nukleinsäuren dienen, sind die *RIG-I-like helicases*. Sie erkennen im Zytoplasma befindliche ss/dsRNA mit 5'-Triphosphat-Ende (Überblick in Loo et al. (2011)). Möglicherweise erkennen sie auch bakterielle RNA, die diese Kriterien erfüllt. So werden beispielsweise Listerien, die im Zytosol von Zellen Nukleinsäuren sezernieren,

durch RIG-I und MDA5 erkannt (Abdullah et al. 2012; Pietras et al. 2006). Auch bestimmte *NOD-like*-Rezeptoren können durch mikrobielle Nukleinsäuren aktiviert werden. Kanneganti et al. (2006) konnten zeigen, dass NLRP3 nicht nur durch bakterielle Toxine, sondern auch durch RNA von *E. coli* Bakterien stimuliert wird. Dies führt, wie oben beschrieben, zur Ausschüttung von IL-1 β und IL-18.

Weniger erforscht ist die Erkennung bakterieller DNA. Neben TLR9, der bakterielle und virale DNA anhand von hypomethylierten Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG)-Inseln erkennt, gibt es mindestens fünf weitere intrazelluläre Rezeptoren, die Nukleinsäuren erkennen (Hemmi et al. 2000; Sharma et al. 2011). Hierzu zählt zum Beispiel das AIM2-Inflammasom (DeYoung et al. 1997). AIM2 nimmt eine Sonderrolle unter den Inflammasomen ein, da ihm mit dsDNA ein spezifischer Ligand zugeordnet werden kann. Neben der Herkunft der DNA hat auch ihre Lokalisation großen Einfluss auf das aktivierte Rezeptorspektrum. Im Zytosol vorliegendes virales Genmaterial ruft somit eine andere Immunantwort hervor als phagozytierte bakterielle Nukleinsäuren.

1.1.3.2 Erkennung von Oberflächenstrukturen

Neben der Erkennung von Nukleinsäuren dienen zahlreiche Rezeptoren der Erkennung bakterieller Oberflächenstrukturen. Besonders immunoaktiv wirken die Zellwände der Mikroorganismen. TLR2 kann -je nach Zusammenspiel mit TLR1, TLR6, Dectin-1 oder CD36- unterschiedliche Bakteriengruppen erkennen (Brown et al. 2003; Kawai et al. 2009; Takeuchi et al. 1999; Takeuchi et al. 2001). Die Kombination TLR2-TLR1 bindet triacylierte Lipopeptide, wie sie in gramnegativen Bakterien vorkommen. Das Heterodimer TLR2-TLR6 erkennt diacylierte Lipopeptide grampositiver Bakterien. Durch *Toll-like*-Rezeptor 4 können an der Zelloberfläche Lipopolysaccharide, Membranbestandteile von gramnegativen Bakterien, gebunden werden (Poltorak et al. 1998). Flagellin aktiviert TLR5 (Hayashi et al. 2001). Für TLR11, der im murinen Urogenitaltrakt hoch exprimiert, uropathogene Bakterien erkennt, sind außer *Toxoplasma-gondii*-profilin-linked-Molekülen noch keine spezifischen PAMPs bekannt (Yarovinsky et al. 2005; Zhang et al. 2004).

Neben den TLRs reagieren auch Mitglieder der NLR-Familie auf PAMPs der bakteriellen Zelloberfläche. NLRC1 und NLRC2 erkennen degradierte bakterielle Peptidoglykane (PGN) und

aktivieren als Folge NF κ B und MAP-Kinasen (Girardin et al. 2003a; Girardin et al. 2003b). Auch NLRP1 erkennt PGN-Abbauprodukte, bildet daraufhin ein Inflammasom und führt zur Maturierung von IL-1 β (Faustin et al. 2007). Flagellin wird neben *Toll-like*-Rezeptoren auch von NLRC4 (IPAF-Inflammasom) erkannt und bewirkt via Caspase-1 die Ausschüttung von IL-1 β . Durch das NLRP3-Inflammasom führen zahlreiche, zum Teil sehr unterschiedliche Muster zur Zytokin-Ausschüttung. Unter anderem induzieren porenbildende bakterielle Toxine wie Streptolysin und Listerolysin O seine Aktivierung (Lamkanfi et al. 2012).

Zahlreichen Rezeptoren des Immunsystems rufen die Aktivierung von Zellen und damit Inflammation hervor. Gleichzeitig gibt es aber auch Mechanismen die vor überbordenden Entzündungsreaktionen schützen sollen. Adenosin nimmt hierbei als ubiquitär vorkommendes Molekül eine wichtige regulatorische Rolle ein.

1.2 Regulation des Immunsystems durch Adenosin

1.2.1 Vorkommen und Bedeutung

Als essentieller Bestandteil im Energiehaushalt sowie als Baustein der Nukleinsäuren nimmt das Purin-Nukleosid Adenosin in allen Lebewesen und in jeder Zelle eine unersetzliche, elementar wichtige Rolle ein. Neben diesen Funktionen hat es jedoch auch weit spezifischere Aufgabenfelder als *second messenger*, Transmitter und Modulator in zahlreichen Gewebetypen. So wurde im Jahr 1929 erstmals die Wirkung von Adenosin auf das kardiovaskuläre System beschrieben (Drury et al. 1929). Im Herzen – freigesetzt bei ischämischer oder hypoxischer Stoffwechsellage – wirkt es als Vasodilatator und erhöht die Blutzufuhr der Kardiomyozyten. Weiterhin hat es negativ inotrope Wirkung und senkt den Sauerstoffverbrauch des Gewebes (Linden 2001). Diese regulierende und der Homöostase dienliche Funktion übt Adenosin jedoch nicht nur im kardiovaskulären System, sondern auch in Bezug auf Inflammation und Immunität aus. Hier dient Adenosin als Warnmolekül. Es sammelt sich bei Zellschädigung, metabolischem Stress oder Hypoxie sowohl intrazellulär im Zytosol als auch im Extrazellulärraum an und wirkt sowohl autokrin als auch parakrin auf umgebendes Gewebe. Durch seine immunsuppressive Wirkung verhindert es überschießende Immunantworten und autoimmune Schädigung der Zellen (Lukashev et al. 2004). Bei entzündlichen Prozessen steigt die Adenosin-Konzentration im Extrazellulärraum von normalerweise unter 1 μ M auf bis zu 100 μ M an. Ursache hierfür ist zum

einen die Freisetzung von Vorstufen wie AMP oder ADP beim Untergang von Gewebe. Diese werden durch die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 zu Adenosin umgewandelt. Zum anderen wird durch erhöhten Energieverbrauch auch im Intrazellulärraum durch die 5'-Nukleotidase vermehrt ATP zu Adenosin dephosphoryliert. Dadurch steigt der intrazelluläre Adenosin-Spiegel und das Nucleosid kann durch spezialisierte Adenosin-Transporter ausgeschleust werden (Hasko et al. 2008).

1.2.2 Purinerge Rezeptoren Gruppe 1

Adenosin entfaltet viele seiner Wirkungen an den vier purinergen P₁-Rezeptoren (Fredholm et al. 2001a). Diese gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren und liegen mit ihren sieben Transmembran-Domänen in die Zellmembran eingebunden vor. Ursprünglich wurden die Rezeptoren anhand ihrer Fähigkeit, den intrazellulären cAMP-Spiegel zu verändern, in zwei Gruppen eingeordnet. Während die A₁-Rezeptoren (A₁-R) über eine Hemmung der Adenylylcyclase den cAMP-Spiegel senken, stimuliert die A₂-R Gruppe die Adenylylcyclase und erhöht cAMP somit. Der später entdeckte A₃-Rezeptor wirkt ebenfalls hemmend auf die Adenylylcyclase. Des Weiteren erfolgte die Aufgliederung der Gruppe A₂ in den hochaffinen A_{2A}- und den niedrigaffinen A_{2B}-Rezeptor. Mittlerweile sind neben den ursprünglichen Signalwegen auch mehrere cAMP-unabhängige Pfade bekannt (Zusammengefasst durch Schulte et al. (2003) sowie Verzijl et al. (2011)). Ein Überblick über die kanonischen Adenosin-Rezeptor-Signalwege findet sich untenstehend in Abbildung 3.

Der A₁-Rezeptor ist in Immunzellen -nach bisherigem Wissensstand- lediglich mit inhibitorischen G-Proteinen (G_i) verknüpft. Die resultierende Hemmung der Adenylylcyclase führt zur Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration. In anderen Zellarten sind zusätzlich mehrere, mit beispielsweise der PKC (Proteinkinase C) oder Kalium-Kanälen verknüpfte Wege bekannt. Der A₃-Rezeptor ist ebenfalls mit einem G_i-Protein verknüpft. Zusätzlich kann er über G_q die Phospholipase C aktivieren. Weitere Verbindungen, unter anderem zu MAP-Kinasen, Phospholipase D und Wnt sind wahrscheinlich (Hasko et al. 2008).

Der kanonische Signalweg des A_{2A}-Rezeptors beginnt mit der Aktivierung eines stimulatorischen G-Proteins. G_s stimuliert die Adenylylcyclase, welche den cAMP-Spiegel erhöht. Durch cAMP aktiviert, phosphoryliert die Proteinkinase A den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) und aktiviert diesen. CREB vermittelt die anti-inflammatorische Wirkung

des A_{2A} -Rezeptors, indem es mit $\text{NF}\kappa\text{B}$ um das Adapter-Protein CBP (*CREB-binding protein*) konkurriert. Dieses wird für die inflammatorische Reaktion benötigt. Die Wirkung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ wird so abgeschwächt und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine vermindert. Weitere Funktionen des A_{2A} -Rezeptors beschränken sich auf spezifische Zelltypen. Neben dem kanonischen Weg über die G-Proteine sind zahlreiche alternative Verschaltungen bekannt. Sie gehen vom 120 Aminosäuren langen und hochkonservierten C-Terminus des Rezeptors aus. Dort können verschiedene Proteine wie TRAX (*translin-associated protein X*), ARNO (*arf nucleotide site opener*) oder Aktinin binden. In Fibroblasten führt die Aktivierung -vermittelt durch die MAP-Kinasen- zur Erhöhung der Kollagen-Produktion. In Granulozyten wird die Superoxid-Produktion durch Aktivierung von Proteinphosphatasen inhibiert. Weiterhin konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass A_{2A} -R zur Sekretion von Interleukin-10 führt (Fredholm et al. 2007).

Der A_{2B} -Rezeptor unterscheidet sich vom A_{2A} -R durch eine geringere Affinität zu Adenosin. Während sich die EC_{50} -Werte (Konzentration des Liganden die zum halbmaximalen Effekt führt) der A_1 -, A_3 - und A_{2A} -Rezeptoren zwischen $0,01 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ bewegen, liegt die EC_{50} des A_{2B} -Rezeptors bei $24 \mu\text{M}$ (Fredholm et al. 2001b). Bei niedrigem Adenosin-Spiegel in gesundem Gewebe bindet Adenosin also vornehmlich an den A_{2A} -R. Neben der Verknüpfung zu einem G_s -Protein hat A_{2B} -R auch die Möglichkeit über G_q die Phospholipase C zu aktivieren. Das Zusammenspiel beider Signalwege wird beispielsweise für die Produktion von IL-4 durch humane Mastzellen benötigt (Ryzhov et al. 2006). Bei Versuchen mit dem A_{2A} -Antagonisten MRS1754 sowie mit gendefizienten Mäusen zeigte sich jedoch, dass ein vorhandener A_{2A} -Rezeptor die Wirkung von A_{2B} überlagert bzw. maskiert (Hasko et al. 2008).

Die Expression der Adenosin-Rezeptoren schwankt stark auf den unterschiedlichen Zelltypen. Je nach Reifegrad der Zellen können sowohl Subtypen als auch Gesamtzahl der Rezeptoren differieren. So werden auf unreifen myeloiden und plasmazytoiden dendritischen Zellen zunächst hauptsächlich A_1 -R und A_3 -R exprimiert (Panther et al. 2001; Schnurr et al. 2004). Über die Mobilisation von Calciumvorräten bewirken sie eine Reorganisation des zellulären Aktins. Dadurch erhöht sich die Mobilität der Zelle und somit die Fähigkeit zu Entzündungsherden zu wandern. In reifen dendritischen Zellen verschiebt sich das Expressionsspektrum zugunsten von A_{2A} -R und verhindert so eine überschießende Immunantwort (Panther et al. 2001; Schnurr et al. 2004). Auch der Aktivierungsstatus der Zellen wirkt sich auf die Transkription der Gene für die P_1 -Rezeptoren aus. So erhöht sich bei Stimulation muriner und humaner Makrophagen mit LPS die

Produktion der mRNA des A_{2A}-Rezeptors innerhalb weniger Stunden um das Hundertfache. Dieser Effekt wird durch NFκB vermittelt (Murphree et al. 2005).

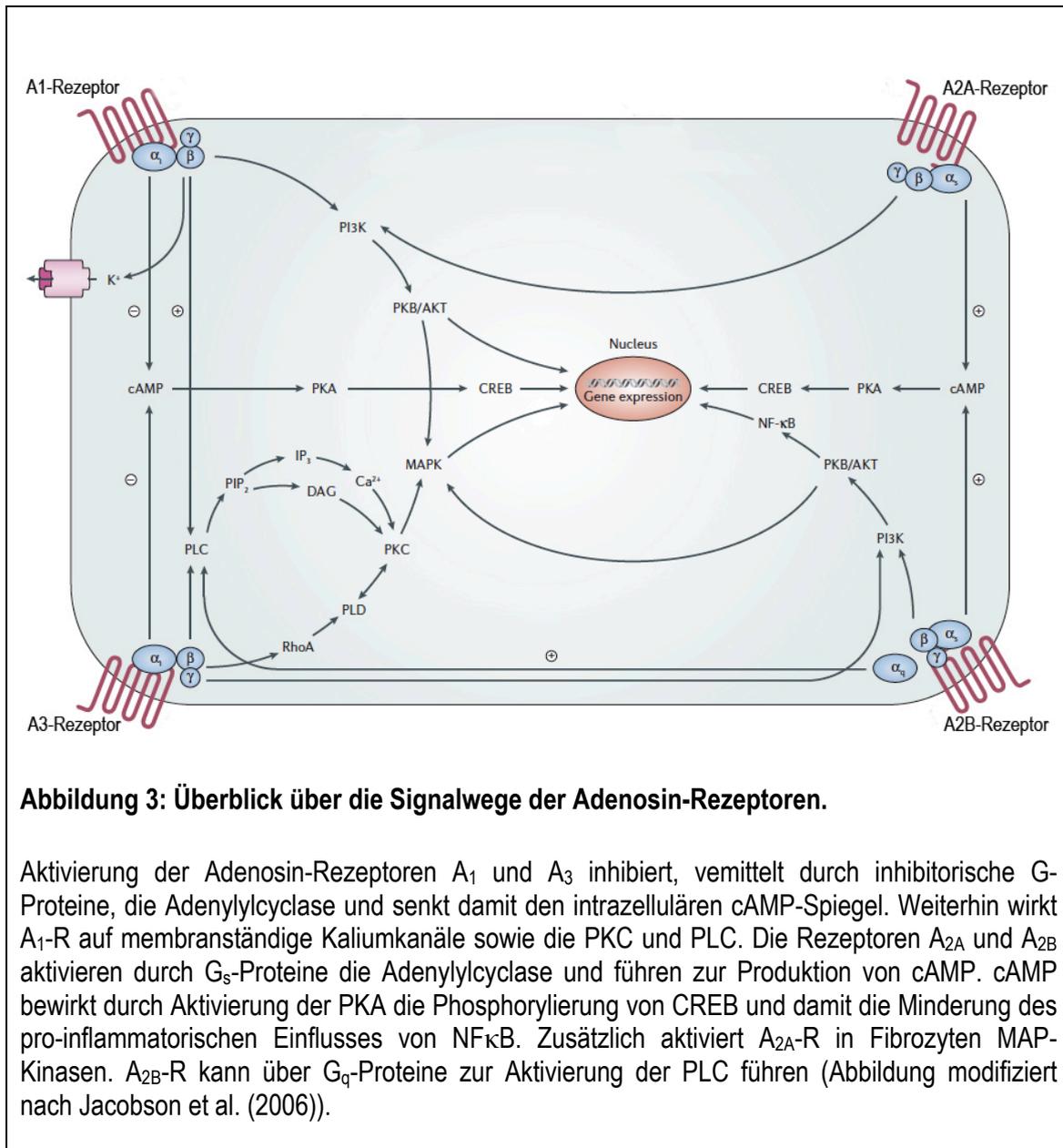


Abbildung 3: Überblick über die Signalwege der Adenosin-Rezeptoren.

Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren A₁ und A₃ inhibiert, vermittelt durch inhibitorische G-Proteine, die Adenylcyclase und senkt damit den intrazellulären cAMP-Spiegel. Weiterhin wirkt A₁-R auf membranständige Kaliumkanäle sowie die PKC und PLC. Die Rezeptoren A_{2A} und A_{2B} aktivieren durch G_s-Proteine die Adenylcyclase und führen zur Produktion von cAMP. cAMP bewirkt durch Aktivierung der PKA die Phosphorylierung von CREB und damit die Minderung des pro-inflammatorischen Einflusses von NFκB. Zusätzlich aktiviert A_{2A}-R in Fibrozyten MAP-Kinasen. A_{2B}-R kann über G_q-Proteine zur Aktivierung der PLC führen (Abbildung modifiziert nach Jacobson et al. (2006)).

1.2.3 Purinerge Rezeptoren Gruppe 2

Neben den klassischen P₁-Adenosin-Rezeptoren gibt es zwei Untergruppen purinerge Rezeptoren der Gruppe 2 (P₂-Rezeptoren). Man unterscheidet ionotrope P_{2X}-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte P_{2Y}-Rezeptoren (Khakh et al. 2001; von Kugelgen 2006). Die Rezeptoren der sieben Mitglieder beinhaltenden Gruppe der P_{2X}-Rezeptoren liegen *in vivo* als Oligomere vor. Alle

P_{2X}-Rezeptoren sind, im Gegensatz zu den multiple Liganden bindenden P_{2Y}-Rezeptoren, hauptsächlich affin für ATP. Sie bilden Kationenkanäle, deren Selektivität für spezifische Ionen sich zwischen den Subtypen unterscheidet. Der bekannteste Rezeptor-Subtyp ist der P_{2X7}-Rezeptor (Valera et al. 1994). Die Bindung von ATP an diesen aktiviert über das NLRP3-Inflammasom die Caspase-1 und führt zur Sekretion von IL-1 β . Dieser Effekt wird möglicherweise durch den Ausstrom von Kalium vermittelt, da er durch Erhöhen der extrazellulären K⁺-Konzentration verhindert werden kann (Walev et al. 1995). Der P_{2X7}-Rezeptor hat mit etwa 100 μ M die höchste EC₅₀ innerhalb der Subgruppe. Die P_{2X}-Rezeptoren werden auf zahlreichen Zelltypen exprimiert und beeinflussen neben der angeborenen Immunität auch die Funktion von glatten Muskelzellen und neuronaler Transmission (Überblick in Boeynaems et al. (2005)).

Die acht P_{2Y}-Rezeptoren werden wie die P_{2X}-Rezeptoren auf zahlreichen Zelltypen exprimiert. Sie können neben ATP auch durch ADP, UDP und UTP aktiviert werden. Die Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt und vermitteln Effekte im Bereich der Aggregation von Thrombozyten und der Hämostase sowie der Steuerung der Chlorid-Sekretion in Atemwegen und Gastrointestinaltrakt. Kürzlich wurden für humane Rezeptoren auch ein Einfluss auf die Zytokin-Sekretion und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten entdeckt (Gabel 2007). Studien zur Übertragbarkeit auf die murinen P_{2Y}-Rezeptoren stehen noch aus (Überblick in von Kugelgen (2006)).

1.2.4 Erkennung modifizierter Nukleoside

Nukleoside liegen *in vivo* nicht nur in ihrer unveränderten Reinform vor. Nahezu alle Lebewesen modifizieren Nukleinsäuren posttranskriptional, um so zum Beispiel die Bindungseigenschaften an Rezeptoren zu verändern. Während der Fokus bislang zumeist auf Methylierungen von DNA lag, rückt nun auch das Modifikationsspektrum der RNA vermehrt in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.

1.2.4.1 Allgemeines

Art und Ausmaß der Modifikationen unterscheiden sich stark bei Pro- und Eukaryoten. Unabhängig vom Ursprung ist tRNA die am stärksten modifizierte Unterart der RNA. Die tRNA von Säugetieren hat mit bis zu 25 % der Gesamtbasenzahl deutlich mehr modifizierte Nucleoside als bakterielle tRNA (Kariko et al. 2005). Humane ribosomale RNA enthält verglichen mit bakterieller rRNA die 25-fache Menge an 2'-O-methylierten-Nucleosiden sowie die zehnfache Menge an Pseudouridin (Zhao et al. 2004). Während die prokaryotische mRNA keinerlei Modifikationen aufweist, finden sich in eukaryotischer mRNA unter anderem 5-Methylcytidin, N6-Methyladenosin und 2'-O-methylierte Nucleoside.

Im Hinblick auf die immunogene Wirkung der Nucleinsäuren von Mikroorganismen spielen Zahl und Typ der Nucleosidmodifikationen eine wichtige Rolle. Die Erkennung der Nucleinsäuren durch das Immunsystem kann durch die An- oder Abwesenheit bestimmter Modifikationen moduliert werden. Befinden sich in RNA-Sequenzen Anzeichen für einen eukaryotischen Ursprung, wie zum Beispiel spezielle Modifikationen oder eine hohe Zahl modifizierter Nucleoside, vermindert dies das immunogene Potenzial der RNA (Kariko et al. 2005).

1.2.4.2 Modifizierte Adenosin-Nucleoside

Obwohl die Zahl modifizierter Nucleoside im Verhältnis zur Gesamtzahl der Basen in prokaryotischen Nucleinsäuren insgesamt geringer ist als in Eukaryoten, finden sich einige der insgesamt mehr als 100 unterschiedlichen Modifikationen ausschließlich in bakterieller RNA (Cantara et al. 2011; Dunin-Horkawicz et al. 2006).

E. coli Bakterien produzieren die Modifikation 2-Methyladenosin (m2A), welche nicht in Eukaryoten vorkommt (Bruckl et al. 2009; Juhling et al. 2009; Rozenski et al. 1999). Sie wird sowohl in der r- als auch in der tRNA der Bakterien gefunden. In der 23S-Untereinheit der rRNA befindet sich m2A an Position 2503 (Kowalak et al. 1995; Toh et al. 2008). Es ist Teil des *central loops* der Domäne V. Diese ist in die Interaktion von t- und rRNA involviert. *E. coli* tRNA enthält insgesamt etwa 120 Moleküle m2A pro μmol (Bruckl et al. 2009). Es wird hier unter anderem an Position 37 der tRNA^{Arg}_{ICG}, tRNA^{Asp}_{QUC}, tRNA^{Gln}_{cmnm5s2UUG}, tRNA^{Gln}_{CUG}, tRNA^{Glu}_{mnm5s2UUC} und

tRNA^{His}_{QUAG} gefunden (Bruckl et al. 2009; Cantara et al. 2012; Dunin-Horkawicz et al. 2006; Machnicka et al. 2013; Saneyoshi et al. 1972).

Für die Methylierungen der r- als auch der tRNA ist vermutlich die Methyltransferase RlmN (*yfgB*) verantwortlich (Benitez-Paez et al. 2012; Toh et al. 2008). Unklar ist, ob auch TrmG (*yfiF*) eine Rolle spielt (Tkaczuk et al. 2007). Analysen der Proteinstruktur weisen jedoch darauf hin, dass TrmG womöglich Methylierungen der Nucleoside an der zweiten Hydroxygruppe der Ribose (2'-O-Methylierungen) durchführt. Bei der Herstellung von m²A hingegen wird das zweite Kohlenstoffatom methyliert.

Die Funktion der Modifikation ist noch nicht abschließend geklärt, es gibt jedoch deutliche Hinweise, dass sich die Überlebensfähigkeit der Bakterien ohne m²A verringert. Zwar verändert sich die Teilungszeit von Bakterien mit Knockout von RlmN nur marginal im Vergleich zu Wildtyp-Bakterien, in Simultankultur sinkt der Anteil der gendefizienten Bakterien jedoch signifikant (Toh et al. 2008). Er betrug nach 50 Teilungen lediglich 6 %. Ursächlich hierfür könnte sein, dass 2-Methyladenosin an der Position 2503 der rRNA für das *proof-reading* wichtig ist (Benitez-Paez et al. 2012). In Bakterien mit Knockouts von RlmN kommt es daher häufiger zu Lesefehlern an einem UAG Stopcodon im Rahmen eines *nonsense readthrough assay* und zu Fehlern bei der Translation. Das m²A Molekül in der tRNA scheint konträr hierzu die Lesegenauigkeit eher zu verringern. So wurde bei alleinigem Fehlen von m²A in der tRNA eine erhöhte Stabilität der Codon-Anticodon-Bindung beobachtet. Benitez-Paez et al. (2012) konnten jedoch zeigen, dass insgesamt der die Lesegenauigkeit verbessernde Effekt des m²A als Teil der rRNA überwiegt.

Weiterhin zeigte sich bei Versuchen mit gendefizienten Bakterien, dass *E. coli* Bakterien ohne m²A in der rRNA empfindlicher auf Antibiotika wie Hygromycin A, Sparsomycin und Tiamulin reagieren (Toh et al. 2008).

Neben rein bakteriellen Modifikationen wie m²A gibt es auch modifizierte Adenosin-Nucleoside, die sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vorkommen. Hierzu zählt N⁶-Methyladenosin (m⁶A). In *E. coli* sind in der rRNA m⁶A-Nucleoside an zwei Positionen bekannt (Golovina et al. 2012). Weiterhin können in der tRNA ca. 30 m⁶A Moleküle pro pmol sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten gefunden werden (Bruckl et al. 2009). In Analysen der humanen und murinen RNA-Methylome zeigt sich, dass m⁶A die häufigste Modifikation in mRNA ist. Insgesamt konnten im humanen Transkriptom über 12000 m⁶A Modifikationen kartiert werden (Dominissini et al. 2012).

1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Wie oben beschrieben erkennt das angeborene Immunsystem potentielle Krankheitserreger anhand von *pathogen-associated molecular patterns*, evolutionsbiologisch konservierten, molekularen Strukturen. Gelangen diese Erregerbestandteile in Kontakt mit den Mustererkennungsrezeptoren, können sie eine Immunantwort auslösen. Unser Interesse bei diesem Projekt galt insbesondere der immunologischen Funktion von bakteriellen Nucleosid-Molekülen. Die Wirkung von Adenosin als Immunmodulator wurde bereits vielfach beschrieben. Bei Zellschädigung, zum Beispiel im Rahmen einer Hypoxie, hat es einen eher hemmenden Effekt auf das Immunsystem. Dadurch trägt es zur Verminderung von Autoimmunität und überschießenden Immunantworten bei. Bei der Bekämpfung von Erregern kommt das Immunsystem jedoch auch mit Adenosin-Nucleosiden in Kontakt, die durch Bakterien spezifisch modifiziert wurden. Zu diesen Modifikationen gehört das Molekül 2-Methyladenosin, welches lediglich in Prokaryoten und nicht in Eukaryoten gefunden wird. In den Vorarbeiten dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob sich die immunstimulatorische Wirkung bakteriell modifizierter Adenosin-Moleküle wie 2-Methyladenosin vom Effekt körpereigener Nucleosidmodifikationen unterscheidet.

In ersten Versuchen stimulierten wir murine Immunzellen mit unterschiedlichen Adenosin-Modifikationen. 2-Methyladenosin diente als Modifikation bakteriellen Ursprungs. N-6-Methyladenosin, beispielhaft für eine ubiquitär vorkommende Modifikation, fungierte als Kontrollstimulus. Die Reaktion der Immunzellen wurde anhand der ausgeschütteten Zytokine charakterisiert.

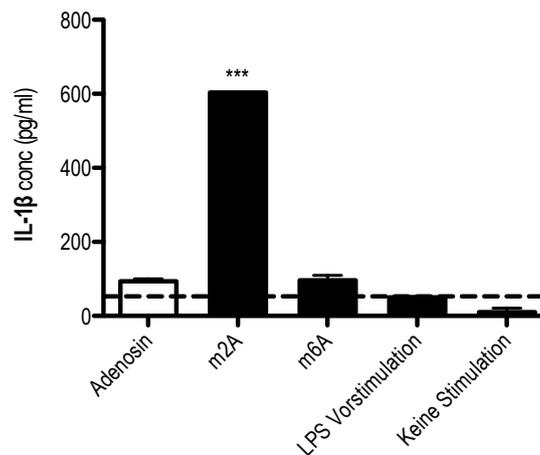


Abbildung 4: Stimulation mit 2-Methyladenosin führt zur Sekretion von Interleukin-1 β .

WT C57BL/6 Knochenmarkszellen wurden nach 2 h Vorstimulation mit LPS 24 h mit Adenosin, m2A oder m6A inkubiert. Effektive Konzentrationen: Adenosin, m2A und m6A je 200 μ g/ml; LPS Vorstimulation 200 ng/ml. Messung von IL-1 β mittels ELISA. Es ergeben sich signifikante Unterschiede in der IL-1 β -Sekretion nach Adenosin oder m2A Stimulation (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$). Experiment erstmals durchgeführt von C. Hotz (Daten unveröffentlicht).

m2A bewirkt im Gegensatz zu unmodifiziertem Adenosin und m6A, wie in Abbildung 4 zu sehen ist, eine deutliche Aktivierung der Immunzellen mit daraus folgender Sekretion von IL-1 β . Dies ist Grundlage unserer Hypothese, dass es sich bei der bakteriellen Nukleosid-Modifikation m2A um ein bislang unbekanntes *pathogen-associated molecular pattern* handelt, welches dem murinen Immunsystem zur Erkennung bakterieller Infektionen dient.

Als mögliche Rezeptoren, welche die Wirkung von m2A vermitteln, ziehen wir die Adenosin-Rezeptoren in Betracht. Mittels spezifischer Inhibition einzelner Rezeptor-Subtypen konnte gezeigt werden, dass m2A vermutlich vom Adenosin-Rezeptor 2A erkannt wird. Wird dieser pharmakologisch blockiert, vermindert sich die IL-1 β -Sekretion. Weiterhin scheint die IL-1 β -Sekretion abhängig von Caspase-1 zu sein (Daten unveröffentlicht).

1.4 Fragestellung

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass das nur in Bakterien vorkommende Nukleosid 2-Methyladenosin bei Kontakt mit murinen Immunzellen eine starke pro-inflammatorische Antwort

hervorrufen. Möglicherweise ist es somit eine neues *pathogen-associated molecular pattern*, das dem Immunsystem zur Erkennung von Mikroorganismen dient. Ziel dieser Doktorarbeit ist es, basierend auf den oben beschriebenen Vorarbeiten den Mechanismus der Erkennung von 2-Methyladenosin durch Immunzellen aufzuklären. Weiterhin soll der Effekt bakterieller, modifizierter Adenosin-Nukleoside auf die Erkennung ganzer Bakterien bzw. ihrer Bestandteile beschrieben werden.

Durch den Einsatz von Rezeptor-Antagonisten fand unsere Arbeitsgruppe bereits Hinweise darauf, dass der Adenosin-Rezeptor Subtyp A_{2A} als Hauptrezeptor für die Erkennung von 2-Methyladenosin dient. Zu Beginn dieser Arbeit wurde nun versucht, mit Hilfe von Adenosin-Rezeptor-Agonisten diese Daten zu überprüfen und somit den für die Erkennung von 2-Methyladenosin verantwortlichen Rezeptor zu identifizieren. Weiterhin sollte der Signalweg, über den mutmaßlich die Adenosin-Rezeptoren zu IL-1 β -Sekretion führen, aufgeklärt werden. Eine Verknüpfung der Rezeptoren mit IL-1 β -Sekretion ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Auch ein an der m2A-Erkennung beteiligtes Inflammasom ist bislang nicht bekannt. Weiterhin war es unser Ziel, den für die Erkennung von m2A verantwortlichen Zelltyp identifizieren. Dies ist besonders interessant, da das Molekül in Vorversuchen seine pro-inflammatorische Wirkung lediglich in Knochenmarkszellen, aber nicht in Splenozyten oder in verschiedenen Makrophagen-Zelllinien zeigte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von bakterielle Nukleosidmodifikationen enthaltender RNA auf murine Immunzellen untersucht. Art und Ausmaß von Nukleosidmodifikationen dienen dem Immunsystem des Wirts als Anhaltspunkt zur Erkennung fremder Nukleinsäuren. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass typische, in Säugetieren vorkommende Modifikationen, wie zum Beispiel Pseudouridin, die Erkennung von RNA durch murine Immunzellen verhindern und somit möglicherweise Autoimmunität vermindern (Gehrig et al. 2012; Kariko et al. 2005). Bislang wurde jedoch nicht untersucht, ob körperfremde Modifikationsmuster dem Immunsystem andererseits als *pathogen-associated molecular pattern* dienen können. Um diesen Zusammenhang näher zu betrachten, verglichen wir die Wirkung der RNA von Methyltransferase-defizienten Bakterien mit der von Wildtyp-Bakterien. Den gendefizienten Bakterien fehlen die Enzyme YfgB, YfiF und YgdE, die vermutlich unter anderem für die Produktion der prokaryotischen Modifikation 2-Methyladenosin notwendig sind. Mit Hilfe dieser Bakterien konnte daher schlussendlich bakterielle Wildtyp-RNA, die m2A enthält, mit RNA

der gendefizienten Bakterien ohne m2A verglichen werden, um einen Einfluss der mikrobiellen Modifikationen auf die RNA-Erkennung aufzuklären.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Geräte

CO ₂ Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau, D
Plattenlesegerät Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Lichtmikroskop Primo Vert	Zeiss, Göttingen, D
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS	Heraeus, Hanau, D
Thermomixer compact/comfort	Bandelin, Berlin, D
Wasseraufbereitungssystem Direct-Q 3	Millipore, Schwalbach, D
Zellseparationsmagnet BD IMag	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Gel Imaging Station Alpha Imager	Alpha Innotec, Johannesburg, SA
Inkubator Shaker Innova 44	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Nanophotometer™	Implen GmbH, München, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Plastik-Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen 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 (Nürnbrecht, D) bezogen.

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ciprofloxacin (Ciprobay® 200 mg)	Bayer Vital, Leverkusen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, D

DMEM Flüssigmedium	PAA, Pasching, A
DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNase I	Roche, Mannheim, D
dNTPs	Invitrogen, Paisley, GB
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche, Mannheim, D
Ethanol (70 % vergällt)	Apotheke Innenstadt LMU, München, D
Ethidium Bromide Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
FCS Gibco® Fötale calf Serum	Invitrogen, Paisley, GB
FCS-Gold	PAA, Pasching, A
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, D
Isopropanol (100 Vol.-%)	Merck, Darmstadt, D
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, D
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth, Karlsruhe, D
LE Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, D
L-Glutamin 200 mM	PAA, Pasching, A
Lyse-Puffer (BD Pharm Lyse™)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Lysozyme from chicken egg white	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Mg ₂ Cl	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Natriumpyruvat 100 mM	PAA, Pasching, A
PCR-Buffer	Molzym, Bremen, D
PCR-Enhancer	Molzym, Bremen, D
Penicillin/ Streptomycin (100 x) Fa.	PAA, Pasching, A
Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, A
RiboShredder™ RNase Blend	Epicentre, Madison, USA
RPMI 1640 Flüssigmedium	PAA, Pasching, A
RPMI 1640 VLE	Biochrom, Berlin, D
Schwefelsäure 2N (H ₂ SO ₄)	Apotheke Innenstadt LMU, München, D
TAE-Puffer	Apotheke Innenstadt LMU, München, D
Taq-Polymerase	Molzym, Bremen, D
TE-Puffer pH 8,0	Apotheke Innenstadt LMU, München, D

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TMB Substrat Reagenz Set	Becton Dickinson, Heidelberg, D
TRizol Reagent	Invitrogen, Paisley, GB
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin (10 x)	PAA, Pasching, A
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, D

2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurde in den Puffern und Lösungen deionisiertes Wasser aus dem Wasseraufbereitungssystem Direct-Q3 verwendet.

ELISA:

<i>Assay diluent</i>	10 Vol.-% FCS in PBS
pH 6,5- <i>coating</i> Puffer	0,2 M Natriumphosphat in dH ₂ O
pH 9,5- <i>coating</i> Puffer	0,1 M Natriumphosphat in dH ₂ O
Waschpuffer	0,05 Vol.-% Tween20 in PBS

MACS:

pH 7,2-MACS Puffer	2 mM EDTA, 0,5 % BSA in PBS
--------------------	-----------------------------

Zellkulturmedien:

DC/Knochenmarkzell-Medium	10 Vol.-% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in RPMI1640
pDC-Medium	10 Vol.-% FCS Gold, 2 mM L-Glutamin, 1 Vol.-% NEAA, 1 mM Natrium-Pyruvat, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in VLE-RPMI1640
J774/Makrophagen-Medium	10 Vol.-% FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 µg/ml Ciprofloxacin in DMEM
L929-Medium	10 Vol.-% FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 µg/ml Ciprofloxacin in RPMI1640
Erythrozyten-Lyse-Puffer	10 Vol.-% Lyse-Puffer (BD Pharm Lyse) in dH ₂ O
Trypsin-EDTA-Lösung	10 Vol.-% Trypsin (10x), 0,025 Vol.-% EDTA in PBS

2.1.5 Stimuli, Inhibitoren und Zytokine

Stimuli und Inhibitoren:

Adenosine 5'-triphosphate disodium salt	Invivogen, Toulouse, F
CGS21680 Hydrochloride	Tocris Bioscience, Bristol, GB
2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine	Tocris Bioscience, Bristol, GB
CpG Oligonukleotid 1826 (CpG)	InvivoGen, Toulouse, F
2',5'-Dideoxyadenosine	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
9.2dr PTO RNA	Curevac, Tübingen, D
Forskolin	Tocris Bioscience, Bristol, GB
H89 dihydrochloride	LKT Laboratories, St. Paul, USA
LPS-EB Ultrapure	Invivogen, Toulouse, F
Nigericin, Sodium Salt	Calbiochem, Darmstadt, D
pA RNA	Curevac, Tübingen, D
Resiquimod (R848)	Enzo Life Sciences, Lörrach, D

Nukleosid-Moleküle:

Adenosin	Prof. Carell, LMU München, D
2-Methyladenosin	Prof. Carell, LMU München, D
Methyl-6-Adenosin	Prof. Carell, LMU München, D

Die für die Stimulation verwendeten Nukleosid-Moleküle wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Carell, LMU München, synthetisiert und mittels *high performance liquid chromatography* aufgereinigt.

Zytokine:

FLT3-Ligand (human, recombinant)	Peptotech, Hamburg, D
GM-CSF (murine, recombinant)	Peptotech, Hamburg, D
IFN- α (murine, recombinant)	PBL InterferonSource, Piscataway, USA
IL-4 (murine, recombinant)	Peptotech, Hamburg, D
M-CSF (murine, recombinant)	Peptotech, Hamburg, D

2.1.6 Antikörper

IFN- α ELISA:

<i>Capture</i> -Antikörper:	PBL InterferonSource, Piscataway, USA
Anti-IFN- α (Kaninchen anti-Maus, polyclonal)	
<i>Detection</i> -Antikörper:	PBL InterferonSource, Piscataway, USA
Anti-IFN- α (Klon RMMA-1, Ratte anti-Maus, monoclonal)	
Anti-IgG Antikörper (Ziege anti-Hase, HRP-konjugiert)	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA

FACS Antikörper:

Anti-CD45R/B220 Ak-PE/Cy7 Clone RA3-6B2	Biolegend, Fell, D
Anti-CD11b Ak- FITC Clone M1/70	Biolegend, Fell, D
Anti- Gr-1 Ak- APC/Cy7 Clone RB6-8C5	Biolegend, Fell, D

MACS Antikörper:

Anti-Maus CD45R/B220 magnetische Teilchen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
---	---------------------------------

2.1.7 Primer

Primer E. coli yfgB down 5'CCTGAAAACGTCACCACG-3'	Metabion, Martinsried, D
Primer E. coli yfgB up 5'GGTTGATCTTACACGGCG-3'	Metabion, Martinsried, D
Primer E. coli yfiF down 5'GGAAAATCTCGTGCTGAC-3'	Metabion, Martinsried, D
Primer E. coli yfiF up 5'CAGTACCATTTTCGCTGG3'	Metabion, Martinsried, D

2.1.8 Reagenziensets

Maus IL-6 ELISA Set (BD OptEIA™)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Maus IL-1 β ELISA Set (BD OptEIA™)	Becton Dickinson, Heidelberg, D
microRNA Purification Kit	Norgen Biotek, Thorold, Can
RNase-free DNase Kit	Norgen Biotek, Thorold, Can
cAMP Direkt Biotrak EIA (non acetylation)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, D

2.1.9 Software

Adobe Creative Suite 4 (CS4)	Adobe Systems, München, D
Endnote X6	Thomson Reuter, Carlsbad, USA
Microsoft Office 2011	Mircosoft, Unterschleißheim, D
GraphPad Prism 5.0b	GraphPad Software, La Jolla, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Zellen wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Als Quelle der Knochenmarkzellen, pDCs und Knochenmark-Makrophagen verwendeten wir weibliche C57BL/6 Mäuse von Harlan-Winkelmann, Borchon, D. Das Alter der Mäuse betrug bei Entnahme des Knochenmarks zwischen 8 und 12 Wochen.

Die C57BL/6 TLR4^{-/-} Mäuse sowie C57BL/6 ASC^{-/-} Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Heesemann (Max-von-Pettenkofer Institut, LMU München, D) und von Prof. Anders (Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der LMU München, D) zur Verfügung gestellt.

2.2.1.1 Isolation von Knochenmarkzellen

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Tiere zunächst mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Das Knochenmark wurde mit sterilem PBS aus beiden Femur- und Tibia-Knochen ausgewaschen und in Erythrozyten-Lysepuffer gelöst. Nach 1 bis 2 Minuten wurde der Puffer durch PBS verdünnt und die Zellen bei 400 g 7 Minuten lang abzentrifugiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in Neubauer-Zählkammern nach Anfärbung mit Trypan-Blau.

2.2.1.2 Generierung von pDCs und Makrophagen

pDCs:

Zur Generierung von pDCs wurden Knochenmarkzellen isoliert und mit einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml in pDC-Medium gelöst. Nach Zugabe von humanem Flt3-Ligand (40 ng/ml) und β -ME ($3,75 \times 10^{-4}$ Vol.-%) wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (25 cm²) im Brutschrank kultiviert. Die Zellkulturflaschen dürfen während der folgenden Inkubationszeit nicht bewegt werden. Nach einer Inkubationsperiode von 8 Tagen können nicht adhären und adhären Zellen geerntet werden. Hierfür wurden die Zellen nach Abnehmen der Überstände mit kaltem PBS bedeckt und dann durch Agitation bzw. *Scraping* der Zellkulturflasche gelöst. Die geernteten Zellen wurden nach Zentrifugation (400 g, 7 Minuten, 4 °C) durch einmaliges Waschen mit MACS-Puffer für das *magnetic-activated cell sorting* (MACS) vorbereitet.

Knochenmark-Makrophagen:

Für die Generierung von Makrophagen wurden zunächst der M-CSF enthaltende Überstand von L929-Zellen produziert. Diese wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in L929-Medium für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach 7 Tagen wurde der Überstand steril filtriert (0,2 μ M Porengröße).

Murine Knochenmarkzellen wurden in Knochenmarkzell-Medium mit 20 % L929-Überstand über 7 Tage inkubiert. Danach konnten die Zellen nach mehrmaligem Waschen mit Trypsin-EDTA gelöst und nach Aufnahme in Makrophagen-Medium für die Versuche verwendet werden.

2.2.1.3 Kultivierung von Zelllinien

Die J774-Zellen wurden in Makrophagen-Medium kultiviert und kurz vor Erreichen vollständiger Konfluenz passagiert. Um die Zellen zu lösen wurde nach einmaligem Waschen mit PBS Trypsin-EDTA-Lösung eingesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank und leichtem Klopfen lagen die meisten Zellen in Lösung vor und konnten in eine neue Flasche ausgesät werden.

Die murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie J774A.1 (ATCC TIB-67TM) wurde freundlicherweise von Prof. Heesemann, die Fibroblasten-Zelllinie L929 (ATCC CCL-1) von Prof. Hornung (Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Klinikum der Universität Bonn, D) zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Zellstimulationsassays

Für die Stimulationsversuche wurde die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Folgende Zellzahlen wurden verwendet:

Zelltyp	Zellzahl pro Well
Knochenmarkzellen	4×10^5
Knochenmark-Makrophagen	1×10^5
J774 Zellen	5×10^4
pDCs	1×10^5

Die Zellen wurden zunächst in 100 µl Medium eingesetzt. Falls eine Vorstimulation nötig war wurden hierfür weitere 25 bis 50 µl Medium mit dem Stimulus hinzugegeben. Die Dauer der Vorstimulation betrug in der Regel 2 Stunden. Bei Restimulation erfolgte die Auffüllung der Wells mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 200 µl. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank wurden die Überstände mit 400 g über 7 Minuten abzentrifugiert und dann weiter verwendet.

2.2.3 ELISA

Zytokinkonzentrationen in Zellüberständen detektierten wir mithilfe des Sandwich-ELISA-Prinzips. Die IL-6 und IL-1 β ELISAs wurden nach dem Herstellerprotokoll (BD Opteia) durchgeführt. Für die Detektion von intrazellulärem cAMP wurde das cAMP direct Biotrak EIA Kit von GE-Healthcare verwendet (*non-acetylation* Protokoll).

Die Konzentration von IFN α wurde mittels eines laboreigenen ELISA-Protokolls bestimmt. Zunächst wurde eine 96-Well Platte mit dem IFN α *Capture*-Antikörper (Eff. Konz.: 1 μ g/ml) in pH 6,5-*coating*-Puffer über Nacht bei 4 °C *gecoatet*. Am nächsten Tag wurden nach dreimaligem Waschen unspezifische Bindungsstellen der Platte mit 150 μ l *Assay diluent* pro Well über drei Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Nach weiteren drei Waschschritten wurden die unverdünnten Proben und der Standard (50 μ l/Well) auf die Platte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Zur Kopplung des gebundenen IFN α mit dem Enzym wurde nun nach zehnmalem Waschen der *Detection*-Antikörper (Eff. Konz.: 625 ng/ml) in 50 μ l/Well *Assay diluent* hinzugegeben und 3 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 10 Waschvorgängen erfolgte die Zugabe von einem IgG-HRP-konjugierten Antikörper mit der Konzentration 7,5 μ g/ml (50 μ l/Well). Die Entwicklung wurde nach 3-stündiger Inkubation gemäß dem BD Opteia Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.4 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation eignen sich optimal Bakterien, die sich bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,9 (λ : 600 nm) in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Nach Abzentrifugieren des LB-Mediums (3000 g, 5 Minuten) und Waschen mit sterilem PBS verwendeten wir anschließend Lysozym (1 mg/ml in TE-Puffer, 15 Minuten) um die bakterielle Zellwand zu verdauen. Die Isolation der RNA erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von Invitrogen mittels Trizol®. Die in dH₂O gelöste RNA wurde schließlich mit den Glasfasersäulen des Norgen® RNA Isolation Kit nach Herstellerprotokoll gereinigt. Während des Reinigungsprozesses wurden mögliche DNA-Kontaminationen in den Proben durch Anwendung des RNase-freien DNase Kit (Norgen® DNase on-column digestion) beseitigt. Durch die Aufreinigungssäulen konnte die RNA in zwei Fraktionen aufgeteilt werden: größer und kleiner als 200 Basenpaare Länge. Die Stimulation erfolgte anschließend separat, um spezifische Effekte der Fraktionen aufzudecken.

Als Transfektionsreagenz wurde DOTAP im Mengenverhältnis 1:5 (RNA:DOTAP) verwendet. Vor der Stimulation wurde DOTAP für 20 Minuten mit der RNA bei 37 °C inkubiert, um Komplexbildung zu erreichen. In Kontrollkonditionen wurde die RNA vor Zugabe von DOTAP mit 0,2 µl eines Mix aus verschiedenen RNasen (Riboshredder®) (Inkubationszeit 20 Minuten) verdaut.

Bei den Stimulationsversuchen wurde ausschließlich RNA mit Reinheitsquotienten 260/280 von 1,8 bis 2,1 verwendet.

2.2.5 Stimulation mit Bakterienkulturen

Die Bakterien wurden, nach Ansetzen einer Übernachtskultur am vorangehenden Abend, am Tag der Stimulation in frisches LB-Medium gegeben und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,9 (logarithmische Wachstumsphase) gezüchtet. Dies gewährte optimale Viabilität und Aktivität der Mikroorganismen. Nach Abzentrifugieren des LB-Mediums bei 1000 g für 6 Minuten durchliefen alle Bakterienstämme drei Waschschriffe in PBS. Dadurch konnten Rückstände des Mediums entfernt werden. Die Inaktivierung der Bakterien erfolgte mittels 90-minütiger Inkubation bei 60 °C unter Zuhilfenahme eines Thermoshakers.

2.2.6 Magnetische Zellseparation

Magnetic-activated cell sorting (MACS) wurde von uns verwendet um die Fraktion der pDCs aus den mit Flt3-Ligand behandelten Knochenmarkzellen zu separieren. Wir verwendeten das BD IMag™ System gemäß den Herstellerangaben. Für die Selektion wurden Anti-Maus CD45R/B220 magnetische Teilchen gewählt.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methyltransferase-Knockouts der *E. coli* Bakterienstämme wurden in regelmäßigen Abständen per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kontrolliert. Hierzu wurden einzelne Kulturen der auf Agarplatten ausgesäten Bakterien analysiert. Die Polymerase-Kettenreaktion nutzen wir

dazu, die DNA der Bakterien mithilfe spezieller Primer zu vervielfältigen. Bei der späteren Gel-Elektrophorese konnte das Spektrum der relevanten Knockouts jeder ausgewählten Bakterienkolonie überprüft werden. Die PCR folgt folgendem Prinzip: Als Matrize (*template*) dient entweder ein linearer DNA-Strang oder ein zyklisches Plasmid. Für die Amplifikation benötigt werden neben der Matrizen-DNA zwei Oligonukleotide, welche zu den 3'-Enden des zu amplifizierenden Gens komplementär sind und somit als Primer fungieren, sowie eine hitzestabile Polymerase, welche das zugegebene Nukleotidgemisch zum gewünschten DNA-Endprodukt zusammenfügt.

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

PCR <i>buffer</i>	5 µl
PCR <i>enhancer</i>	5 µl
MgCl ₂ (25 nM)	1 µl
dNTP	1 µl
Primer <i>upstream</i>	0,5 µl
Primer <i>downstream</i>	0,5 µl
<i>Template</i> Plasmid	0,5 µl
MolTaq-Polymerase	0,5 µl
dH ₂ O	50 µl

Die Reagenzien stammten aus dem *ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix* (Sigma Aldrich).

Eine PCR durchläuft in mehreren Zyklen drei Arbeitsschritte: Anfangs findet bei 95 °C ein Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge statt (Denaturierung). Bei anschließend verminderter Temperatur von 50 bis 60 °C folgt eine Anlagerung der Primer an ihre jeweilige spezifische DNA-Sequenz (Annealing). Bei 72 °C, dem optimalen Temperaturniveau der Taq-Polymerase, wird nun ausgehend von den Primern der komplementäre DNA-Strang synthetisiert (Elongation). In den darauffolgenden Zyklen kann das daraus gewonnene DNA-Fragment als Matrize fungieren, was zu einer exponentiellen Vermehrung der zwischen den Primern gelegenen Nukleotidsequenz führt.

Folgende PCR-Zykluszeiten wurden verwendet:

Denaturierung	95 °C	5 min
Zyklus (30 x)	95 °C	1 min
	50 °C	1 min
	72 °C	3 min
Endelongation	72 °C	5 min
Lagerung	4 °C	∞

2.2.8 Statistische Analyse

Bei der Mehrzahl der Versuche werden die Ergebnisse als arithmetische Mittel angegeben. Die Streuung wird durch Angabe der Standardabweichung der Einzelwerte dargestellt. Für die statistische Analyse der Ergebnisse sowie die graphische Aufbereitung verwendeten wir die Software Graphpad Prism 5.0b. Um statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Werte anzugeben wurde beim Vergleich mehrerer Ergebnisse mit einem Kontrollwert der 1way-ANOVA Test mit Dunnetts Multiple Comparison Post-Test verwendet. Unterschiede einzelner Werte wurden durch den Student's t-Test analysiert. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten kleiner 0,05 angenommen. Die p-Werte < 0,05, < 0,01 oder < 0,001 wurden durch Markierung mit *, ** bzw. *** dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Der Signalweg der Erkennung von 2-Methyladenosin

Adenosin entfaltet viele seiner Wirkungen an den Adenosin-Rezeptoren der Immunzellen. Ziel des folgenden Versuchs war es, zu prüfen, ob das chemisch ähnliche 2-Methyladenosin ebenfalls von diesen Rezeptoren erkannt wird und dadurch IL-1 β -Ausschüttung auslöst (Abb. 4). Wir verwendeten hierfür spezifische Inhibitoren der vier Rezeptor Subtypen. Vor Stimulation mit m2A wurden die einzelnen Rezeptoren blockiert. Dadurch sollte überprüft werden, ob das Ausschalten eines bestimmten Adenosin-Rezeptors zur Veränderung des Effekts bzw. der Erkennung von m2A führt.

Durch Vorstimulation mit Lipopolysacchariden wurden die murinen Knochenmarkzellen zunächst zur Sekretion der für die Produktion des reifen Interleukin-1 β notwendigen Zytokin-Vorstufe proIL-1 β angeregt. Daraufhin wurden die jeweiligen Inhibitoren der Adenosin-Rezeptoren zu den entsprechenden Konditionen hinzugefügt. Nach Stimulation der Zellen mit m2A erfolgte eine Inkubationsperiode im Brutschrank, schließlich konnten die Überstände mittels ELISA analysiert werden. Als Rezeptor-Antagonisten verwendeten wir die Substanzen DPCPX (A₁-Rezeptor), ZM241385 (A_{2A}-Rezeptor), MRS1754 (A_{2B}-Rezeptor) und MRS1220 (A₃-Rezeptor).

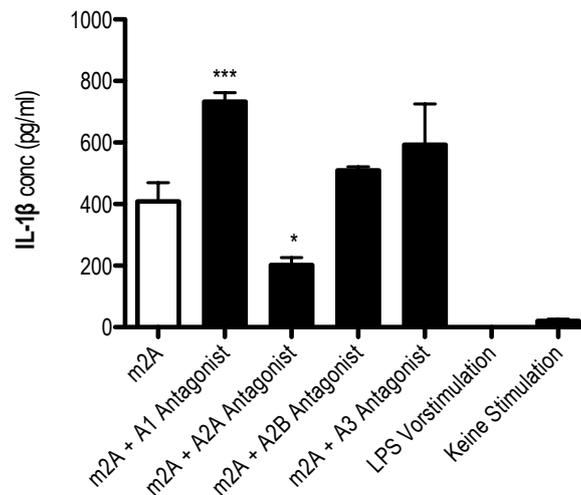


Abbildung 5.: Blockade des Adenosin-Rezeptors A_{2A} vermindert den Effekt von 2-Methyladenosin.

Vorstimulation von WT-C57BL/6-Knochenmarkzellen mit LPS, dann Applikation der Inhibitoren 45 min vor Stimulation mit m2A. Effektive Konzentrationen: 100 μ g/ml m2A; 200 ng/ml LPS Vorstimulation; 5 μ M A₁-, A_{2A}- oder A_{2B}-Antagonist; 10 μ M A₃-Antagonist. Abnahme und Analyse der Überstände durch ELISA nach 24 h. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der IL-1 β -Sekretion nach Blockade mit dem A₁- bzw. A_{2A}-Antagonisten im Vergleich zur Stimulation mit m2A ohne Rezeptorblockade (*, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001).

Experiment erstmals durchgeführt von A. Jarosch, Doktorand in der Abteilung für Klinische Pharmakologie.

Es zeigt sich, dass die durch Stimulation mit m2A hervorgerufene IL-1 β -Sekretion ausschließlich nach Applikation des A_{2A}-R Antagonisten reduziert wird. Dies führt zu der Annahme, dass der A_{2A}-Rezeptor-Subtyp an der Erkennung von m2A beteiligt ist. Gleichzeitig steigt die IL-1 β -Sekretion signifikant bei Blockade des Rezeptor-Subtyps A₁. Dies ließe sich möglicherweise dadurch erklären, dass m2A auch am Rezeptor A₁ wirken kann. Blockiert man diese Wirkung, könnte dadurch der Effekt des A_{2A}-Rezeptors verstärkt werden, der zur Ausschüttung von IL-1 β führt. Die Unterschiede zwischen reiner m2A-Stimulation und Stimulation mit m2A nach Blockade der Rezeptoren A_{2B} und A₃ waren statistisch nicht signifikant.

3.1.1 Stimulation von Immunzellen mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten

Von der Stimulation der Adenosin-Rezeptoren mit spezifischen Agonisten versprochen wir uns die Bestätigung oben gezeigter Ergebnisse. Es erfolgte wie bei obigem Versuch eine Vorstimulation der Knochenmarkzellen mit LPS, um eine Bereitstellung der Zytokin-Vorstufe proIL-1 β zu bewirken. Danach begann die Stimulation mit den Adenosin-Rezeptor-Agonisten. Als potenter und selektiver Agonist des A₁-Rezeptors diente die Substanz N-6-Cyclopentyladenosin (CPA). Sie wurde *in vivo* bereits von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt. Der A_{2A}-Rezeptor wurde durch CGS21680-Hydrochlorid (CGS) stimuliert. Beide Stimuli wurden dem Medium der Zellen in Konzentrationen von 1 bis 1000 μ M hinzugefügt. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Messung des ausgeschütteten IL-1 β mittels ELISA.

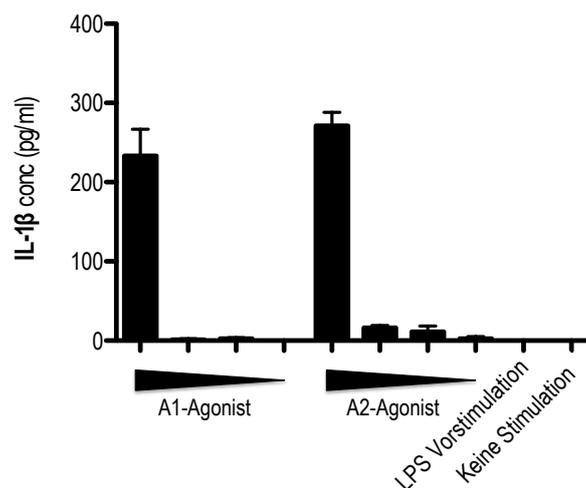


Abbildung 6: Stimulation mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten bewirkt in hohen Konzentrationen Interleukin-1 β Sekretion.

Zelltyp: WT-C57BL/6-Knochenmarkzellen; 2 h Vorstimulation mit LPS, dann Applikation von N-6-Cyclopentyladenosin (A₁-Rezeptor-Agonist) und CGS21680-Hydrochlorid (A_{2A}-Rezeptor-Agonist). Effektive Konzentrationen: 200 ng/ml LPS Vorstimulation; 1000, 100, 10 oder 1 μ M CPA bzw. CGS; 3 mM ATP; Abnahme der Überstände und Messung des IL-1 β nach 24 h mittels ELISA.

Bei Auswertung der Zytokin-Menge im Zellüberstand zeigt sich, dass sowohl die Stimulation mit dem A₁- als auch mit dem A_{2A}-Agonisten bei einer Konzentration von 1000 μ M eine deutliche IL-1 β -Sekretion von etwa 250 pg/ml hervorruft. Aufgrund der hohen Konzentration des Wirkstoffs sowie des Lösungsmittels DMSO sind hier allerdings unspezifische Effekte wahrscheinlich.

Unterschiede zwischen den beiden Agonisten CPA und CGS zeigen sich in den Konditionen bei denen niedrigere Konzentrationen eingesetzt wurden. Der A_{2A} -R-Agonist CGS bewirkt bei niedrigen Konzentrationen von 10 μM und 100 μM geringe IL-1 β -Sekretion, die sich knapp an der Nachweisgrenze des ELISA-Kits bewegt. Möglicherweise spricht diese geringe IL-1 β -Menge für die Hypothese der Verknüpfung des A_{2A} -Rezeptors mit der Produktion von Interleukin-1 β . Der A_1 -R-Agonist zeigt in diesem Bereich keine Sekretion.

3.1.2 Stimulation einzelner Stationen des Signalwegs der Adenosin-Rezeptoren

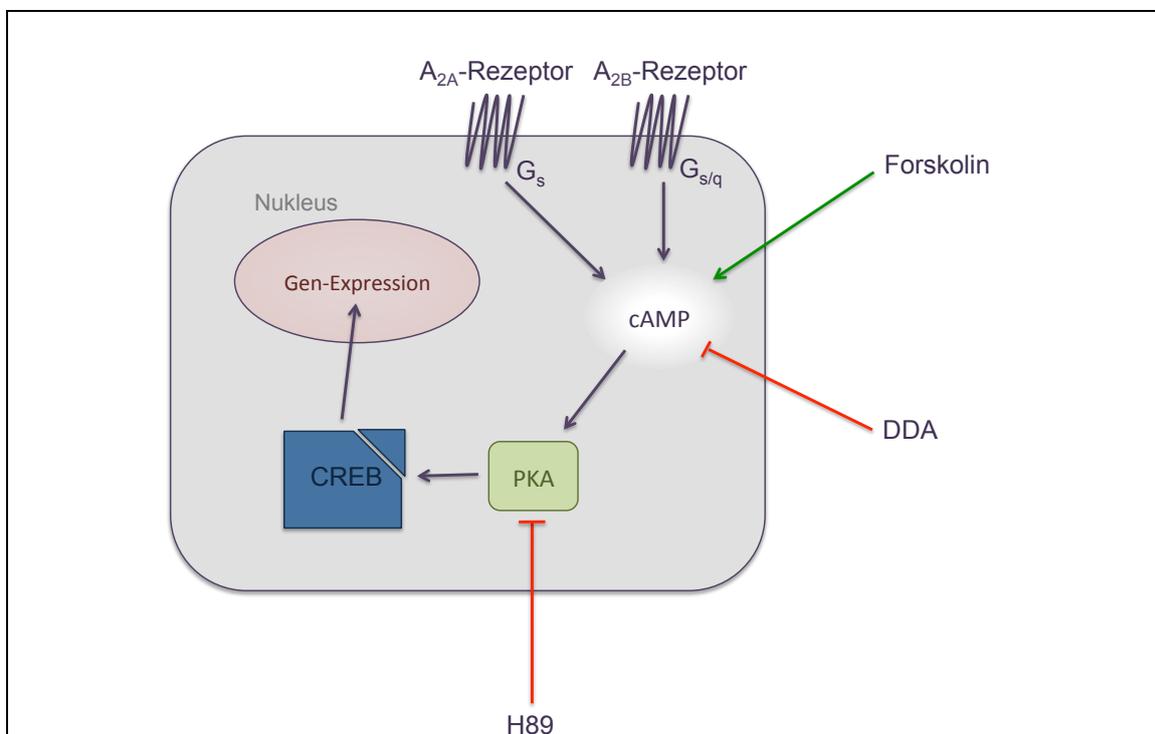


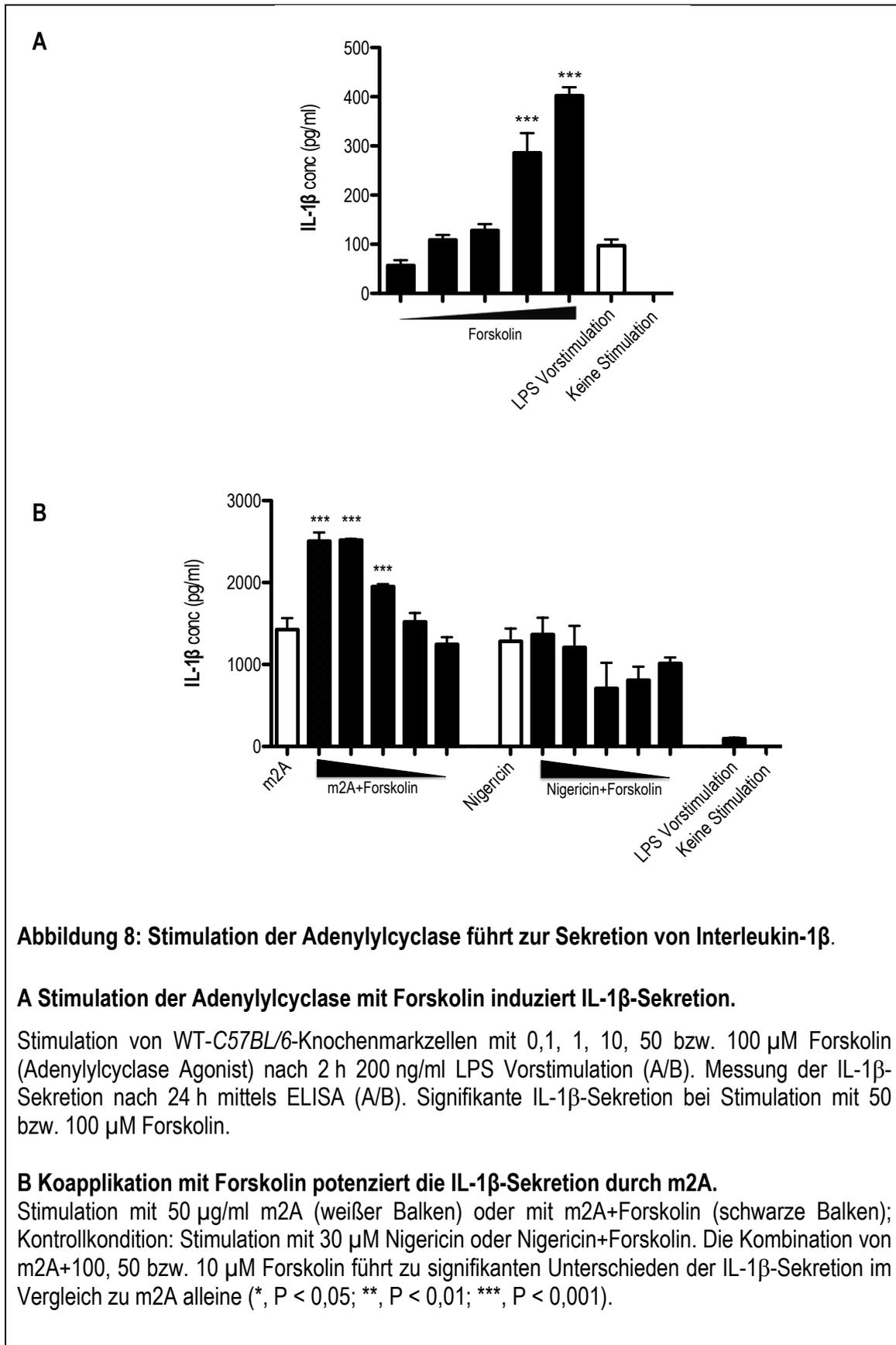
Abbildung 7: Überblick über pharmakologische Angriffsmöglichkeiten an den Signalwegen der Adenosin-Rezeptoren.

Der A_{2A} -Rezeptor ist an ein stimulatorisches G-Protein (G_s) gekoppelt. Dieses aktiviert die Adenylylcyclase und bewirkt dadurch eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Adenylylcyclase kann durch den Agonisten Forskolin stimuliert werden. Applikation von 2'-5'-Dideoxyadenosin (DDA) inhibiert die Adenylylcyclase spezifisch und verringert die cAMP-Konzentration. Eine hohe cAMP-Konzentration induziert die Proteinkinase A (PKA), welche durch die Phosphorylation von *cAMP response element-binding protein* (CREB) Einfluss auf die Genexpression ausübt. Die Inhibition der PKA erfolgte durch Einsetzen des Inhibitors H89.

In den folgenden Experimenten wurde versucht, den Signalweg der Adenosin-Rezeptoren weiter aufzuklären. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Stimulation einzelner Elemente des

A_{2A} -Rezeptor-Signalwegs auch ohne Aktivierung des Rezeptors an sich zur Produktion von IL-1 β führen kann. Hierfür wurden Enzyme weiter abwärts im Signalweg der Rezeptoren stimuliert (siehe Schema Abb. 7).

Dem Adenosin-Rezeptor A_{2A} nachgeschaltet ist die Adenylylcyclase. Diese wurde im nachfolgend aufgeführten Versuch durch den spezifischen Agonisten Forskolin aktiviert. Vor Beginn des Versuchs wurden murine Knochenmarkzellen isoliert. Nach Aussäen der Zellen und Vorstimulation mit LPS erfolgte die Zugabe der Stimuli. Neben dem Einsatz von Forskolin in Konzentrationen von 0,1 bis 100 μ M als einzelner Stimulus wurde auch mit Forskolin und m2A (50 μ g/ml) zeitgleich stimuliert. Hiermit sollte der Effekt synchroner Stimulation mehrerer Stufen des A_{2A} -Rezeptor Pfades überprüft sowie synergistische Effekte aufgedeckt werden. Als Kontrolle diente die gemeinsame Stimulation mit Forskolin und Nigericin (30 μ M), welches unabhängig von Adenosin-Rezeptoren zur Sekretion von Interleukin-1 β führt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium abgenommen und der IL-1 β -Gehalt überprüft.



Die Stimulation der Adenylylcyase durch Forskolin alleine führte bei einer effektiven Konzentration von 50 μM zur signifikanten Ausschüttung von IL-1 β (etwa 300 pg/ml). Durch Steigerung der Forskolin-Konzentration auf 100 μM erhöht sich die IL-1 β -Sekretion auf 400 pg/ml. Die Applikation des Lösungsmittels DMSO in entsprechender Dosis führte zu keiner signifikanten Zytokin-Sekretion. In den Bedingungen der mit 0,1 bis 10 μM Forskolin stimulierten Zellen konnte keine signifikant von der Kontrollkondition (nur vorstimulierte Zellen) abweichende Zytokin-Konzentration gemessen werden. Das Ergebnis zeigt, dass die Stimulation der Adenylylcyase als Enzym des Adenosin-Rezeptor-Pfades zur Ausschüttung von IL-1 β führt.

In Teil B der Abbildung 8 wurden die Knochenmarkzellen mit einer Kombination von m2A und Forskolin stimuliert. Als Kontrollkondition diente die Kostimulation mit Nigericin und Forskolin. Nigericin bewirkt Interleukin-1 β -Sekretion unabhängig von der Adenylylcyase und den Adenosin-Rezeptoren. Während Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurde, ist die m2A-Konzentration in allen Wells 50 $\mu\text{g/ml}$. Bei der Kombination von m2A und 100 bzw. 50 μM Forskolin ist die IL-1 β -Sekretion um das 1,8-fache im Vergleich zur Stimulation mit m2A ohne Forskolin erhöht. Koapplikation von 10 μM Forskolin erhöht die IL-1 β Menge um 1,4-fache. Diese Steigerung übersteigt deutlich die reine Addition der IL-1 β -Mengen, welche in Teil A des Versuchs durch separate Stimulation mit den einzelnen Substanzen erreicht wurden. Möglicherweise werden hier also Verstärkungsmechanismen, zum Beispiel im Sinne einer positiven Rückkopplung, aktiviert. Ein anderes Bild ergibt sich bei Betrachtung der Kontrollkonditionen Nigericin in Kombination mit Forskolin. Hier konnten keine signifikanten Änderungen der gemessenen IL-1 β -Konzentration im Vergleich zur Applikation von ausschließlich Nigericin gemessen werden.

Zur Untermauerung oben gesammelter Ergebnisse wurde anschließend mit Inhibitoren des Signalwegs gearbeitet. Als Inhibitor der Adenylylcyase diente 2'-5'-Dideoxyadenosin (DDA). Diese Substanz verhindert die Produktion von cAMP. Analog zu den obigen Versuchen isolierten wir zunächst Knochenmarkzellen, die nach Aussaat mit LPS vorstimuliert wurden. Die Zugabe von DDA in das Medium erfolgte vor der Stimulation mit m2A oder der Kontrollkondition Nigericin.

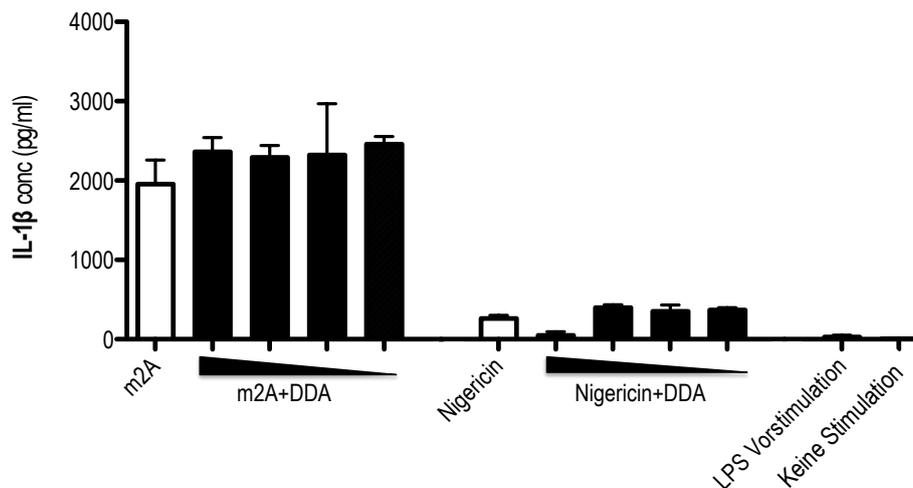


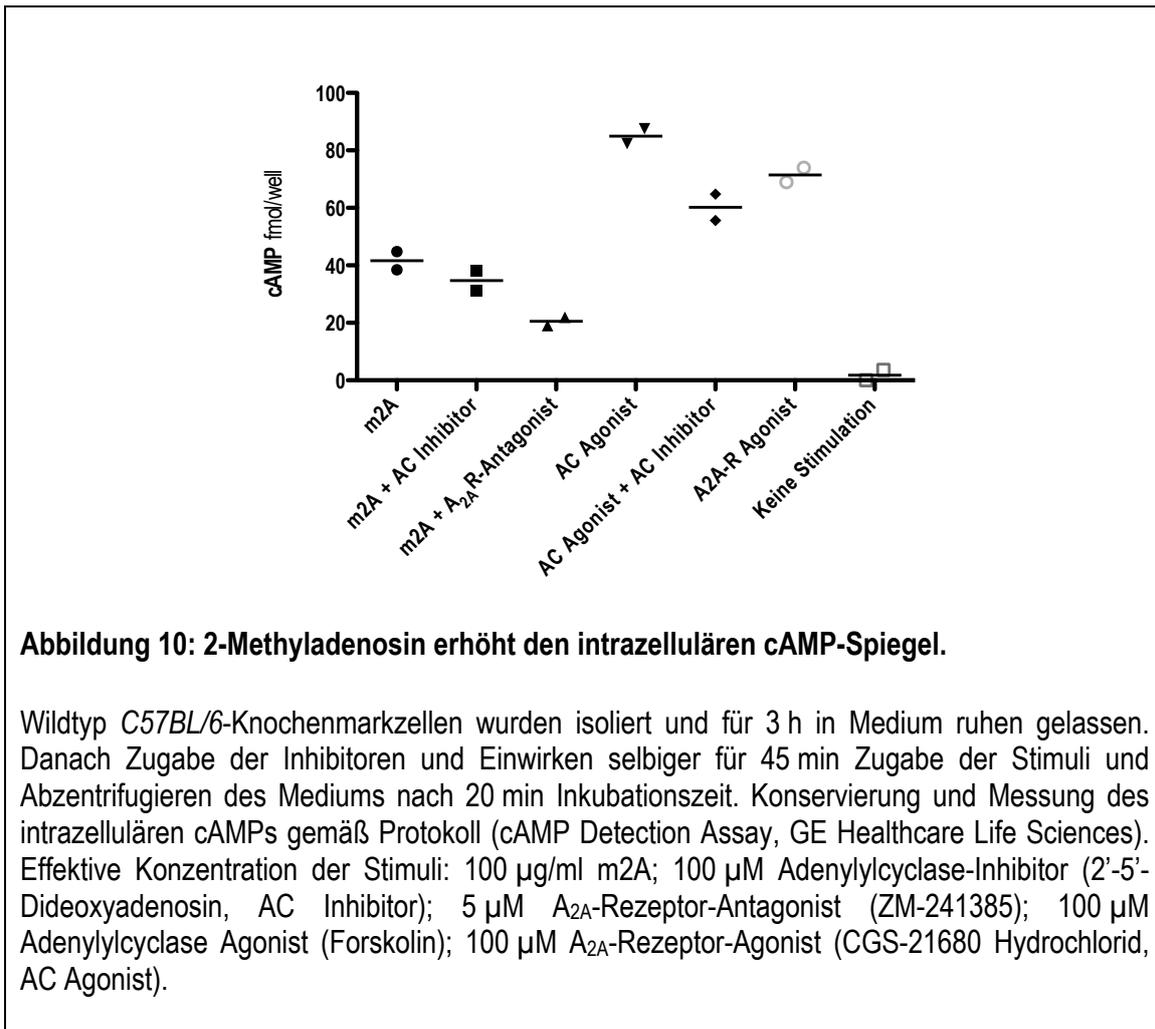
Abbildung 9: Applikation eines Adenylylcyclase-Inhibitors hat keinen Effekt auf die Wirkung von 2-Methyladenosin.

Stimulation von WT-C57BL/6-Knochenmarkzellen. Vorstimulation mit LPS über 2 h. Blockade der Adenylylcyclase durch DDA 45 min vor Zugabe von m2A und Nigericin. Effektive Konzentrationen: 200 ng/ml LPS Vorstimulation; 150 μg/ml m2A; 30 μM Nigericin; 50, 10, 1, bzw. 0,1 μM DDA. Analyse der IL-1β-Menge im Zellüberstand nach 24 h Inkubation mittels ELISA.

Die m2A-Konzentration betrug bei allen Konditionen 150 μg/ml, Nigericin wurde mit einer Konzentration von 30 μM eingesetzt. Die Blockade der Adenylylcyclase durch 0,1 bis 50 μM DDA hat keinen hemmenden Effekt auf die IL-1β-Sekretion. Der Grund hierfür ist unklar. Möglicherweise reichte die inhibitorische Potenz des DDAs nicht aus, um die Wirkung von m2A zu unterdrücken oder es gibt weitere bislang unbekannte Signalwege, welche die Wirkung von m2A vermitteln. Auch auf die Zytokin-Sekretion durch den Kontrollstimulus Nigericin hat der Inhibitor keinen signifikanten Effekt. Lediglich bei der Kondition 50 μM DDA plus Nigericin wird die IL-1β-Sekretion stark vermindert. Dies kann möglicherweise durch zytotoxische Effekte erklärt werden. Es ist vorstellbar, dass die stimulierten Zellen bereits vor Sekretion von IL-1β durch hohe Konzentration des Lösungsmittels DMSO in Kombination mit Nigericin zugrunde gehen, auch wenn die Zellen durch die Konzentration der entsprechenden Menge DMSO alleine in Kontrollversuchen nicht signifikant beeinflusst werden.

Während in den vorhergehenden Versuchen immer Interleukin-1β, das mutmaßliche Endprodukt der Stimulation mit m2A, als Indikator erfolgreicher Beeinflussung des m2A-Signalwegs durch Stimuli und Inhibitoren gemessen wurde, versuchten wir im folgenden Versuch intrazelluläres

cAMP, also das Produkt der am Anfang des Signalwegs stehenden Adenylylcyclase zu messen. Hierdurch versprachen wir uns, eine genauere Aussage über die frühen Schritte der Erkennung von m2A treffen zu können. Ziel des folgenden Versuchs war es, zu überprüfen, ob m2A gemäß der Hypothese zur Produktion von cAMP führt und ob diese Produktion durch Blockade des A_{2A}-Rezeptors oder der Adenylylcyclase vermindert werden kann. Weiterhin sollte die Spezifität der Inhibitoren und Agonisten überprüft werden, da sich mit Hilfe des ELISA-Kits der Einfluss der Stimuli auf die Adenylylcyclase direkt darstellen lässt. Wir verwendeten murine Knochenmarkzellen, diese wurden wie im Methodenteil beschrieben isoliert. Danach wurden zunächst die Inhibitoren des A_{2A}-Rezeptors (ZM-241385) und der Adenylylcyclase (2'-5'-Dideoxyadenosin) zum Medium der Zellen hinzugegeben. Schließlich erfolgte die Stimulation der Zellen mit m2A. Alternativ stimulierten wir mit der Kontrollsubstanz CGS, dem Agonisten des A_{2A}-Rezeptors. Als Positivkontrolle verwendeten wir Forskolin. Um die Funktion von DDA zu überprüfen, wurde in einer Kondition die Adenylylcyclase vor Stimulation mit Forskolin durch DDA blockiert. Das intrazelluläre cAMP wurde schließlich im Zelllysate gemäß Herstellerprotokoll gemessen.



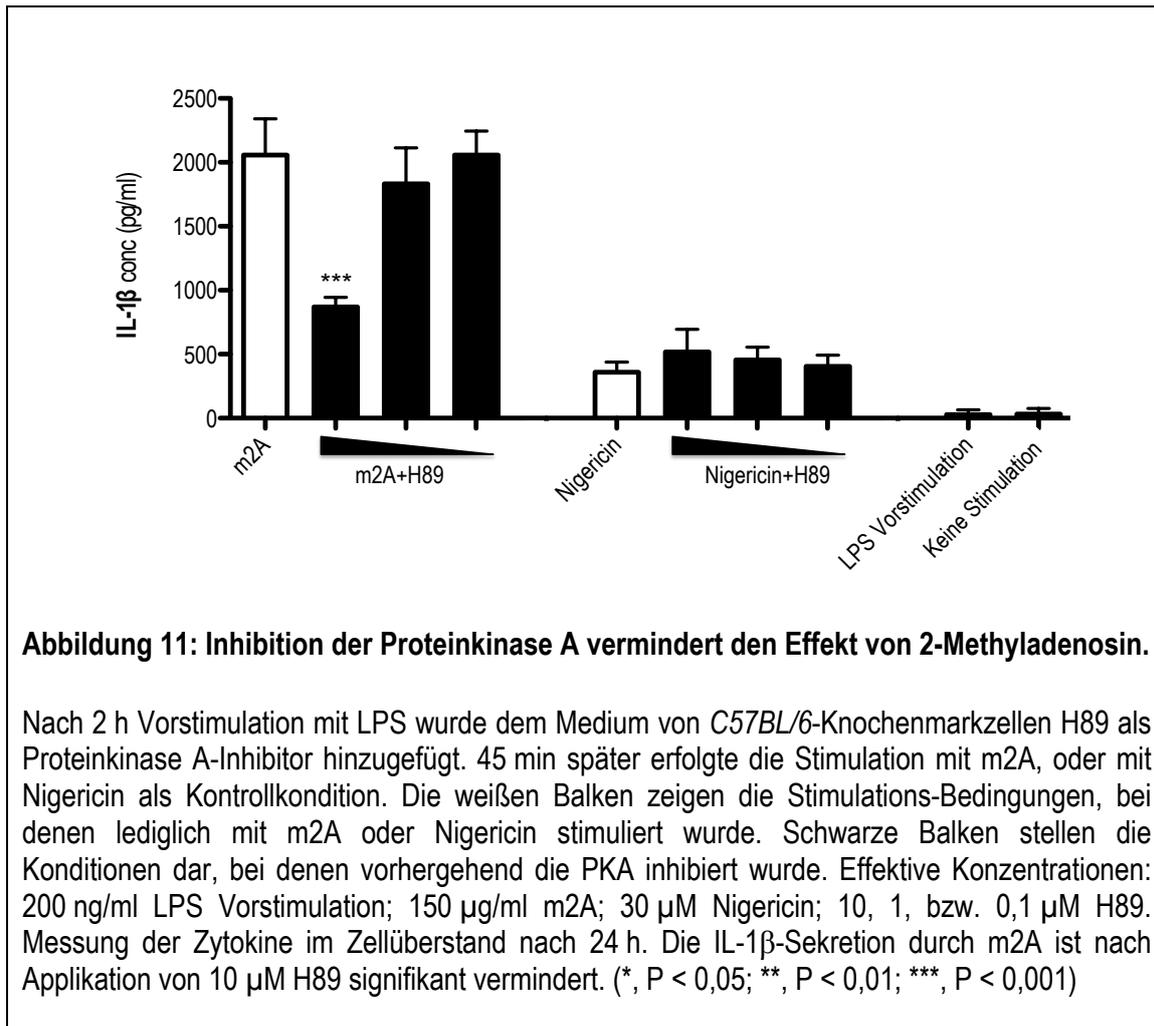
Im Ergebnis zeigen sich cAMP-Konzentrationen von 40 fmol/Well nach Stimulation der Zellen mit m2A. Durch Applikation des A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten ZM-241385 vor Stimulation mit m2A wird die cAMP-Produktion etwa halbiert. Stimulation des A_{2A}-R mit dem Agonisten CGS-21680 Hydrochlorid bewirkt eine cAMP-Konzentration von 70 fmol/Well. Der Kontrollstimulus Forskolin hat als direkter Agonist der Adenylylcyclase eine Produktion von 80 fmol/Well zur Folge. Die vorherige Blockade des Enzyms durch DDA führt lediglich zu einer leichten Verminderung der cAMP-Konzentration auf 60 fmol/Well. Auch die Wirkung von m2A wird lediglich um 15 % vermindert.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Stimulantien m2A, Forskolin und CGS21680 Hydrochlorid zur Produktion von cAMP führen. Die Ergebnisse sprechen für unsere Ausgangshypothese, dass m2A am Adenosin-Rezeptor A_{2A} wirkt. Die in diesem Fall zu erwartende Produktion von cAMP bei Stimulation mit m2A und zum anderen die Blockade dieser Produktion mit Hilfe des A_{2A}-Rezeptor-Antagonisten ZM-241385 konnten wir im Versuch zeigen. Hilfreich für die Interpretation

der weiter oben gezeigten Versuche (Abbildung 9) ist auch die Beobachtung, dass DDA anscheinend nicht ausreicht, um die Aktivierung der Adenylylcyclase bei Stimulation mit Forskolin oder auch mit m2A zu verhindern. Es scheint daher verständlich, dass die IL-1 β -Sekretion nicht durch DDA verändert wurde. Möglicherweise ist, wie oben angesprochen, die inhibitorische Potenz der Substanz zu niedrig im Vergleich zu der der eingesetzten Agonisten.

Ein Wirkstoff, der eingesetzt wurde, um tiefere Ebenen des Signalwegs zu untersuchen, ist die Substanz H89-Hydrochlorid. Sie ist ein Inhibitor der Proteinkinase A. Diese wird durch intrazelluläres cAMP, welches nach Aktivierung des A_{2A}-R produziert wird, aktiviert. Sie beeinflusst ihrerseits viele Transkriptionsfaktoren. Durch H89 kann die PKA kompetitiv an der katalytischen ATP-Bindungsstelle inhibiert werden (Hidaka et al. 1990).

Im Versuch wurde die PKA in Knochenmarkzellen mit 0,1 bis 10 μ M H89 gehemmt und daraufhin mit m2A oder der PKA-unabhängigen Kontrolle Nigericin stimuliert. Ziel war es, festzustellen, ob die PKA an dem Signalweg beteiligt ist, der bei Stimulation mit m2A zu IL-1 β -Sekretion führt. Durch Blockade mit H89-Hydrochlorid sollte der Zusammenhang zwischen PKA-Aktivierung und IL-1 β -Sekretion aufgedeckt werden. H89 wurde vor Stimulation mit m2A oder der Kontrolle Nigericin in das Medium gegeben. Zuvor wurde mit LPS vorstimuliert. Die Analyse der Überstände erfolgte durch ELISA.



Bei Blockade der PKA mit 10 µM H89 fällt die durch m2A-Stimulation provozierte IL-1β-Sekretion signifikant niedriger aus. Dieser blockierende Effekt verstärkt sich bei Einsetzen von bis zu 50 µM H89 (Daten nicht gezeigt). Bei effektiven Konzentrationen des Inhibitors unter 10 µM kann keine signifikante Verminderung der IL-1β-Sekretion gemessen werden. Bei der Kontrollgruppe H89 plus Nigericin bewirkt die Blockade der Proteinkinase A keine Veränderung der IL-1β-Sekretion.

Die Ergebnisse des Versuchs sprechen dafür, dass die Proteinkinase-A an dem Signalweg, der durch m2A aktiviert wird und zu IL-1β-Sekretion führt, beteiligt ist. Da Proteinkinase-A als Bestandteil des Signalwegs des $A_{2A/2B}$ -Rezeptors identifiziert wurde, kann dies als weiterer Hinweis dafür dienen, dass m2A seine Wirkung über einen dieser Rezeptoren entfaltet. Gleichzeitig erniedrigt H89-Hydrochlorid aber nicht die durch Nigericin bedingte Sekretion. Die Zellen scheinen daher nicht generell durch H89 an der IL-1β-Sekretion gehindert zu werden.

3.1.3 Inflammasom-Aktivierung durch 2-Methyladenosin

In Vorversuchen konnte unsere Arbeitsgruppe durch Anwendung pharmakologischer Inhibitoren zeigen, dass die Caspase-1 unabdingbar für die durch 2-Methyladenosin hervorgerufene IL-1 β -Sekretion ist. Möglicherweise wird m2A also durch ein Inflammasom erkannt und führt dadurch zur Rekrutierung von Caspase-1. Weiterhin konnte durch Einsetzen von gendefizienten Mäusen gezeigt werden, dass diese Interleukin-1 β -Sekretion unabhängig vom purinergen P_{2X7}-Rezeptor sowie vom NLRP3-Inflammasom ist.

Im folgenden Versuch nutzten wir ASC-defiziente Mäuse, um zu überprüfen, ob Inflammasome, die dieses Protein verwenden, an der Immunantwort auf 2-Methyladenosin beteiligt sind. ASC dient Inflammasomen, die nicht über eine N-terminale CARD-Domäne verfügen, als Adapterprotein zur Verbindung mit proCaspase-1 (Srinivasula et al. 2002). Für den Versuch wurden Knochenmarkzellen von ASC-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen isoliert und separat ausgesät. Nach Vorstimulation mit LPS wurden die Zellen durch m2A (200 μ g/ml) stimuliert. Die Zytokin-Konzentrationen der Zellüberstände wurden 24 Stunden nach der Stimulation mittels ELISA analysiert.

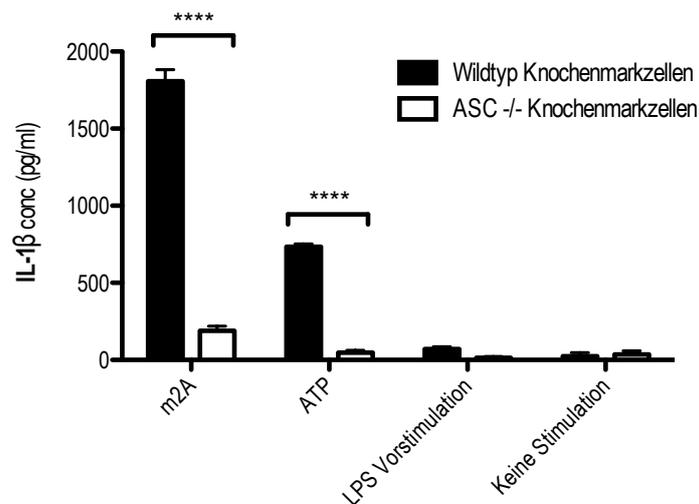
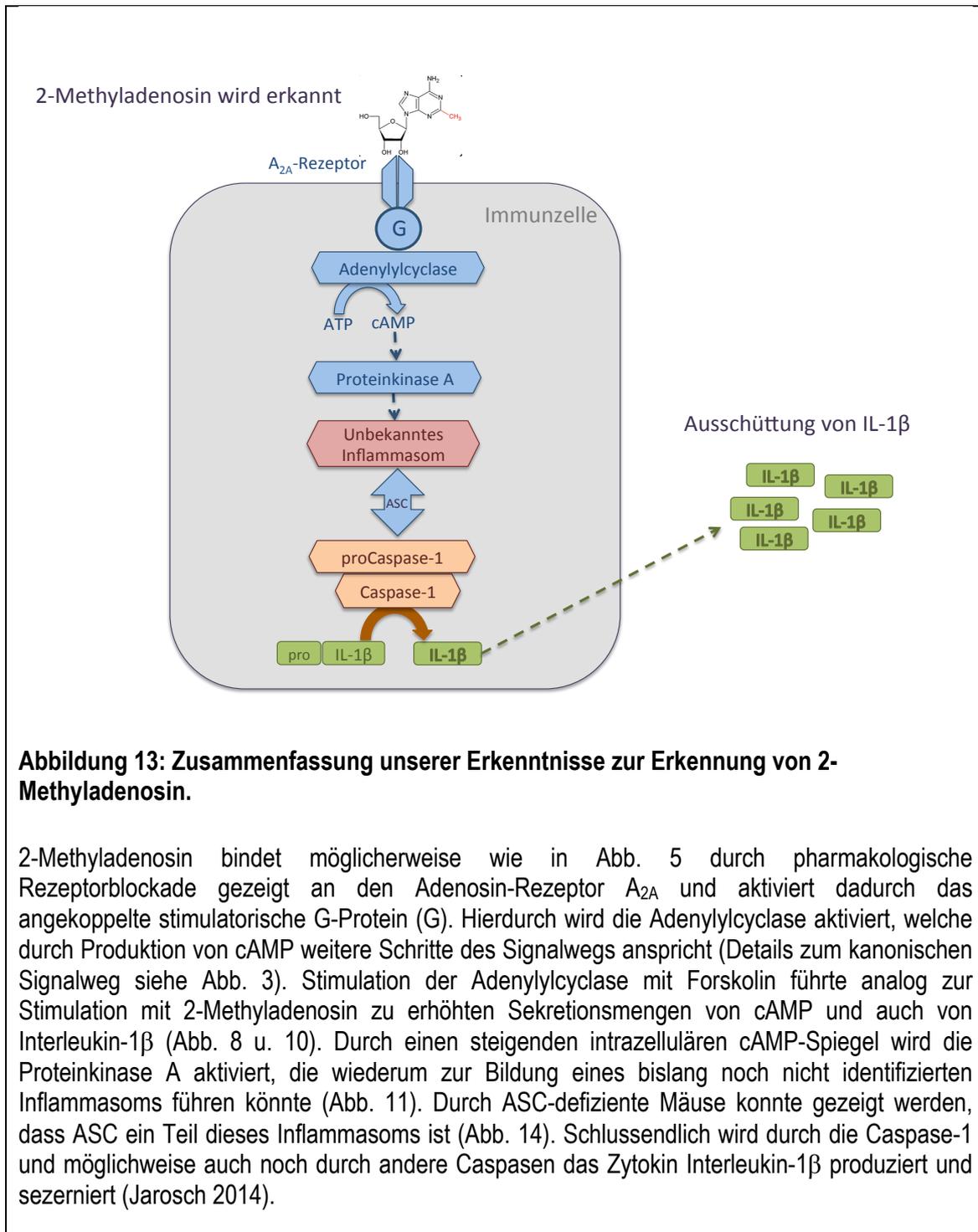


Abbildung 12: Die durch 2-Methyladenosin ausgelöste Interleukin-1 β Sekretion ist abhängig vom Adapterprotein ASC.

Stimulation von C57BL/6-Wildtyp (schwarze Balken) und ASC-defizienten (weiße Balken) Knochenmarkzellen. 2 h Vorstimulation mit LPS, dann Inkubation mit m2A oder ATP für 24 h. Messung von IL-1 β durch ELISA. Effektive Konzentrationen: 200 ng/ml LPS; 200 μ g/ml m2A; 3 mM ATP. Die Ausschüttung von IL-1 β in Wildtyp-Zellen und gendefiziente Zellen unterscheidet sich bei den Konditionen „m2A“ und „ATP“ signifikant. Statistische Analyse mittels t-Test (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; ****, $P < 0,0001$).

In Abbildung 12 wird gezeigt, dass Knochenmarkzellen mit Knockout von ASC nach m2A-Stimulation 90 % weniger IL-1 β produzieren, als die Wildtyp-Kontrollzellen. Der ASC-abhängig erkannte Stimulus ATP führt in gendefizienten Zellen nur zu etwa 6 % der IL-1 β -Ausschüttung der Wildtyp-Zellen. 2-Methyladenosin scheint die Zellen also über Vermittlung des Adapter-Proteins ASC zur Produktion von IL-1 β anzuregen.

3.1.4 Zusammenfassung der Erkenntnisse zur Erkennung von 2-Methyladenosin



In den oben stehenden Ergebnissen wurden Teile des Signalwegs untersucht, der möglicherweise an der Erkennung von 2-Methyladenosin beteiligt ist. Abbildung 13 gibt einen Überblick über die Mechanismen. Die Aktivierung dieses Signalwegs könnte zur Sekretion von Interleukin-1 β führen. Unserer Hypothese zufolge wird 2-Methyladenosin durch den Adenosin-

Rezeptor 2A erkannt. Hinweisend hierauf ist insbesondere, dass sich die durch Stimulation mit 2-Methyladenosin hervorgerufene Interleukin-1 β -Sekretion vermindert, wenn der Adenosin-Rezeptor pharmakologisch inhibiert wird (Abb. 5). Weiterhin kann auch direkt ein signifikant niedrigerer Anstieg des intrazellulären cAMPs detektiert werden, wenn der entsprechende Adenosin-Rezeptor-Inhibitor eingesetzt wird (Abb. 10). Im kanonischen Adenosin-Rezeptor-Signalweg wird nach Bindung an den Rezeptor ein stimulatorisches G-Protein aktiviert, welches wiederum die Adenylylcyclase aktiviert. Aus ATP wird dann cAMP gebildet (Abb. 10), dieses führt zur Aktivierung der Proteinkinase A. Wir fanden Hinweise darauf, dass die Blockade der untergeordneten Proteinkinase A durch Einsatz eines chemischen Inhibitors zu einer Verminderung des Effekts von 2-Methyladenosin führt (Abb. 11). Dies deutet darauf hin, dass sowohl der Adenosin-Rezeptor als erste Station des Signalwegs als auch weitere Bestandteile der kanonischen Signalweiterleitung an der Erkennung von 2-Methyladenosin beteiligt sind.

Schlussendlich führt der durch 2-Methyladenosin aktivierte Signalweg zur Bildung von Interleukin-1 β . Hieran ist höchstwahrscheinlich ein Inflammasom beteiligt. Wir konnten nachweisen, dass das Adapter-Molekül ASC, das für die Funktion von Inflammasomen wichtig ist, für die Produktion des Großteils des hervorgerufenen Interleukin-1 β unabdingbar ist. Mäuse denen durch Knockout das Gen dieses Moleküls fehlt, reagieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren stark abgeschwächt auf Stimulation mit 2-Methyladenosin (Abb. 12). Weiterhin sind an der Prozessierung und Sekretion von Interleukin-1 β Caspasen, wie zum Beispiel Caspase-1 beteiligt, wie unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnten.

Zusammenfassend deuten oben stehende Versuche auf eine Beteiligung der Adenosin-Rezeptoren bei der Erkennung von 2-Methyladenosin hin. Weiterhin scheint es wahrscheinlich, dass ein bislang unbekanntes Inflammasom für die Interleukin-Produktion verantwortlich ist. Eine nähere Eingrenzung der in Frage kommenden Proteinkomplexe ist in weiteren Experimenten geplant.

3.2 Der Einfluss von 2-Methyladenosin auf die Erkennung von bakterieller RNA

Während im ersten Teil der Dissertation das Hauptaugenmerk auf der immunoaktiven Wirkung des einzelnen 2-Methyladenosin Moleküls lag, wird im zweiten Teil die Wirkung von m2A als Teil

ganzer Bakterien betrachtet. *In vivo* liegt m2A als Teil von t- und rRNA vor. Wie oben beschrieben haben modifizierte Nukleoside unter anderem Einfluss auf die Erkennung von RNA und DNA durch Immunzellen. So fungieren eukaryotische Modifikationen, in Menge und Vielfalt die prokaryotischen bei weitem übertreffend, als anti-inflammatorische Faktoren in Nukleinsäuren (Gehrig et al. 2012; Kariko et al. 2005). Durch Stimulation mit ganzen Bakterien oder aufgereinigter RNA konnte ein Versuchsaufbau durchgeführt werden, der, im Vergleich zur Stimulation mit isoliertem m2A, eher die Auseinandersetzung des Immunsystems mit einer bakteriellen Infektion imitiert. Zur Untersuchung der Fragestellung wurden im Vorfeld durch Alexander Jarosch gendefiziente *E. coli* Bakterien gezüchtet, welchen durch Knockouts die Gene *yfiF*, *yfgB* und *ygdE* fehlen (Ausgangsstämme *yfiF* und *ygdE*, AG Carell LMU München). Diese kodieren Methyltransferasen, welche für die Methylierung von Adenosin zuständig sind. Die RNA dieser Stämme sollte daher im Vergleich zu Wildtyp-Bakterien weniger oder bestenfalls kein m2A enthalten. In einem ersten Versuch wurde zunächst die Viabilität der mutmaßlich m2A-freien gendefizienten Bakterien mit der des m2A produzierenden Wildtyps verglichen. Als Kriterium hierfür wurde die Wachstumsgeschwindigkeit und –dichte gewählt. Diese wurde anhand der Trübung (*optical density*, OD) einer Bakterienkultur im Zeitverlauf gemessen.

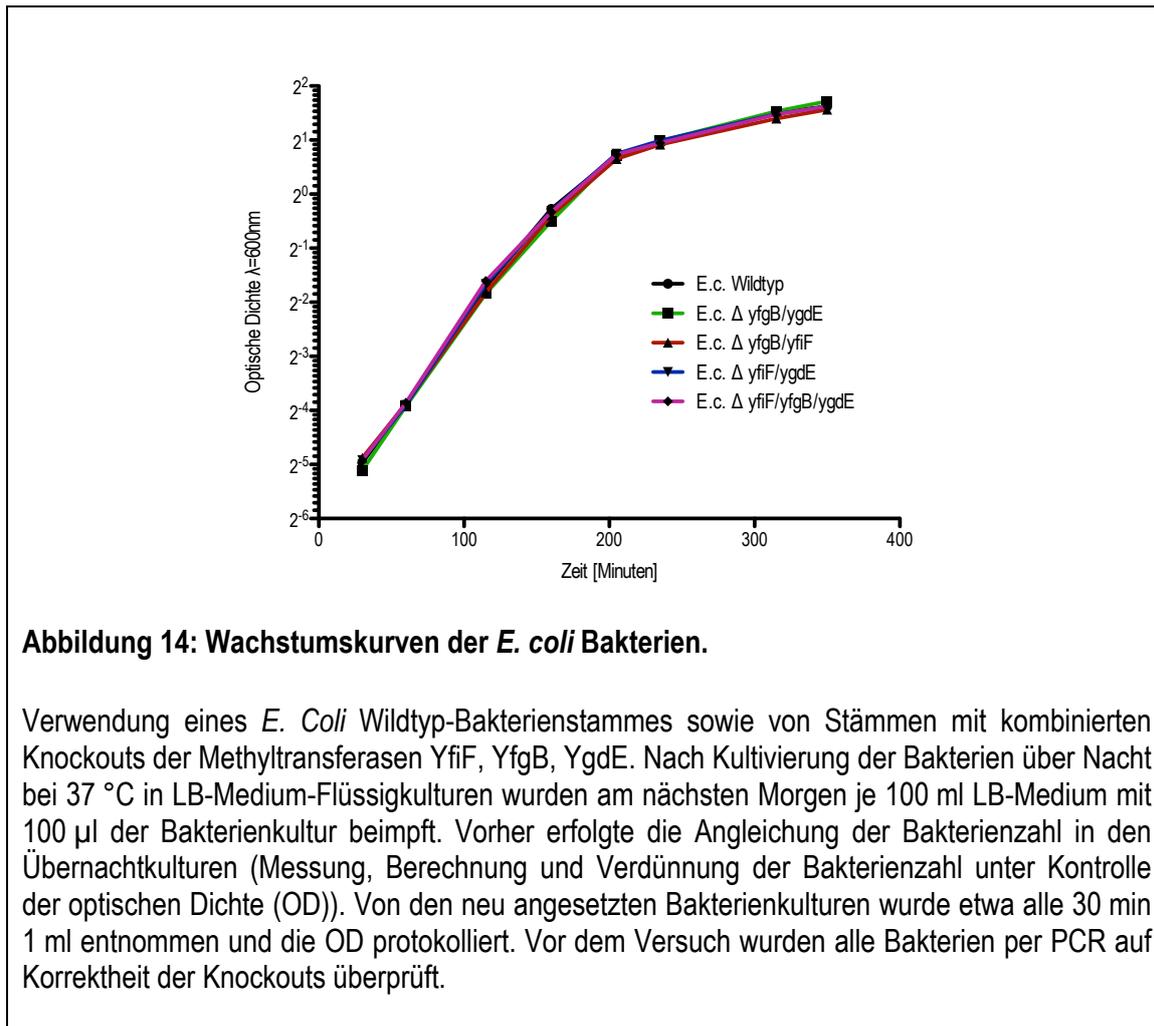


Abbildung 14: Wachstumskurven der *E. coli* Bakterien.

Verwendung eines *E. Coli* Wildtyp-Bakterienstammes sowie von Stämmen mit kombinierten Knockouts der Methyltransferasen YfiF, YfgB, YgdE. Nach Kultivierung der Bakterien über Nacht bei 37 °C in LB-Medium-Flüssigkulturen wurden am nächsten Morgen je 100 ml LB-Medium mit 100 μl der Bakterienkultur beimpft. Vorher erfolgte die Angleichung der Bakterienzahl in den Übernachtskulturen (Messung, Berechnung und Verdünnung der Bakterienzahl unter Kontrolle der optischen Dichte (OD)). Von den neu angesetzten Bakterienkulturen wurde etwa alle 30 min 1 ml entnommen und die OD protokolliert. Vor dem Versuch wurden alle Bakterien per PCR auf Korrektheit der Knockouts überprüft.

Es zeigte sich, dass sich die Bakterien ohne Methyltransferasen in Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit nicht von Wildtyp-Bakterien unterscheiden. Die Methyltransferasen scheinen also zumindest unter den im Versuch vorliegenden optimalen Wachstumsbedingungen keinen Einfluss auf die Viabilität der Bakterien zu haben.

3.2.1 Stimulation von Immunzellen mit Bakterien

In weiteren Versuchen untersuchten wir das immunogene Potenzial der Bakterien. Hierfür wurden Bakterienkulturen gezüchtet, quantifiziert, aufgereinigt und schließlich gemeinsam mit verschiedenen Immunzelltypen inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden IL-1 β , IL-6 sowie in pDCs auch IFN α im Überstand gemessen.

In den der Abbildung 15 zugrunde liegenden Versuchen wurden *bone marrow*-

derived macrophages (BMDM) aus dem Knochenmark von *C57BL/6* Mäusen ausdifferenziert. Um den Einfluss des stark pro-inflammatorischen Zellwandbestandteils LPS zu unterdrücken, wurden neben Wildtyp- auch TLR4-defiziente Tiere verwendet. Ihnen fehlt der *Toll-like*-Rezeptor 4 für die Erkennung von LPS. Wir erhofften uns dadurch, auch schwächere, möglicherweise durch LPS überlagerte Effekte der mit m2A modifizierten RNA zu erkennen. Die Zellen wurden mit hitzeinaktivierten oder lebenden Bakterien eines *E. coli* Wildtyp-Stammes sowie den Methyltransferase-defizienten *E. coli* Bakterien inkubiert. Die Immunzellen wurden durch Zugabe von 0,04, 0,4 oder 4 Bakterien pro Immunzelle (MOI 0,04 bis 4; *multiplicity of infection*) in das Medium stimuliert. Nach 24 Stunden erfolgte die Analyse der Zytokine in den Überständen mittels ELISA.

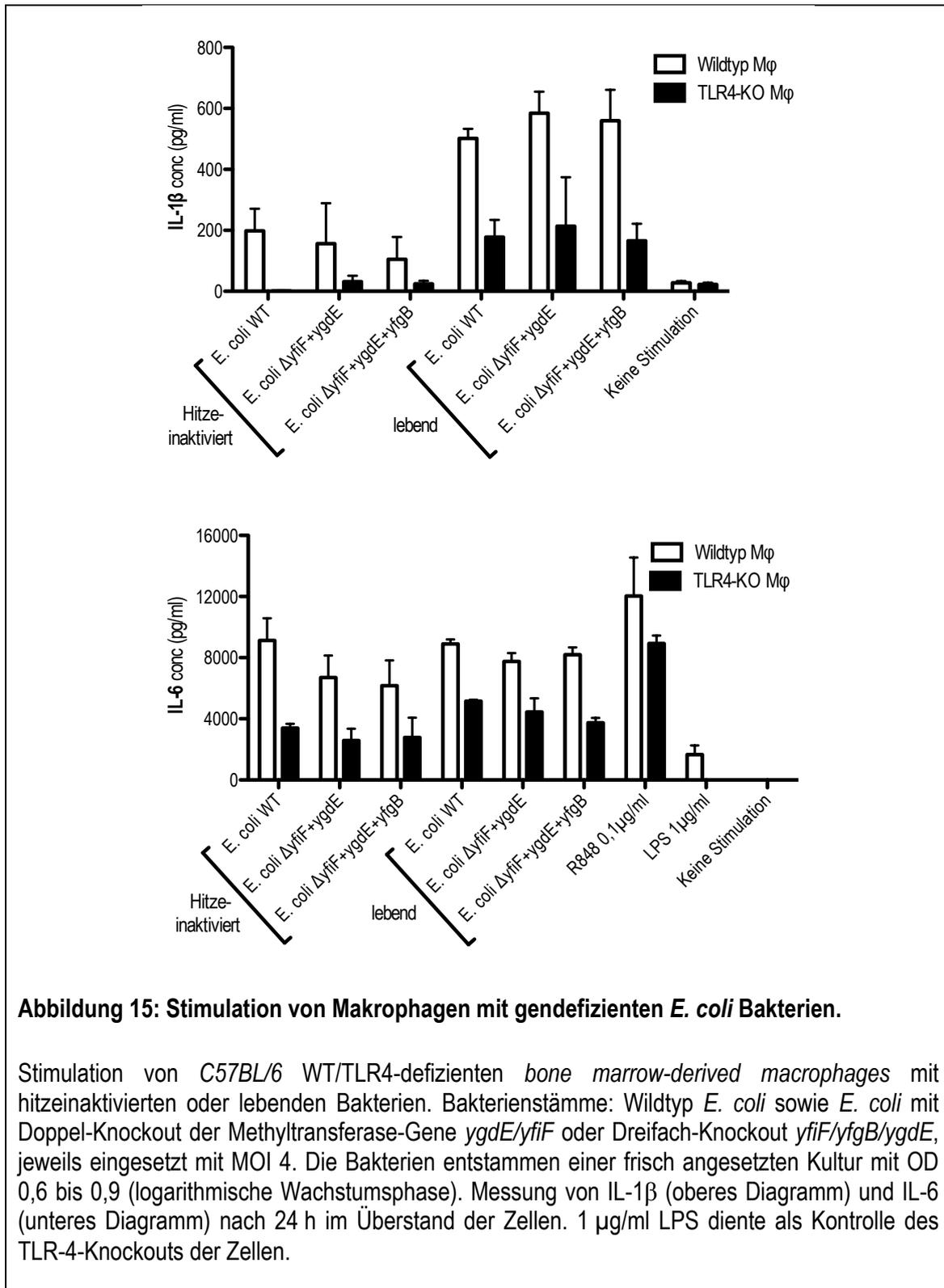


Abbildung 15: Stimulation von Makrophagen mit gendefizienten *E. coli* Bakterien.

Stimulation von C57BL/6 WT/TLR4-defizienten *bone marrow-derived macrophages* mit hitzeinaktivierten oder lebenden Bakterien. Bakterienstämme: Wildtyp *E. coli* sowie *E. coli* mit Doppel-Knockout der Methyltransferase-Gene *ygdE/yfiF* oder Dreifach-Knockout *yfiF/yfgB/ygdE*, jeweils eingesetzt mit MOI 4. Die Bakterien entstammen einer frisch angesetzten Kultur mit OD 0,6 bis 0,9 (logarithmische Wachstumsphase). Messung von IL-1β (oberes Diagramm) und IL-6 (unteres Diagramm) nach 24 h im Überstand der Zellen. 1 μg/ml LPS diente als Kontrolle des TLR-4-Knockouts der Zellen.

Bei der Analyse der Abbildung 15 zeigt sich, dass die Bakterien in Wildtyp-Makrophagen zu deutlicher IL-1β-Sekretion führen. Lebende Bakterien rufen eine stärkere Zytokin-Sekretion hervor als hitzeinaktivierte. In TLR4-defizienten Makrophagen lösen lediglich die lebenden

Bakterien eine deutliche IL-1 β -Sekretion aus. Es zeigen sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen gendefizienten *E. coli* Bakterienstämmen oder Wildtyp-Stämmen.

Ein anderes Bild ergibt sich bei Betrachtung der Darstellung der IL-6-Ausschüttung (unterer Graph). Diese kann in beiden Zelltypen sowohl durch lebende als auch durch hitzeinaktivierte Bakterien hervorgerufen werden. Ein großer Teil der IL-6-Ausschüttung scheint jedoch abhängig von TLR4 zu sein, da die gendefizienten Immunzellen unabhängig vom stimulierenden Bakterienstamm etwa 30 bis 50 % weniger IL-6 produzieren. Lebende Bakterien bewirken sowohl in gendefizienten als auch in Wildtyp-Makrophagen eine stärkere Sekretion als hitzeinaktivierte Bakterien. Wiederum zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen *E. coli* Stämmen. An der Kontrollkondition LPS lässt sich erkennen, dass die gendefizienten Mäuse tatsächlich nicht auf LPS-Stimulation reagieren.

Des Weiteren wurden plasmazytoide dendritische Zellen, die -wie im Methodenteil beschrieben- durch Zugabe von Flt3 aus Knochenmarkzellen generiert wurden, mit hitzeinaktivierten Bakterien stimuliert. Sie zeigten daraufhin jedoch bei allen Bakterienstämmen nur sehr wenig IFN α -Ausschüttung auf ähnlichem Niveau. Knochenmarkzellen, die mit Bakterien stimuliert wurden, reagierten wie die oben gezeigten Makrophagen (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend finden sich in allen getesteten Zelltypen keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Bakterienstämmen. Die Menge an enthaltenem m2A hat in diesem Versuch also keinen darstellbaren Effekt auf die Reaktion der Immunzellen.

3.2.2 Stimulation von Immunzellen mit bakterieller RNA

Immunzellen erkennen Bakterien an zahlreichen unterschiedlichen molekularen Mustern. Das Fehlen von 2-Methyladenosin in den Bakterien scheint in oben gezeigten Stimulationsversuchen die Immunantwort der murinen Zellen jedoch nicht zu beeinflussen. Die Sekretion von IL-1 β und IL-6 verändert sich beim Fehlen der bislang bekannten für die m2A-Produktion verantwortlichen Gene nicht signifikant. In den folgenden Experimenten isolierten wir bakterielle RNA und nutzten sie als Stimulus für Immunzellen. Andere bakterielle Moleküle, die den Effekt von 2-Methyladenosin als Nukleosid der RNA der Bakterien möglicherweise überlagern, fielen somit weg. Durch den Vergleich des immunogenen Potenzials der RNA von m2A-produzierenden

Bakterien gegenüber dem der gendefizienten Stämme versuchten wir einen möglichen Effekt von m2A darzustellen.

Um Verunreinigungen der RNA-Proben durch bakterielle LPS-Rückstände auszuschließen, wurden in Teil A der Abbildung 16 neben Makrophagen von Wildtyp-Mäusen auch die Makrophagen von TLR4-defizienten Tieren stimuliert. Des Weiteren erfolgte in Teil B die Ausdifferenzierung und Stimulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen. Da beide Zelltypen keinen TLR4 exprimieren, reagieren sie auf diesem Weg nicht auf LPS. Die RNA wurde zunächst aus *E. coli* Stämmen isoliert (siehe Methoden), es folgte die Aufreinigung durch Glasfasersäulen. Die Stimulation erfolgte anschließend separat mit zwei RNA-Proben (<200 Basenpaare / >200 Basenpaare), um spezifische Effekte der RNA-Subtypen aufzudecken. Zur Messung der Zytokine verwendeten wir nach 24 Stunden Inkubation ELISA.

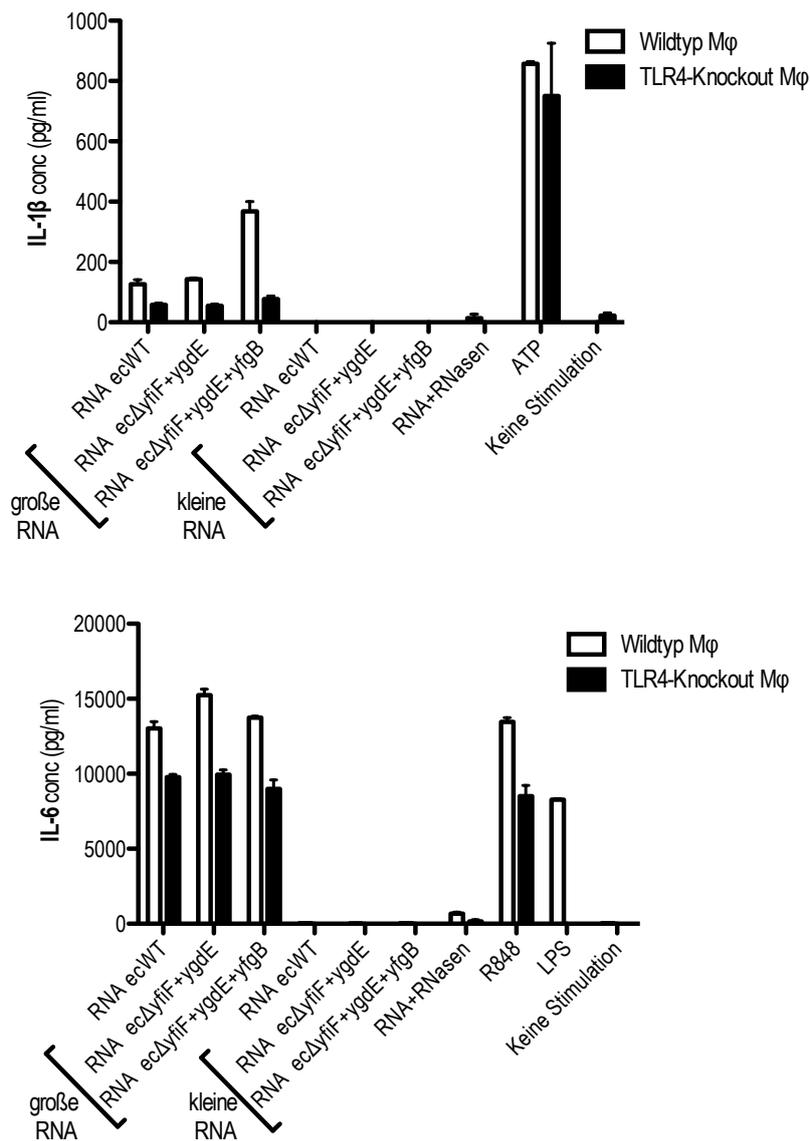
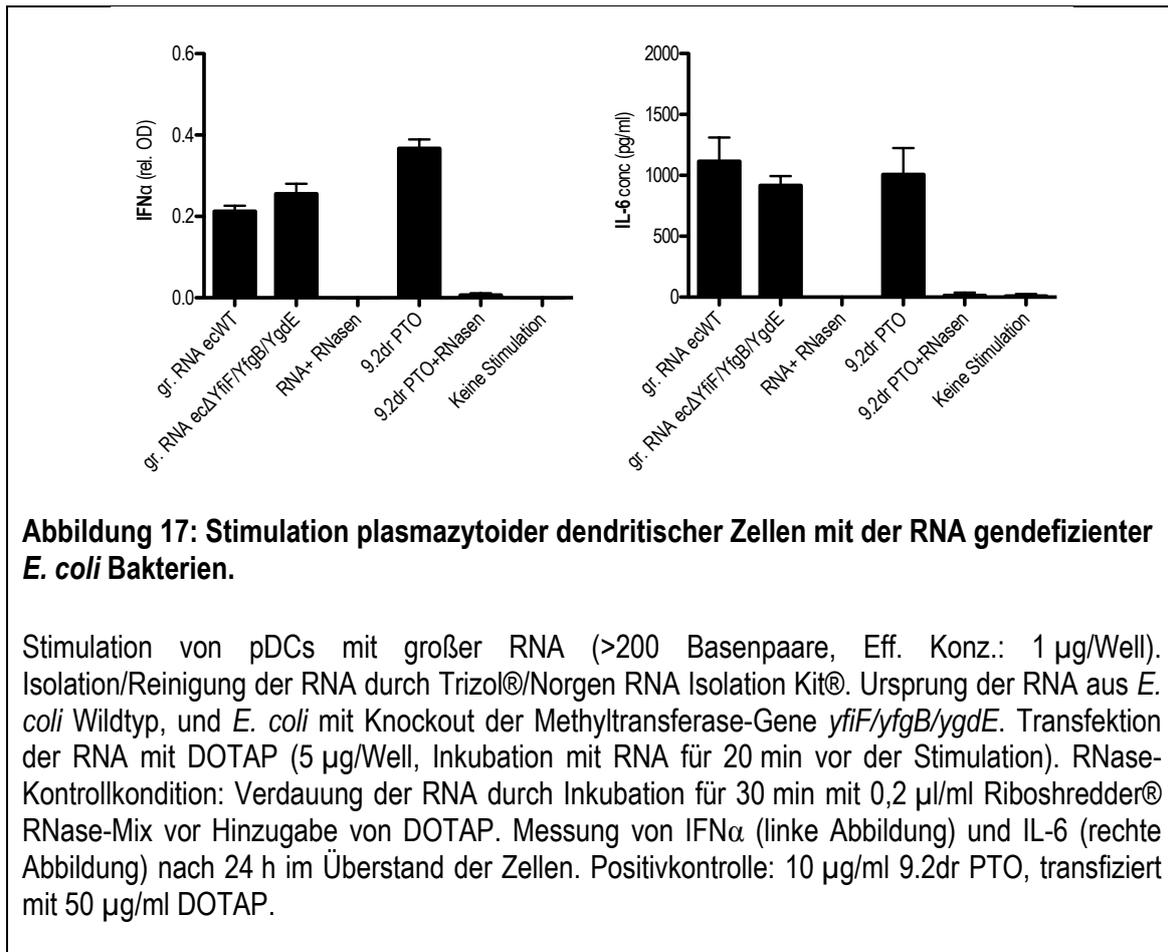


Abbildung 16: Stimulation von Makrophagen mit RNA gendefizienter *E. coli* Bakterien.

Stimulation von *bone marrow-derived macrophages* (WT/TLR4-Defizienz) mit aufgereinigter RNA. Zwei unterschiedliche RNA Fraktionen: Große RNA = >200 Basenpaare, kleine RNA = <200 Basenpaare. Ursprung der RNA aus *E. coli* Wildtyp, und *E. coli* mit Knockout der Methyltransferase-Gene *ygdE/yfiF* oder *yfiF/yfgB/ygdE*. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe von Trizol® und Norgen RNA Isolation Kit®.

Stimulation mit 1 µg/Well großer RNA und 0,3 µg/Well kleiner RNA. Transfektion der RNA mit DOTAP (Menge der RNA:DOTAP = 1:5; Inkubation mit RNA vor der Stimulation für 20 min). Zur Kontrolle erfolgte bei der Kondition „RNA+RNasen“ eine Verdauung der RNA mit 0,2 µl/ml Riboshredder® RNase-Mix (30 min Verdauung vor der Inkubation mit DOTAP). Messung von IL-1β (oberes Diagramm) und IL-6 (unteres Diagramm) nach 24 h im Überstand der Zellen. 1 µg/ml LPS diente als Kontrolle des TLR-4-Knockouts der Zellen. Positivkontrolle: 3 mM ATP (Vorstimulation mit 2 µg/ml CpG für 2 h), 0,1 µg/ml R848.



Die Stimulation mit RNA >200 Basenpaare führt sowohl in Wildtyp- als auch in gendefizienten Makrophagen zur Sekretion von IL-1 β und IL-6 (Abbildung 16). Während die Positivkontrolle ATP in beiden Zelltypen eine ähnliche starke Zytokin-Ausschüttung hervorruft, produzieren TLR4-defiziente Zellen insgesamt weniger Zytokine als Reaktion auf RNA. Dies könnte Indiz für LPS-Reste in der RNA sein, die in Wildtyp-Zellen eine höhere Zytokin-Produktion hervorrufen. Möglicherweise sezernieren die TLR4-defizienten Zellen aber auch insgesamt weniger Zytokine. Hinweis hierauf ist die unterschiedliche Sekretion von WT- und KO-Zellen als Antwort auf R848. Die TLR4-defizienten Makrophagen reagieren auf die RNA der unterschiedlichen Bakterienstämme mit ähnlich hoher Zytokin-Ausschüttung. Dies gilt sowohl für IL-1 β als auch für IL-6. Die Gendelektionen scheinen die Zytokin-Ausschüttung nicht zu beeinflussen. Die Wildtyp-Makrophagen reagieren bei Stimulation mit der RNA der *yfiF/yfgB/ygdE*-defizienten Bakterien mit einer deutlich höheren Ausschüttung von IL-1 β als bei Stimulation mit Wildtyp-RNA. Selbiges zeigt sich allerdings nicht bei den TLR4-defizienten Makrophagen. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um eine bei der Aufreinigung nicht entfernte größere Menge LPS in der RNA-Probe.

Bei Verdauung der RNA vor der Stimulation durch RNasen lässt sich die Zytokin-Ausschüttung verhindern. RNA mit einer Länge von weniger als 200 Basenpaaren führte in keinem der oben gezeigten Zelltypen zur Zytokin-Sekretion.

In Abbildung 17 wurden plasmazytoide dendritische Zellen mit der langen Fraktion der RNA stimuliert. Die Wildtyp- und Knockout-RNA unterschied sich nicht signifikant in Bezug auf ihre immunstimulatorische Wirkung. Wie schon in Abbildung 16 lässt sich der Effekt der RNA durch vorherige Verdauung verhindern. Die Positivkontrolle 9.2dr PTO, ein einzelsträngiges 20-Oligoribonukleotid, führt -wie erwartet- zu einer starken Ausschüttung von IFN α und IL-6. Durch Behandlung von 9.2dr PTO mit RNase-Mix wird dies verhindert.

Wie auch bei der Stimulation mit ganzen Bakterien, ruft die RNA der gendefizienten Stämme eine ähnliche Reaktion wie die Wildtyp-Stämme hervor. Der mutmaßlich unterschiedliche m2A-Gehalt der RNA-Proben zeigt in diesem Versuchsaufbau keine abweichenden Effekte. Möglich wäre interpretatorisch beispielsweise eine geringe m2A-Gesamtmenge in der RNA, deren Effekt durch die übrigen RNA-Typen überlagert wird. Es könnte aber auch sein, dass der m2A-Gehalt der RNA keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion hat.

4 Diskussion

4.1 2-Methyladenosin als neues *pathogen-associated molecular pattern*?

Bakterien und andere Mikroorganismen entgehen der Erkennung durch das Immunsystem durch beständige Mutation ihrer Merkmale. Das Immunsystem begegnet dieser Gefahr durch die Erkennung für den Erreger elementar wichtiger, nicht veränderbarer Strukturen. Diese PAMPs haben die Eigenschaft, charakteristisch für zahlreiche Mikroorganismen zu sein und eine wichtige Funktion für ihr Überleben zu haben. Evolutionär hoch konserviert, dienen sie dem Immunsystem als Liganden zahlreicher *pattern recognition receptors* und bewirken im Wirt die Initiation einer durch Zytokine gesteuerten Immunantwort.

4.1.1 Vorkommen und Bedeutung von 2-Methyladenosin

2-Methyladenosin ist ein methylierter Baustein der RNA einiger Mikroorganismen. In *E. coli* Bakterien findet es sich beispielsweise in der t- und rRNA. Von eukaryotischen Zellen wird m2A hingegen nicht produziert (Dunin-Horkawicz et al. 2006). Wir konnten erstmals zeigen, dass chemisch synthetisiertes m2A murine Knochenmarkzellen zur Sekretion großer Mengen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β anregt. N-6-Methyladenosin, eine strukturverwandte, ubiquitär vorkommende Nucleosidmodifikation sowie unmodifiziertes Adenosin bewirken bei gleichem Herstellungsverfahren und Versuchsaufbau keine IL-1 β -Sekretion. Handelt es sich also bei 2-Methyladenosin um ein bislang unbekanntes PAMP?

In der Literatur finden sich bislang nur wenige Hinweise auf Vorkommen und Wirkung von m2A. Die posttranskriptionale Methylierung der Adenosin-Moleküle zu m2A erfolgt durch die Methyltransferase RlmN und möglicherweise auch TrmG (Crécy-Lagard 2008; Tkaczuk et al. 2007; Toh et al. 2008). m2A kommt in der Nähe des Anticodons mehrerer tRNAs an Position 37 und an Position 2503 am *central loop* der S23-rRNA vor (Cantara et al. 2012; Juhling et al. 2009; Saneyoshi et al. 1972). Insgesamt konnten in *E. coli* Bakterien 120 Moleküle m2A pro Pikomol tRNA gezählt werden (Bruckl et al. 2009).

Durch unsere Arbeitsgruppe wurden *E. coli* Bakterien gezüchtet, denen die Gene *yfgB*, *yfiF* und *ygdE* fehlen. Ohne diese Gene fehlen den Bakterien vermutlich die für die Produktion von 2-Methyladenosin benötigten Enzyme. Um zu überprüfen, welche Bedeutung m2A für die Viabilität der Bakterien hat, verglichen wir ihre Wachstumsgeschwindigkeit mit der von unveränderten *E. coli* Wildtyp-Bakterien. In Abbildung 14 zeigt sich, dass sowohl die gendefizienten Stämme als auch die Wildtyp-Bakterien mit ähnlicher Geschwindigkeit wachsen. Sowohl die Stämme, denen in unterschiedlichen Kombinationen zwei der drei oben genannten Methyltransferasen fehlen, als auch die Bakterien mit drei Knockouts, weichen nicht signifikant von der Wachstumskurve der Wildtyp-Bakterien ab.

Bei Untersuchungen künstlich synthetisierter *E. coli* tRNA konnte von der Arbeitsgruppe um Cantara et al. gezeigt werden, dass Nukleosid-Modifikationen die thermale Stabilität und das Bindungsverhalten der tRNA beeinflussen. m2A scheint in mehreren Arginin-tRNAs für die räumliche Konformation des *anticodon stem loops* (ASL) und dessen Dynamik verantwortlich zu sein. tRNAs ohne m2A zeigten verminderte Bindungsfähigkeit, insbesondere an nicht vollständig kongruente Codons (Cantara et al. 2012). 2-Methyladenosin spielt somit eine Rolle für das Erreichen permissiver Ungenauigkeit (*wobble base pairs*) im Rahmen der Translation.

Der Wegfall von m2A wirkt sich in unserem oben gezeigten Versuch nicht signifikant auf die Wachstumsgeschwindigkeit aus. Die Richtigkeit dieser Beobachtung wird durch Ergebnisse von Toh et al. (2008) bestätigt. In Experimenten der Arbeitsgruppe unterschied sich die Verdopplungszeit von Bakterien mit *yfgB*-Knockout nur minimal vom Wildtyp-Stamm. Jedoch konnte die Arbeitsgruppe eine erhöhte Empfindlichkeit der Bakterien auf verschiedene Antibiotika beobachten.

Möglicherweise verfügen die Bakterien unter den optimalen Wachstumsbedingungen in unserem Versuch über Kompensationsmechanismen, um Einschränkungen bei der Proteinbiosynthese auszugleichen. Es ist jedoch vorstellbar, dass sich das Fehlen von m2A unter den natürlichen Bedingungen einer Infektion im Körper stärker auf die Viabilität auswirkt. Hierbei könnten suboptimale Wachstumsbedingungen zum Versagen der bakteriellen Kompensationsmechanismen und damit zur Selektion m2A-produzierender Bakterien führen. Auch wenn m2A nicht essentiell für das Wachstum der Bakterien *in vitro* ist, könnte es sich daher um ein die Pathogenität steigerndes PAMP handeln. Hierauf deutet auch die Funktion anderer

Nukleosid-Modifikationen hin, die in Kombination mit m2A *in vitro* wichtig für die Anlagerung des Anticodons an das Codon sind (Cantara et al. 2012).

m2A wurde neben seiner Rolle als RNA-Bestandteil in Experimenten anderer Arbeitsgruppen auch als potenziell antibakterielle Substanz untersucht. Es zeigte sich, dass es *in vitro* bei Zugabe zu einer Bakterienkultur einen hemmenden Effekt auf die Viabilität von Mykobakterien hat (*minimal inhibitory concentration*: 3 µg/ml) (Barrow et al. 2003). Die bakteriotoxische Wirkung kommt durch die Umwandlung von 2-Methyladenosin zu Methyl-AMP durch eine Adenosin-Kinase zustande. Methyl-AMP akkumuliert und hemmt die Protein- und DNA-Synthese. Dies kann sowohl bei extra- als auch bei intrazellulär in Makrophagen vorliegenden *M. tuberculosis* Bakterien beobachtet werden. Da humane und murine Zellen die verantwortliche Adenosin-Kinase nicht exprimieren, beschränkt sich diese inhibitorische Wirkung auf Mykobakterien (Long et al. 2003; Parker et al. 2004).

4.1.2 Erkennung von 2-Methyladenosin durch Immunzellen

Um verantwortliche Zelltypen zu identifizieren stimulierten wir unterschiedliche Zell-Populationen und analysierten die in das Medium ausgeschütteten Zytokine. Bei Knochenmarkzellen und *bone marrow-derived macrophages* konnte Sekretion von IL-1 β und IL-6 als Antwort auf m2A gemessen werden. Weiterhin konnte durch unserer Arbeitsgruppe mittels durchfluss-zytometrischer Analyse gezeigt werden, dass auch myeloide Vorläuferzellen aktiviert werden. Plasmazytoide dendritische Zellen, konventionelle dendritische Zellen, Splenozyten und humane PBMCs zeigten keine Aktivierbarkeit.

Die Ursache für diese Unterschiede zwischen unterschiedlichen Zellgruppen wird im Folgenden behandelt. Ein Grund könnte generell die fehlende Expression der für die m2A-Erkennung benötigten Rezeptoren sein. Grundsätzlich unterscheidet sich das Expressionsspektrum der *pattern recognition receptors* von Zellklasse zu Zellklasse. Weiterhin können sowohl die Entwicklung zur reifen Zelle als auch Änderungen des Aktivierungsstatus zur Hoch- oder Runterregulation einzelner Rezeptorgruppen führen. Einige Rezeptoren erkennen Nukleinsäuren oder auch einzelne Nukleotide wie zum Beispiel ATP.

4.1.3 Adenosin-Rezeptoren als neue Muster-Erkennungs-Rezeptoren?

Als möglicherweise für die Erkennung von 2-Methyladenosin verantwortliche Rezeptoren wurden von unserer Arbeitsgruppe unter anderem die Adenosin-Rezeptoren untersucht. Sie teilen sich in zwei pro- und zwei anti-inflammatorische Subtypen auf.

Initial inhibierten wir die einzelnen Adenosin-Rezeptor-Subtypen in Knochenmarkzellen (Abbildung 5) durch spezifische pharmakologische Antagonisten, um zu überprüfen, ob 2-Methyladenosin daraufhin immer noch von den Zellen erkannt würde. Hierfür wurden als Rezeptorantagonisten die Substanzen DPCPX (A_1 -Rezeptor), ZM241385 (A_{2A} -Rezeptor), MRS1754 (A_{2B} -Rezeptor) und MRS1220 (A_3 -Rezeptor) in Konzentrationen von 5-10 μ M eingesetzt. Es zeigte sich, dass die durch m2A bedingte IL-1 β -Sekretion durch Blockade des A_{2A} -Rezeptors stark vermindert werden kann. Gleichzeitig erhöht sich die IL-1 β -Konzentration im Medium bei Applikation des Antagonisten für den A_1 -Rezeptor vor Stimulation mit m2A.

Die Wirksamkeit des A_{2A} -Rezeptor-Antagonisten ZM241385 wurde in Abb. 10 durch Messung der intrazellulären cAMP-Produktion nach Stimulation des A_{2A} -Rezeptors überprüft. Die Konzentration von cAMP, das als frühes Produkt des kanonischen Adenosin-Rezeptor-Signalwegs durch die eng mit dem A_{2A} -Rezeptor verknüpfte Adenylylcyclase produziert wird, konnte durch Anwenden von ZM241385 stark vermindert werden. Dies dient als Indiz dafür, dass der Inhibitor in unserem Versuchsaufbau und in der eingesetzten Dosis tatsächlich wirkt. Weiterhin wurden ähnliche Konzentrationen von Chavez-Valdez et al. (2009); Ouyang et al. (2013) verwendet. Generell ist jedoch zu beachten, dass unspezifische Effekte der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Bei der Betrachtung des Adenosin-Rezeptor-Signalwegs erscheinen unsere Beobachtungen schlüssig: Während der A_{2A} -R die Adenylylcyclase mittels eines stimulatorischen G-Proteins aktiviert und zur Erhöhung des intrazellulären cAMPs führt, inhibiert der A_1 -Rezeptor die Adenylylcyclase. Die beiden Rezeptoren vermitteln somit konträre Wirkungen im Zytosol (Kull et al. 2000; van Calker et al. 1979). Würde die Wirkung von m2A also über den kanonischen Signalweg des A_{2A} -Rezeptors vermittelt, führte eine intrazelluläre Anhebung des cAMPs zur Sekretion von IL-1 β . Der A_1 -Rezeptor bewirkt gleichzeitig eine Senkung des intrazellulären cAMPs und hypothetisch dadurch eine Verringerung der Ausschüttung von IL-1 β . m2A entfaltet somit möglicherweise zusätzlich zur stimulierenden Wirkung über den A_{2A} -R eine hemmende

Wirkung über den A₁-Rezeptor. Wird die cAMP-senkende Funktion des A₁-Rezeptors durch pharmakologische Blockade verhindert, überwiegt dadurch möglicherweise die cAMP-steigernde Wirkung des A_{2A}-Rezeptors und damit steigt die Ausschüttung von IL-1 β .

Bestätigt werden unsere Ergebnisse durch Messungen des intrazellulären cAMP-Spiegels (Abbildung 10). Nach Stimulation mit m2A konnten wir eine Erhöhung des cAMPs messen. Blockierten wir vorher den A_{2A}-Rezeptor, konnte diese Erhöhung verringert werden. In nicht gezeigten Daten konnten wir außerdem eine Blockade des cAMP-Anstiegs feststellen, wenn zeitgleich zur Gabe von m2A der A₁-Rezeptor stimuliert wurde.

In starkem Kontrast zu unseren Ergebnissen steht die bislang gängige Meinung, dass die A₂-Rezeptor-Subtypen anti-inflammatorische Wirkung haben. Bei Zellschädigung und -stress, ausgelöst beispielsweise durch Hypoxie, entsteht in den Zellen ein Überschuss an Adenosin. Dieser kann in den Extrazellulärraum gelangen und auf umliegenden Immunzellen den A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptor aktivieren. Der daraus resultierende erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel wirkt laut der gängigen Meinung schließlich inhibierend auf NF κ B und damit die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine. Dies konnte bei *in vivo* Versuchen wie LPS- und CpG-Sepsis-Modellen in Mäusen gezeigt werden (Bourne et al. 1974; Lukashev et al. 2004).

Auch Ohta et al. zeigen, dass A_{2A}-R-defiziente Mäuse an überschießenden Immunantworten und damit an inflammatorischer Gewebszerstörung leiden. Die Arbeitsgruppe untersuchte in ihrer Publikation Lebergewebe nach Applikation von Concanavalin A und maß die Zytokin-Pegel im Blut nach Stimulation mit LPS. Während der A_{2A}-Rezeptor jedoch gemäß dem Fazit der Studie Inflammation vermindert, ist der Spiegel von IL-1 β im Serum der A_{2A}-Rezeptor-defizienten Mäuse in Ohta's Ergebnissen niedriger als im Wildtyp-Serum. Die Spiegel von IL-6, IL-12p40 und TNF α sind in den gendefizienten Tieren entsprechend einer stärkeren Entzündungsreaktion signifikant höher (Ohta et al. 2001). Auch wenn das Fehlen des A_{2A}-Rezeptors also insgesamt zu einer Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine führt, scheint dies nicht für das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-1 β zu gelten. Die Daten von Ohta unterstützen daher unsere These, dass eine Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors zur Sekretion von IL-1 β führen kann.

Erst 2013 wurde durch Ouyang et al. Ergebnisse publiziert, die erstmalig auf eine Verbindung des A_{2A}-Rezeptors und Initiation von IL-1 β -Ausschüttung schließen lassen. In Versuchen der Arbeitsgruppe zeigten sich Hinweise darauf, dass der Adenosin-Rezeptor an der

Aufrechterhaltung einer andauernden Inflammation beteiligt ist. Ouyang et al. fanden im Gegensatz zu unseren Ergebnissen jedoch keine Hinweise darauf, dass die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren alleine bereits zur IL-1 β -Ausschüttung führen kann (Ouyang et al. 2013).

Die Expressionslevel der einzelnen Rezeptoren unterscheiden sich stark zwischen unterschiedlichen Zellpopulationen. Dies könnte erklären, warum in unseren Versuchen nur murine Knochenmarkszellen, aus Knochenmark gezüchtete Makrophagen und myeloide Vorläuferzellen auf m2A reagierten, nicht aber dendritische Zellen, Splenozyten, humane PBMCs oder die immortalisierte Makrophagen-Zelllinie J774. Beispielsweise für plasmazytoide dendritische Zellen ist ein niedriges Expressionslevel des A_{2A}-R bekannt (Hasko et al. 2008). Konträr dominieren auf reifen murinen Makrophagen laut Hasko et al. (2007) eher der A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptor. Dies bestätigt auch unsere Versuche, in denen Makrophagen auf 2-Methyladenosin mit Sekretion von Interleukinen reagieren.

Um die mit Inhibitoren der Adenosin-Rezeptoren gewonnenen Daten zu bestätigen, haben wir in darauf folgenden Versuchen spezifische Agonisten verwendet. Wir erhofften uns, mit dem A_{2A}-R-Agonisten CGS21680, vergleichbar zu 2-Methyladenosin, Interleukin-1 β -Sekretion hervorrufen zu können.

A _{2A} -Rezeptor-Agonist:	K _i -Wert für andere Rezeptor-Subtypen (nM):			
	A ₁ -R	A _{2A} -R	A _{2B} -R	A ₃ -R
NECA	14	20	140	25
CGS21680	289	27	>10000	67
DPMA	168	153	>10000	106
Binodosenon	48000	270	430000	930
ATL-146e	77	0.5	N.D.	45
CV-3146	>10000	290	>10000	>10000

Tabelle 3: Übersicht über die Agonisten der Adenosin-Rezeptoren (entnommen aus Jacobson et al. (2006)).

Sowohl der A₁-Agonist Cyclopentyladenosin als auch CGS21680 führten erst bei hoher effektiver Konzentration (ca. 1 mM) zur Sekretion von IL-1 β . Bei niedriger Stimulus-Konzentration blieb die Sekretion knapp unter der Nachweisgrenze. Da beide Substanzen in DMSO gelöst werden, ist denkbar, dass die Kombination aus dem Wirkstoff und einer DMSO-Konzentration im Medium

von bis zu 1 % die Sekretion bedingt. Dies bestätigte sich bei Stimulation mit einer vergleichbaren Menge des Lösungsmittels ohne CGS21680 (Daten nicht gezeigt).

In Tabelle 3 findet sich eine Übersicht der Affinität spezifischer Agonisten zu den einzelnen Rezeptor-Subtypen. Es fällt auf, dass das von anderen Arbeitsgruppen meist für die Stimulation von Nervenzellen verwendete CGS21680 eine zehnfach höhere Affinität zum A_{2A} -Rezeptor als zum A_1 -Rezeptor hat. Bei der in anderen immunologischen Studien verwendeten, nicht frei verkäuflichen Substanz ATL-146e ist die Affinität zum A_{2A} -Rezeptor 150-fach höher. Möglicherweise ist CGS21680 daher zur Charakterisierung von Immunzellen aufgrund des insgesamt eher niedrigen Expressionsniveaus der einzelnen Adenosin-Rezeptor-Subtypen nicht spezifisch genug. Bislang ist unklar, wie hoch die Affinität von m2A zu den einzelnen Adenosin-Rezeptor-Subtypen ist. Ein stärker zum A_{2A} -Subtyp gewichtetes Verhältnis könnte erklären, wieso m2A und nicht CGS21680 zur IL-1 β Ausschüttung führt. Eine andere Ursache könnten jedoch auch weitere, von den Adenosin-Rezeptoren unabhängige Erkennungsmechanismen sein, welche die Wirkung von m2A vermitteln.

4.1.4 Von der Erkennung von 2-Methyladenosin zur Sekretion von Interleukin-1 β

4.1.4.1 Die Rolle der Adenylylcyclase

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass m2A möglicherweise vom Adenosin-Rezeptor A_{2A} erkannt wird. Um die Beteiligung der einzelnen Stufen des Signalwegs zu untersuchen, stimulierten bzw. inhibierten wir die Enzyme einzeln und analysierten danach die Zytokin-Ausschüttung. Das stimulatorische G-Protein, mit dem der A_{2A} -Rezeptor verknüpft ist, bewirkt eine Aktivierung der intrazellulären Adenylylcyclase, die daraufhin cAMP als *second messenger* produziert. In unseren Experimenten stimulierten wir das Enzym mit dem Agonisten Forskolin und maßen danach die IL-1 β -Ausschüttung (Abbildung 8). Die Stimulation von Knochenmarkzellen mit Forskolin führt ab einer effektiven Konzentration von 50 μ M zur hochsignifikanten Ausschüttung von IL-1 β . Stimuliert man mit m2A und Forskolin simultan, führt dies zu einer IL-1 β -Ausschüttung, die die reine Summation der Zytokin-Mengen der Einzelstimulationen noch übertrifft. Die Kostimulation von Nigericin und Forskolin bewirkt keine vergleichbare Steigerung der Sekretion. Als Ursachen für die stark erhöhte Ausschüttung nach Kostimulation mit m2A und Forskolin kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Es wäre

beispielsweise denkbar, dass die Aktivierung des kanonischen A_{2A} -R Signalwegs auf mehreren Ebenen gleichzeitig zu einer überschießenden Sekretion von IL-1 β führt, möglicherweise im Sinne einer verstärkten positiven Rückkopplung. Seit Kurzem gibt es zusätzlich Hinweise, dass Stimulation und Aktivierung des kanonischen Signalwegs des A_{2A} -Rezeptors für die Aufrechterhaltung von NLRP3-Inflammasom-Aktivität verantwortlich sein könnten (Ouyang et al. 2013). Diese könnte zu verlängerter IL-1 β -Sekretion führen. Da wir bei Stimulation sowohl mit Forskolin als auch vermutlich mit m2A in diesen Signalweg stimulierend eingegriffen haben, wäre es zumindest nach Ouyang et al. denkbar, dadurch die NLRP3-Aktivierung verlängert zu haben. In unseren Versuchen zeigten sich andererseits bislang keine Hinweise auf eine Verbindung von NLRP3 und Adenosin-Rezeptoren. Zudem fehlt bei Kostimulation mit Forskolin und Nigericin die Steigerung der IL-1 β -Sekretion vollständig, obwohl es sich bei Nigericin um einen NLRP3-Stimulus handelt. Nach der Theorie von Ouyang et al. hätte die Wirkung von Nigericin durch Forskolin ebenfalls verstärkt werden müssen. Zusammenfassend scheint es daher unklar, wodurch die synergistischen Effekte bei Kostimulation mit m2A und Forskolin verursacht werden. Nicht ausgeschlossen ist, dass m2A abgesehen vom A_{2A} -Rezeptor auch noch andere, bislang unbekannte Signalwege aktiviert, die sich gegenseitig potenzieren. Weiterhin könnten bei der eingesetzten Forskolin Konzentration von 50 μ M bzw. 100 μ M auch unspezifische Effekte eine Rolle spielen.

Auf pharmakologischem Weg zeigen wir also erstmals, dass die Stimulation der Adenylylcyclase und damit Erhöhung des intrazellulären cAMPs zur Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β in Immunzellen führt. Dies steht in deutlichem Gegensatz zur bisherigen Annahme, dass ein hoher cAMP-Spiegel anti-inflammatorische Mechanismen in Gang setzt (Bourne et al. 1974). Messungen des intrazellulären cAMPs (Abbildung 10) bestätigten die Erhöhung durch Forskolin und m2A. Die cAMP-Produktion durch m2A ist jedoch etwa 50 % niedriger als die durch Forskolin. Gleichzeitig fällt bei dem Vergleich des Effekts von m2A und Forskolin auf die Zytokin-Sekretion auf, dass Stimulation mit m2A zu weitaus mehr IL-1 β führt. Dies könnte ein Hinweis auf weitere alternative Signalwege der m2A-Erkennung abseits des kanonischen Adenosin-Rezeptor-Signalwegs sein. Ob diese Verschaltungen der Adenosin-Rezeptoren sind, die durch Forskolin nicht aktiviert werden, oder von den Adenosin-Rezeptoren unabhängige Signalwege, ist bislang unklar. Wie oben erwähnt wurde von Ouyang et al. ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren und der Verlängerung der NLRP3-Aktivität entdeckt. Dies konnten wir jedoch im Falle der IL-1 β -Sekretion, die durch m2A

hervorgerufen wird, nicht bestätigen. Die Wirkung von m2A wurde in unseren Versuchen unabhängig von NLRP3 vermittelt (Alexander Jarosch, Dissertation 2014).

In einem weiteren Versuch wurde, anstatt die Adenylylcyase direkt zu stimulieren, ihr spezifischer Inhibitor 2',5'-Dideoxyadenosin eingesetzt. Unser Ziel war es, durch Inhibition der Adenylylcyase den Signalweg des A_{2A}-Rezeptors zu blockieren und somit den Effekt von m2A zu verringern. In Konzentrationen von 0,1 bis 100 µM zeigte DDA jedoch keinen Erfolg. Es verhinderte die IL-1β-Sekretion weder durch m2A noch durch Nigericin. Erklärung für dieses Ergebnis liefert eventuell die Messung des intrazellulären cAMPs. Es zeigte sich hier, dass die Applikation von DDA nur einen kleinen Teil der cAMP-Produktion durch m2A oder auch Forskolin zu blockieren vermag. Möglicherweise lässt sich also die Adenylylcyase in Knochenmarkzellen durch DDA nicht vollständig genug hemmen, um ihre Wirkung komplett zum Erliegen zu bringen.

4.1.4.2 Die Rolle der Proteinkinase A

Im Rahmen des Adenosin-Rezeptor-Signalwegs wird durch den Anstieg des cAMPs die Proteinkinase A aktiviert. Diese vermittelt durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB ihre Wirkung auf zahlreiche Teilbereiche der Genexpression. Um den Effekt der PKA auf die IL-1β-Sekretion zu analysieren, verwendeten wir den Inhibitor H89. Im Versuch wurde vor der Stimulation mit 2-Methyladenosin oder der Kontrollsubstanz Nigericin die PKA der Knochenmarkzellen durch H89 inhibiert. Die darauf folgende Analyse der Zellüberstände zeigte, dass die Blockade der PKA die Zytokin-Ausschüttung durch m2A stark vermindert. Der IL-1β-Spiegel fiel in Abbildung 11 bei Einsatz von 10 µM H89 auf unter 50 % des Vergleichswert ohne Blockade des Enzyms. Auf die durch Nigericin bedingte IL-1β-Produktion konnte hingegen kein hemmender Effekt festgestellt werden. Die Blockade der PKA löst hier keine signifikanten Veränderungen der IL-1β-Sekretion aus. H89 scheint seine Wirkung also unabhängig von unspezifischen Einflüssen wie Zelltod oder -schädigung zu entfalten. Die Substanz H89 wird auch in zahlreichen anderen Publikationen verwendet. Trotz eines IC₅₀-Werts von 48 nM wird sie oft in Konzentrationen im micromolaren Bereich eingesetzt. Dies ist unter anderem dadurch begründet, dass H89 in Zellen kompetitiv mit dem zahlreich vorhandenen ATP um die Bindungsstelle konkurriert. Die hier gezeigte Konzentration von 10 µM liegt dabei noch unter der von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten Konzentration (30 µM, (Chijiwa et al. 1990)). Auch wenn H89 als selektiver Inhibitor gilt ist zu beachten, dass theoretisch auch andere Kinasen mit

ähnlichen Molekülstrukturen durch H89 inhibiert werden könnten (Hidaka et al. 1990; Lochner et al. 2006). Dieser Effekt wird bei steigenden effektiven Konzentrationen noch verstärkt. Bei einer Konzentration von 10 μM werden laut Hidaka et al. möglicherweise noch acht andere Kinasen beeinflusst, wobei der Effekt auf die PKA am stärksten zu sein scheint.

Bei Betrachtung der aktuellen Literatur zur Regulation immunologischer Antworten durch cAMP und PKA fällt auf, dass diesem Signalweg bislang rein anti-inflammatorische Funktionen zugeschrieben wurden. Bereits 1974 fassten Bourne et al. (1974) in einem Review mehrere Hinweise auf die anti-inflammatorische Wirkung von cAMP zusammen. Erst vor kurzem zeigte eine Arbeitsgruppe, dass ein hoher cAMP-Spiegel in Makrophagen aktivierungshemmend auf das NLRP3-Inflammasom wirkt (Lee et al. 2012). Ebenso ist bekannt, dass der durch die PKA phosphorylierte Faktor CREB mit NF κ B um CBP konkurriert und somit supprimierende Wirkung auf die Zytokin-Sekretion hat (Bshesh et al. 2002). Gegenteiliges wurde von Ouyang et al. (2013) beschrieben. In peritonealen Makrophagen konnte die Arbeitsgruppe eine Verlängerung der IL-1 β Sekretion messen, wenn über Adenosin-Rezeptoren der Signalweg über cAMP, PKA und HIF-1 α aktiviert war.

In Nicht-Immunzellen konnten ebenfalls Daten gesammelt werden, die PKA mit IL-1 β in Verbindung bringen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass über die Signalweg-Stationen cAMP und PKA in Osteoblasten IL-1 β -Sekretion hervorgerufen werden kann (Park et al. 2004). Auslöser für die Sekretion war in den Experimenten der Arbeitsgruppe Prostaglandin E₂. Analog zur von uns beobachteten Zytokin-Ausschüttung durch 2-Methyladenosin, ließ sich die Wirkung von Prostaglandin E₂ mittels H89 unterdrücken. Weiterhin reagierten Osteoblasten laut Park et al. auf Stimulation mit Forskolin mit der Sekretion von IL-1 β . Für eine möglicherweise pro-inflammatorische Rolle der Proteinkinase A sprechen auch neue Erkenntnisse zu erblichen Störungen des cAMP-Signalings und der Autoimmunerkrankung NOMID (*neonatal-onset multy system inflammatory disease*) (Almeida et al. 2011). Betroffene Patienten entwickeln bei beiden Krankheiten ähnliche, tumorartige Läsionen an den langen Röhrenknochen. Es kommt jeweils zu einer Überaktivierung der Caspase-1 in osteoblastischen Progenitorzellen. Almeida et al. zeigen, dass diese durch cAMP und PKA vermittelt wird, die schließlich den Transkriptionsfaktor ETS-1 (*E-twenty six*) aktivieren.

Bei genauerer Betrachtung gibt es also Hinweise, welche die von uns beobachtete Initiation der IL-1 β -Sekretion über bislang als anti-inflammatorisch geltende Signalwege unterstützen. Die

Beobachtungen der Arbeitsgruppen beschränken sich größtenteils auf Osteo- und Fibroblasten. Es stellt sich die Frage, wie weit sich diese Ergebnisse auf Immunzellen übertragen lassen. Die von Ouyang et al. gezeigten Effekte in peritonealen Makrophagen konnten wir bislang in eigenen Versuchen noch nicht reproduzieren. Möglicherweise spielen bei unseren Stimulationsversuchen aber auch nicht nur Immunzellen, sondern auch andere im Knochenmark enthaltene Zellen eine wichtige Rolle. Dies wäre vorstellbar, da abgesehen von Makrophagen noch nicht alle m2A-erkennenden Zelltypen identifiziert wurden. Da sowohl Adenosin-Rezeptoren als auch die mit diesen verschaltete PKA in zahlreichen Zelltypen vorhanden sind, wäre dies gut möglich (Fredholm et al. 2001a).

4.1.4.3 Die Suche nach dem verantwortlichen Inflammasom

Einer der letzten Schritte vor der Sekretion des reifen IL-1 β ist die Maturierung durch Abspaltung des pro-Peptids. Hierfür sind unter anderem Inflammasome verantwortlich, die die benötigte Caspase-1 rekrutieren und aktivieren. Bislang ist noch unklar, welches Inflammasom das bakterielle Nukleosid 2-Methyladenosin erkennen kann. Mit Inflammasom-Knockout-Mäusen versuchten wir, die in Frage kommenden bislang bekannten Proteinkomplexe NLRP1b, NLRP3, NLRP6, NLRC4 und AIM-2 zu überprüfen. Bei der Stimulation der Knochenmarkzellen von NLRP3-defizienten Mäusen zeigte sich, dass m2A unabhängig von diesem erkannt wird (Versuch erstmals durchgeführt von Alexander Jarosch und Christian Hotz; Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 12 werden die Ergebnisse der Stimulation der Zellen von ASC-defizienten Tieren dargestellt. ASC dient als Adapter-Protein zwischen Inflammasom und proCaspase-1. Dieses wird von allen Inflammasomen, die über keine eigene CARD-Domäne verfügen, akquiriert (Srinivasula et al. 2002). Unsere Ergebnisse zeigen, dass 90 % der durch m2A bedingten IL-1 β -Sekretion abhängig vom Protein ASC ist. Wahrscheinlich können daher NLRP1b und NLRC4, die beiden Inflammasome, die über eine CARD-Domäne verfügen, ausgeschlossen werden. Zu beachten ist jedoch die Publikation von Broz et al. (2010). Die Autoren postulieren, dass beide Inflammasome zwar durch ihre CARD-Domäne die proCaspase-1 rekrutieren können, jedoch für die autokatalytische Aktivierung weiterhin ASC notwendig sei. Die autokatalytische Aktivierung ist möglicherweise essentiell für die Zytokin-Sekretion.

Durch die von uns bewiesene Abhängigkeit der m2A-Erkennung von ASC lassen sich Caspase-1 unabhängige IL-1 β -Reifungsprozesse ausschließen. Solche wären beispielsweise die Maturierung von proIL-1 β durch Serin-Proteasen neutrophilen Ursprungs (Kathepsin G, Neutrophilen Elastase, Proteinase 3), oder Mastzell-Proteasen wie Granzyme A und Chymase (Black et al. 1991; Guma et al. 2009; Hazuda et al. 1990; Irmeler et al. 1995; Mizutani et al. 1991). Für keines der genannten Enzyme ist die Kopplung an das Adapter-Protein ASC bekannt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte die Ergebnisse mit ASC-defizienten Zellen durch Verwendung eines spezifischen Inhibitors der Caspase-1 untermauern. Auch durch diesen lässt sich die IL-1 β -Sekretion verhindern (Daten nicht gezeigt). Die Erkennung von 2-Methyladenosin scheint also tatsächlich über den Signalweg der Inflammasome bewerkstelligt zu werden. Durch beide Versuche können wir zusätzlich zeigen, dass es sich bei dem im Zell-Überstand gemessenen IL-1 β tatsächlich um das reife Zytokin und nicht um freigewordenes proIL-1 β handelt. Letzteres kann vom ELISA-Kit ebenfalls detektiert werden. Für die Produktion von proIL-1 β benötigen die Zellen weder ASC noch Caspase-1. Es wäre daher auch in ASC-defizienten Zellen gebildet worden, in denen wir jedoch keine Zytokin-Sekretion messen konnten.

4.2 Der Effekt von 2-Methyladenosin als Bestandteil von bakteriellen Molekülen

Einzelne 2-Methyladenosin-Moleküle führen in hoher Konzentration -wie oben gezeigt- zu einer starken Aktivierung von Immunzellen. Es stellt sich die Frage, ob m2A auch als Bestandteil bakterieller Moleküle, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, relevante pro-inflammatorische Reaktionen hervorruft.

4.2.1 Der Einfluss von 2-Methyladenosin auf die Erkennung von Bakterien

Um den Effekt von m2A auf die Immunantwort nach der Erkennung von Bakterien zu messen, züchtete Alexander Jarosch Methyltransferase-defiziente Bakterien. Diese haben aufgrund des Knockouts der Gene *yfiF*, *yfgB* und *ygdE* vermutlich die Fähigkeit verloren, unmodifizierte Adenosin-Moleküle in ihrer RNA in m2A umzuwandeln (Kowalak et al. 1995; Toh et al. 2008). Mit

Hilfe dieser Stämme konnten wir die pro-inflammatorische Wirkung von Bakterien ohne m2A mit der von Bakterien mit m2A vergleichen. Um den überlagernden Effekt bakterieller Lipopolysaccharide als stark pro-inflammatorischen Stimulus zu minimieren, stimulierten wir neben Wildtyp-Immunzellen auch die Zellen von TLR4-defizienten Tieren. Diesen fehlt der *Toll-like*-Rezeptor zur Erkennung von LPS (Beutler et al. (2003), Review). Dadurch war es uns möglich, pro-inflammatorische Effekte durch LPS zu verhindern und auch potenzielle kleine Effekte von m2A zu identifizieren. In Abbildung 15 wurden murine *bone marrow-derived macrophages* mit Wildtyp- und gendefizienten Bakterien stimuliert. Die Bakterien wurden vor der Stimulation in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen eine durch Hitzebehandlung getötet wurde.

Die Wildtyp-Makrophagen schütteten sowohl bei Stimulation mit lebenden als auch mit toten Bakterien IL-1 β aus. Bei Betrachtung der TLR4-defizienten Makrophagen fällt hingegen auf, dass diese kein IL-1 β als Antwort auf Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien produzieren. Unter keiner Versuchsbedingung zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Wirkung der Wildtyp- oder der gendefizienten Bakterien. 2-Methyladenosin scheint also die Reaktion der Immunzellen auf ganze Bakterien nicht zu beeinflussen.

Da m2A erst posttranskriptional in der bakteriellen RNA modifiziert wird, liegt es in lebenden Bakterien vermutlich nicht frei in großen Mengen vor. Es ist daher sicherlich fraglich, ob die Menge einzelner m2A-Moleküle durch Stimulation mit MOI 4 ausreicht, um vergleichbare Verhältnisse wie bei Stimulation mit künstlich synthetisiertem m2A zu schaffen. Von anderen Arbeitsgruppen wird bei Infektionsversuchen mit *E. coli* Bakterien meist eine MOI zwischen 1 und 100 verwendet, wobei bei Stimulationsversuchen oft ein Verhältnis Bakterien:Zellen = 20:1 eingesetzt wird (Amiel et al. 2007; Bhushan et al. 2011; Lu et al. 2012). In zukünftigen Versuchen müsste daher eventuell eine höhere Bakterienmenge verwendet werden, um einen Effekt von m2A ausschließen zu können.

Neben der Erkennung über Adenosin-Rezeptoren könnte m2A seine Wirkung jedoch auch als Bestandteil der bakteriellen RNA entfalten. Wie oben beschrieben, wird das immunogene Potenzial bakterieller RNA stark durch das Vorliegen modifizierter Nukleoside beeinflusst. Schon eine einzelnes durch 2'-O-Methylierung modifiziertes Nukleosid reicht aus, um die Erkennung von *E. coli* tRNA durch Immunzellen zu verhindern (Jockel et al. 2012).

Das von uns gemessene Muster der Zytokin-Ausschüttung spricht für die Hypothese von Sander et al. (2011) zur Erkennung bakterieller mRNA. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nur lebende Bakterien aufgrund ihrer mRNA zu IL-1 β -Ausschüttung führen. Da die mRNA in kürzester Zeit nach dem Tod der Bakterien abgebaut wird, liegt in unseren hitzeinaktivierten Bakterien-Proben höchstwahrscheinlich keine intakte RNA vor. Hitzeinaktivierte Bakterien führen bei unserer Stimulation von TLR4-KO-Makrophagen, vergleichbar mit den Ergebnissen von Sander et al., nicht zur Sekretion von IL-1 β . Für die Erkennung der mRNA und die daraus folgende Immunantwort ist unter anderem das NLRP3-Inflammasom verantwortlich (Kanneganti et al. 2006). Das von uns bei Stimulation mit lebenden Bakterien gemessene IL-1 β -Signal könnte sich daher aus den Antworten der Makrophagen auf LPS und die bakterielle RNA zusammensetzen. Für diese Annahme spricht, dass die IL-1 β -Sekretion bei Inaktivierung und damit dem Abbau der RNA der Bakterien sinkt und durch Verhinderung des Effekts von LPS in TLR4-defizienten Zellen völlig fehlt.

Das Niveau der Zytokin-Ausschüttung ist in den gendefizienten Makrophagen insgesamt niedriger als in den Wildtyp-Zellen. Dies ist vermutlich durch Lipopolysaccharide bedingt, welche in hohen Konzentrationen zur Ausschüttung von IL-1 β führen können. Der Mechanismus hierzu ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Daten sprechen sowohl für eine Abhängigkeit der Sekretion von Caspase-8 (Maelfait et al. 2008) als auch für eine Beteiligung von NLRP3 und Caspase-1 (Kanneganti et al. 2006; Li et al. 1995). Möglicherweise erklärt sich die geringere IL-1 β -Ausschüttung der gendefizienten Makrophagen allerdings auch durch ein niedrigeres NF κ B-Aktivierungslevel mit daraus folgender verminderter Bereitstellung von proIL-1 β . Dieses kommt durch die fehlende Aktivierung des TLR4-Rezeptor-Signalwegs zustande. Ein komplettes Fehlen von proIL-1 β als Grund für fehlende IL-1 β -Ausschüttung bei Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien ist eher unwahrscheinlich, da in den Mikroorganismen noch zahlreiche andere PAMPs zur Rekrutierung von NF κ B führen. Dies lässt sich an der deutlichen IL-6-Ausschüttung in den gendefizienten Makrophagen, die ebenfalls über NF κ B verschaltet wird, ablesen.

Die IL-6-Sekretion der Makrophagen zeigt ein der IL-1 β -Sekretion ähnliches Muster. Auch hier gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den gendefizienten und Wildtyp-*E. coli* Bakterien. Unterschiedlich ist, dass die TLR4-defizienten Makrophagen auf hitzeinaktivierte Bakterien mit IL-6-Ausschüttung reagieren, während sie kein IL-1 β produzieren. Neben LPS und mRNA enthalten die Bakterien also auch noch andere PAMPs, die zur Zytokin-Sekretion führen.

Anders als Sander et al. (2011) sehen wir bei hitzeinaktivierten Bakterien eine leicht erniedrigte IL-6-Sekretion im Vergleich zu lebenden Bakterien. Dies könnte analog zur IL-1 β -Sekretion auf den Abbau der RNA nach Erhitzen und somit vermindertes Ansprechen der *Toll-like*-Rezeptoren 7, 8 und 13 zurückzuführen sein. Diese sind in der Lage RNA zu erkennen und die Ausschüttung von IL-6 zu veranlassen (Heil et al. 2004; Hemmi et al. 2002; Hidmark et al. 2012).

Im oben beschriebenen Versuch konnten wir durch Stimulation mit kompletten Bakterien also die Bedeutung von m2A mit Hilfe eines der Physiologie einer Immunantwort ähnlicheren Versuchsaufbaus testen. Zusammenfassend ergaben sich dabei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den gendefizienten Stämmen und den Wildtyp-Bakterien. Auch nach Hitzebehandlung der Bakterien und der daraus resultierenden Zerteilung der RNA in Bruchstücke (Sander et al. 2011) konnten sich keine Unterschiede zwischen den m2A-enhaltenden und m2A-freien Bakterien feststellen lassen.

4.2.2 Der Einfluss von 2-Methyladenosin auf die Erkennung bakterieller RNA

Die eukaryotische RNA unterscheidet sich von der prokaryotischen durch eine 7-Methylguanosin-Kappe sowie eine höhere Zahl modifizierter Nucleoside. Diese Nucleoside können sich auf die Erkennung der RNA durch Immunzellen auswirken. So verhindern beispielsweise eukaryotische Modifikationen die Erkennung durch *Toll-like*-Rezeptoren (Kariko et al. 2005; Koski et al. 2004). Ob m2A als bakterielle Adenosin-Modifikation ebenfalls Einfluss auf die RNA-Erkennung hat, sollte durch nachfolgende Versuche geklärt werden. In vorhergehenden Experimenten unterschied sich die immunstimulatorische Wirkung der Wildtyp-Bakterien nicht von der der Methyltransferase-defizienten Bakterien. Wir haben daher, um überdeckende Einflüsse anderer PAMPs zu entfernen, die RNA der *E. coli* Bakterien isoliert und als Stimulus verwendet.

Ein kritischer Punkt bei der Aufreinigung bakterieller RNA ist das vollständige Entfernen sowohl bakterieller als auch durch den Aufreinigungsprozess bedingter chemischer Rückstände. Bereits kleinste Mengen bakterieller PAMPs wie LPS können zur Überlagerung des Effekts der RNA führen. Eine Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit war daher, eine zuverlässige Methode zur Isolation einer ausreichenden Menge sauberer RNA zu entwickeln.

Durch eine Kombination der Trizol®-Methode zum Isolieren der RNA mit Norgen® Filtersäulen zur Aufreinigung gelang es, besonders reine Proben zu produzieren. Die Kombination dieser Methoden gewährt eine hohe RNA-Ausbeute bei 260/280 nm Absorptions-Quotienten von circa 2,0. Sie wird mittlerweile auch von anderen Arbeitsgruppen angewendet (Hidmark et al. 2012; Mancuso et al. 2009). Die RNA wurde bei der Aufreinigung in lange Spezies (Länge über 200 Basenpaare) und kurze Spezies (Länge unter 200 Basenpaare) aufgeteilt. In der Gruppe der RNA >200 Basenpaare befinden sich neben mRNA auch die 16S- und 23S-rRNA. Zu den kurzen RNA-Spezies werden tRNA und 5S-rRNA gezählt. Als Transfektionsreagenz verwendeten wir DOTAP® mit dem Ziel, die Aufnahme der RNA in die Endosomen zu verbessern. Um letzte Beeinflussungen der Immunzellen durch bakterielle Lipopolysaccharide zu vermeiden, stimulierten wir neben Wildtyp-Zellen als Kontrolle auch TLR4-defiziente Zellen. Weiterhin wurden plasmazytoide dendritische Zellen stimuliert, welche TLR4 nicht exprimieren (Pietras et al. 2006).

In den Abbildungen 16 und 17 werden die Ergebnisse der RNA-Stimulationsversuche dargestellt. RNA <200 Basenpaare führte unabhängig vom Bakterienstamm weder bei Stimulation von Makrophagen noch von pDCs zur Sekretion von Zytokinen. Sie scheint nicht immunaktiv zu sein. Dies wird auch von Mancuso et al. (2009) bestätigt. Die Arbeitsgruppe konnte kein signifikantes immunogenes Potenzial für die kleinen RNA-Spezies von Gruppe-B-Streptokokken feststellen. Weiterhin entfaltet *E. coli* tRNA aufgrund einer für sie spezifischen 2'-O-Nukleosid-Methylierung keine Aktivität an TLR7 (Gehrig et al. 2012; Jockel et al. 2012).

Die großen RNA-Spezies führen sowohl in gendefizienten als auch in Wildtyp-Makrophagen zur Ausschüttung von Zytokinen. Bei vorheriger RNase-Verdauung ruft die RNA keinerlei Zytokin-Sekretion mehr hervor. Dies bestätigt, dass tatsächlich die in den Proben enthaltene RNA für den Immuneffekt verantwortlich ist. Allgemein fällt auf, dass die TLR4-defizienten Makrophagen etwa 50 % weniger IL-1 β und 25 % weniger IL-6 als die Wildtyp-Zellen produzieren. Vermutlich reagieren die Wildtyp-Zellen auf Rückstände bakterieller Lipopolysaccharide in den RNA-Proben. Die RNA der einzelnen Bakterienstämme unterscheidet sich nicht signifikant in ihrem immunstimulatorischen Potenzial. Auch in plasmazytoiden dendritischen Zellen (Abbildung 17) zeigen sich keine signifikanten, reproduzierbaren Unterschiede der Wirkung m2A-haltiger oder m2A-freier RNA. Bakterielle RNA wird in diesen Zellen laut Eberle et al. (2009) maßgeblich durch Toll-like-Rezeptor 7 erkannt. Hätte die Nukleosidmodifikation m2A eine die RNA-Erkennung durch TLR7 stark verändernde Wirkung, so hätte sich dies in pDCs vermutlich gezeigt.

In unseren Ergebnissen scheint sich m2A nicht auf die Erkennung der RNA auszuwirken. Weder verändert es die IL-6-Sekretion via *Toll-like*-Rezeptoren noch die IL-1 β -Produktion durch das NLRP3-Inflammasom. Es gilt jedoch zu klären, ob der Knockout der Methyltransferasen die *E. coli* Bakterien tatsächlich an jeglicher Produktion von 2-Methyladenosin hindert, wie von Kowalak et al. (1995) und Toh et al. (2008) beschrieben.

Möglicherweise müsste, um einen Effekt von m2A auf die RNA-Erkennung zu identifizieren, ein noch genauerer Blick auf die einzelnen Subspezies geworfen werden. Die Arbeitsgruppe um Sander et al. zeigte 2011, dass die mRNA, obwohl sie nur 1 % des Gesamtvolumens der RNA ausmacht, einen Großteil des stimulatorischen Potenzials innehat. In Bakterien weist mRNA nach bisherigem Wissensstand allerdings keine Nukleosid-Modifikationen auf (Kariko et al. 2005). Anders verhält es sich mit der rRNA. Sie bildet den größten Teil der bakteriellen RNA und enthält 2-Methyladenosin (Toh et al. 2008). Eventuell müsste man also gezielt die rRNA isolieren, um den Effekt der mRNA auszuschließen. Die *E. coli* tRNA, welche ebenfalls m2A enthält, wirkt -wie oben erwähnt- laut Jockel et al. (2012) aufgrund einer einzelnen Nukleosid-Modifikation antagonistisch auf TLR7. Diese Eigenschaft beschränkt sich allerdings auf *E. coli* Bakterien. Andere bakterielle tRNAs wirken immunstimulatorisch. Es wäre daher interessant, in zukünftigen Versuchen den Einfluss von m2A auch in anderen Bakterienarten zu untersuchen.

5 Ausblick und offene Fragen

In dieser Arbeit konnten bei der Aufklärung des Mechanismus der Erkennung von 2-Methyladenosin weitere Fortschritte erreicht werden. Dennoch bestehen weiterhin offene Fragen. Die Ergebnisse oben stehender Experimente deuten darauf hin, dass Adenosin-Rezeptoren und Enzyme des Adenosin-Rezeptor-A_{2A} Signalwegs an der Erkennung von 2-Methyladenosin beteiligt sind. In zukünftigen Versuchen werden wir diesen Hinweisen zur Erkennung des Moleküls nachgehen und versuchen die Verknüpfung von 2-Methyladenosin und Adenosinrezeptoren zu verifizieren. Hierzu sollen mögliche unspezifische Effekte von pharmakologischen Inhibitoren und Agonisten durch Verwendung von gendefizienten Mäusen ausgeschlossen werden. Zusätzlich sollen möglicherweise involvierte unabhängige Rezeptoren identifiziert werden.

Weiterhin gilt es, den Zelltyp, der für die Interleukin-Sekretion nach Stimulation mit m2A verantwortlich ist, zu identifizieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass 2-Methyladenosin einen sehr starken Effekt in Knochenmarkzellen hervorruft. Interleukin-Ausschüttung zeigt sich auch in isolierten Knochenmark-Makrophagen, jedoch nur in abgeschwächter Form. Es ist daher noch ungeklärt, ob neben den Makrophagen noch andere Zelltypen auf m2A reagieren oder ob für maximale Interleukin-Sekretion eine Kokultivierung unterschiedlicher Zelltypen, wie sie bei Knochenmarkzellen vorliegt, notwendig ist.

Schlussendlich scheint die Wirkung von m2A durch Inflammasome vermittelt zu werden. Eine Beteiligung des Inflammasom-Adaptermoleküls ASC konnte in Versuchen dieser Arbeit nachweisen werden. Unser Ziel ist es, das involvierte Inflammasom in künftigen Versuchen zu identifizieren. Dies ist insbesondere interessant, da durch Ouyang et al. bereits ein Zusammenhang zwischen den Adenosin-Rezeptoren und der Aktivierung von NLRP3 gezeigt werden konnte, in unseren Versuchen IL-1 β jedoch unabhängig von diesem Proteinkomplex produziert wurde.

Betrachtet man über die molekularen Mechanismen hinaus die Erkennung von Bakterien insgesamt, so stellt sich die Frage, ob 2-Methyladenosin einen Einfluss auf die Pathogenität von Bakterien bzw. auf die Antwort des Immunsystems hat. Möglicherweise führt es durch sein immunstimulatorisches Potential auch zu einer schnelleren Beseitigung von Bakterien, die in Kontakt mit dem Immunsystem kommen. In oben gezeigten Versuchen konnten wir zunächst

keine Unterschiede bei Stimulation mit m2A-produzierenden oder nicht-produzierenden Bakterien bzw. deren RNA feststellen. Zukünftig ist eine Anpassung des Versuchsaufbaus geplant um bakterielle Infektionen besser darstellen zu können und so zu ergründen, ob es sich bei 2-Methyladenosin um ein bislang unbekanntes *Pathogen-associated molecular pattern* handelt.

6 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem erkennt potenzielle Krankheitserreger anhand körperfremder, konservierter, molekularer Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*). Durch diese Erregerbestandteile werden Multienzymkomplexe wie die Inflammasome aktiviert. Sie führen zur Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β und initiieren somit die Immunantwort. Das Nukleosid Adenosin wirkt regulierend auf diese Immunantworten. Beispielsweise beim Zelltod freigesetzt kann es über die vier Adenosin-Rezeptor-Subtypen A₁, A₃, A_{2A} und A_{2B} sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkung entfalten. Adenosin existiert in zahlreichen modifizierten Varianten. Diese kommen, wie zum Beispiel die Modifikation N6-Methyladenosin, ubiquitär vor oder sind spezifisch für Eu- bzw. Prokaryoten.

In dieser Arbeit wird untersucht, ob die rein bakterielle Adenosin-Modifikation 2-Methyladenosin dem Immunsystem zur Erkennung von Bakterien dient und es sich damit um eine neue Art *pathogen-associated molecular pattern* handelt. Weiterhin soll der molekulare Mechanismus der Erkennung aufgeklärt werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmalig zeigen, dass Stimulation muriner Knochenmarkszellen mit 2-Methyladenosin zur Sekretion großer Mengen Interleukin-1 β führt. Die Behandlung der Zellen mit Adenosin oder N6-Methyladenosin ruft hingegen keine Reaktion hervor. Einsetzen eines Inhibitors des Adenosin-Rezeptor-Subtyps A_{2A} verringerte die Reaktion der Zellen auf 2-Methyladenosin. Wir betrachten dies als Hinweis darauf, dass die Wirkung von 2-Methyladenosin durch Adenosin-Rezeptoren vermittelt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass neben dem Adenosin-Rezeptor A_{2A}, auch nachgeschaltete Enzyme des Signalwegs an der durch 2-Methyladenosin hervorgerufenen Zytokin-Sekretion beteiligt sind. So fanden wir Hinweise dafür, dass die Adenylylcyclase als Teil des Adenosin-Rezeptor-Signalwegs bei Stimulation mit 2-Methyladenosin aktiviert wird. Weiterhin konnte mit Hilfe des Inhibitors H89-Hydrochlorid gezeigt werden, dass auch die Aktivität der Proteinkinase A wichtig für die Ausschüttung von Zytokinen nach Stimulation mit 2-Methyladenosin sein könnte. Vor allem aber konnte mit Hilfe gendefizienter Mäuse gezeigt werden, dass das Inflammasom-Adaptermolekül *apoptosis-associated speck-like protein (ASC)* unabdingbar für die Zytokin-Produktion nach Stimulation mit 2-Methyladenosin ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass an der durch 2-Methyladenosin bedingten Interleukin-1 β -Sekretion nicht nur – wie oben beschrieben – möglicherweise Adenosin-Rezeptoren beteiligt sind, sondern dass schlussendlich die Aktivierung eines Inflammasoms notwendig für die

Ausschüttung der Zytokine ist. Mit Hilfe der Experimente dieser Arbeit fanden wir somit erstmals Anhaltspunkte für eine Verbindung des A_{2A} -Adenosin-Rezeptor-Signalwegs mit der Inflammasom-Aktivierung. Dies ist insbesondere interessant, da der Adenosin-Rezeptor A_{2A} bislang eher als anti-inflammatorischer Rezeptor gesehen wurde.

Teil dieser Arbeit ist neben der Charakterisierung des Effekts von 2-Methyladenosin auf Adenosin-Rezeptoren auch die Untersuchung der Bedeutung von 2-Methyladenosin als Bestandteil bakterieller RNA. Anhand von Nukleosid-Modifikationen kann das Immunsystem höher entwickelter Lebewesen zwischen fremden und eigenen Nukleinsäuren unterscheiden. So verhindern beispielsweise eukaryotische Modifikationen die Erkennung von RNA durch *Toll-like*-Rezeptor 7 in Mäusen. 2-Methyladenosin liegt in *E. coli* Bakterien als Teil der t- und rRNA vor. Für die posttranskriptionale Modifikation sind Methyltransferasen verantwortlich. In den Experimenten dieser Arbeit wurden Bakterien, die aufgrund genetischer Modifizierung kein 2-Methyladenosin in ihrer RNA tragen, bezüglich ihrer immunstimulatorischen Wirkung untersucht und mit Wildtyp-Bakterien verglichen. In ersten Versuchen zeigten sich bei Stimulation mit kompletten Bakterien oder isolierter RNA jedoch keine auf 2-Methyladenosin zurückzuführenden Effekte.

Zusammenfassend deuten die Experimente dieser Arbeit darauf hin, dass der bislang als anti-inflammatorisch beschriebene Adenosin-Rezeptor A_{2A} an der Erkennung von 2-Methyladenosin beteiligt ist. Weiterhin konnten wir Hinweise dafür finden, dass er über Inflammasome auch mit der Ausschüttung des pro-inflammatorischen Interleukin-1 β verknüpft ist. Weiterführende Fragestellungen, die auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauen sind, ob das bakterielle 2-Methyladenosin auch in physiologischer Umgebung als *pathogen-associated molecular pattern* fungiert und über welches Inflammasom der A_{2A} -Rezeptor zur Ausschüttung von Interleukin-1 β führt.

7 Abkürzungsverzeichnis

A

A-R	Adenosin-Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AIM2	<i>Absent in melanoma gene 2</i>
ARNO	<i>Arf nucleotide site opener</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD-domain</i>
ASL	<i>Anticodon stem loop</i>
ATP	Adenosintriphosphat

B

BIR	<i>Baculovirus inhibitor of apoptosis domain</i>
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin

C

cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CGS	CGS21680-Hydrochlorid
CPA	N6-Cyclopentyladenosin
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>

D

DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DDA	2'-5'-Didideoxyadenosin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin
dsRNA	Doppelsträngige RNA

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	<i>Effective concentration 50</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

Abkürzungsverzeichnis

ETS-1	<i>E-twenty six</i>
F	
FCS	Fetales Kälberserum
I	
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration 50</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK α	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha</i>
IL	Interleukin
IRAK1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
K	
KO	<i>Knock-out</i>
L	
LPS	Lipopolysaccharide
M	
M	Molar
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
m2A	2-Methyladenosin
m6A	N6-Methyladenosin
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAP-Kinasen	<i>Mitogen-activated protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	Messenger RNA
MRS 1220	<i>N-[9-Chloro-2-(2-furanyl)[1,2,4]-triazolo-[1,5-c]quinazolin-5-yl]benzene acetamide</i>
MRS 1754	<i>N-(4-Cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-Dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]-acetamide</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
N	
NACHT	NAIP, CIITA, HET-E, TP-1
NAD	NACHT-assoziierte Domäne
NBD	<i>Nucleotide-binding domain</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NOD	<i>Nucleotide oligomerization domain</i>

NOMID	<i>Neonatal-onset multy system inflammatory disease</i>
O	
OD600	Optische Dichte bei 600nm
P	
P _{1/2} -Rezeptor	Purinerger Rezeptor der Gruppe 1/2
P2X7	P2X Purinrezeptor 7
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen
PGN	Peptidoglykane
PKC	Proteinkinase C
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PYD	<i>Pyrin domain</i>
R	
R848	Resiquimod
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RLH	<i>Rig-I-like helicases</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Sauerstoffradikale
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ribosomale RNA
S	
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
ssRNA	Einzelsträngige RNA
T	
TAG	<i>TRAM-adaptor with GOLD-domain</i>
TE	Tris-EDTA
TH-Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll-Interleukin-1-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domaine containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRAX	<i>Translin-associated protein X</i>
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor inducing interferon beta</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA

Abkürzungsverzeichnis

U

UDP

Uridindiphosphat

UTP

Uridintriphosphat

W

WT

Wildtyp

Z

ZM 241,385

4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol

8 Abbildungsverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abbildung 1: Überblick über die Signalwege der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren.	6
Abbildung 2: Überblick über Aktivierung und Signalwege der Inflammasome am Beispiel des NLRP3-Inflammasoms.	11
Abbildung 3: Überblick über die Signalwege der Adenosin-Rezeptoren.....	17
Abbildung 4: Stimulation mit 2-Methyladenosin führt zur Sekretion von Interleukin-1 β	22
Abbildung 5.: Blockade des Adenosin-Rezeptors A2A vermindert den Effekt von 2-Methyladenosin.	38
Abbildung 6: Stimulation mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten bewirkt in hohen Konzentrationen Interleukin-1 β Sekretion.	39
Abbildung 7: Überblick über pharmakologische Angriffsmöglichkeiten an den Signalwegen der Adenosin-Rezeptoren.....	40
Abbildung 8: Stimulation der Adenylylcyclase führt zur Sekretion von Interleukin-1 β	42
Abbildung 9: Applikation eines Adenylylcyclase-Inhibitors hat keinen Effekt auf die Wirkung von 2-Methyladenosin.	44
Abbildung 10: 2-Methyladenosin erhöht den intrazellulären cAMP-Spiegel.....	46
Abbildung 11: Inhibition der Proteinkinase A vermindert den Effekt von 2-Methyladenosin.	48
Abbildung 12: Die durch 2-Methyladenosin ausgelöste Interleukin-1 β Sekretion ist abhängig vom Adapterprotein ASC.	50
Abbildung 13: Zusammenfassung unserer Erkenntnisse zur Erkennung von 2-Methyladenosin. 51	
Abbildung 14: Wachstumskurven der <i>E. coli</i> Bakterien.....	54
Abbildung 15: Stimulation von Makrophagen mit gendefizienten <i>E. coli</i> Bakterien.....	56
Abbildung 16: Stimulation von Makrophagen mit RNA gendefizienter <i>E. coli</i> Bakterien.....	59
Abbildung 17: Stimulation plasmazytoider dendritischer Zellen mit der RNA gendefizienter <i>E. coli</i> Bakterien.....	60

8.2 Tabellen

Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten Liganden der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren.....	4
Tabelle 2: Überblick über die wichtigsten Liganden der murinen Inflammasome.	8
Tabelle 3: Übersicht über die Agonisten der Adenosin-Rezeptoren (entnommen aus Jacobson et al. (2006)).	67

9 Literaturverzeichnis

- Abdullah Z, Schlee M, Roth S, Mraheil M A, Barchet W, Bottcher J, Hain T, Geiger S, Hayakawa Y, Fritz J H, Civril F, Hopfner K P, Kurts C, Ruland J, Hartmann G, Chakraborty T and Knolle P A. RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. *EMBO J* 2012; 31:4153-64
- Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R and Flavell R A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-8
- Almeida M Q, Tsang K M, Cheadle C, Watkins T, Grivel J C, Nesterova M, Goldbach-Mansky R and Stratakis C A. Protein kinase A regulates caspase-1 via Ets-1 in bone stromal cell-derived lesions: a link between cyclic AMP and pro-inflammatory pathways in osteoblast progenitors. *Hum Mol Genet* 2011; 20:165-75
- Amiel E, Nicholson-Dykstra S, Walters J J, Higgs H and Berwin B. Scavenger receptor-A functions in phagocytosis of *E. coli* by bone marrow dendritic cells. *Exp Cell Res* 2007; 313:1438-48
- Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi M R, Chimini G and Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 1999; 10:1463-75
- Arlehamn C S, Petrilli V, Gross O, Tschopp J and Evans T J. The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *J Biol Chem* 2010; 285:10508-18
- Barrow E W, Westbrook L, Bansal N, Suling W J, Maddry J A, Parker W B and Barrow W W. Antimycobacterial activity of 2-methyl-adenosine. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:801-8
- Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T and Hornung V. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:765-83
- Benitez-Paez A, Villarroya M and Armengod M E. The *Escherichia coli* RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy. *RNA* 2012; 18:1783-95
- Beutler B and Rietschel E T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:169-76
- Bhushan S, Hossain H, Lu Y, Geisler A, Tchatalbachev S, Mikulski Z, Schuler G, Klug J, Pilatz A, Wagenlehner F, Chakraborty T and Meinhardt A. Uropathogenic *E. coli* induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: implications for testicular immune privilege. *PLoS One* 2011; 6:e28452
- Black R, Kronheim S, Sleath P, Greenstreet T, Virca G D, March C and Kupper T. The proteolytic activation of interleukin-1 beta. *Agents Actions Suppl* 1991; 35:85-9
- Blasius A L and Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010; 32:305-15

- Boeynaems J M, Communi D, Gonzalez N S and Robaye B. Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31:139-49
- Bourne H R, Lichtenstein L M, Melmon K L, Henney C S, Weinstein Y and Shearer G M. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* 1974; 184:19-28
- Boyden E D and Dietrich W F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* 2006; 38:240-4
- Brown G D, Herre J, Williams D L, Willment J A, Marshall A S and Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 2003; 197:1119-24
- Broz P, von Moltke J, Jones J W, Vance R E and Monack D M. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe* 2010; 8:471-83
- Bruckl T, Globisch D, Wagner M, Muller M and Carell T. Parallel isotope-based quantification of modified tRNA nucleosides. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009; 48:7932-4
- Bruey J M, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C, Kress C L, Bailly-Maitre B, Li X, Osterman A, Matsuzawa S, Tersikh A V, Faustin B and Reed J C. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 2007; 129:45-56
- Bshesh K, Zhao B, Spight D, Biaggioni I, Feokistov I, Denenberg A, Wong H R and Shanley T P. The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J Leukoc Biol* 2002; 72:1027-36
- Cantara W A, Bilbille Y, Kim J, Kaiser R, Leszczynska G, Malkiewicz A and Agris P F. Modifications modulate anticodon loop dynamics and codon recognition of E. coli tRNA(Arg1,2). *J Mol Biol* 2012; 416:579-97
- Cantara W A, Crain P F, Rozenski J, McCloskey J A, Harris K A, Zhang X, Vendeix F A, Fabris D and Agris P F. The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:D195-201
- Chavez-Valdez R, Wills-Karp M, Ahlawat R, Cristofalo E A, Nathan A and Gauda E B. Caffeine modulates TNF-alpha production by cord blood monocytes: the role of adenosine receptors. *Pediatr Res* 2009; 65:203-8
- Chen G, Shaw M H, Kim Y G and Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:365-98
- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T and Hidaka H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D-pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1990; 265:5267-72
- Coban C, Ishii K J, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T and Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005; 201:19-25

- Colonna M, Trinchieri G and Liu Y J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5:1219-26
- Davis B K, Wen H and Ting J P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:707-35
- DeYoung K L, Ray M E, Su Y A, Anzick S L, Johnstone R W, Trapani J A, Meltzer P S and Trent J M. Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene* 1997; 15:453-7
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R and Rechavi G. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* 2012; 485:201-6
- Dostert C, Petilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman B T and Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008; 320:674-7
- Drury A N and Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 1929; 68:213-37
- Duewell P, Kono H, Rayner K J, Sirois C M, Vladimer G, Bauernfeind F G, Abela G S, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald K A, Rock K L, Moore K J, Wright S D, Hornung V and Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464:1357-61
- Dunin-Horkawicz S, Czerwoniec A, Gajda M J, Feder M, Grosjean H and Bujnicki J M. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:D145-9
- Eberle F, Sirin M, Binder M and Dalpke A H. Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. *Eur J Immunol* 2009; 39:2537-47
- Faustin B, Lartigue L, Bruey J M, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, Volkmann N, Hanein D, Rouiller I and Reed J C. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* 2007; 25:713-24
- Fink S L, Bergsbaken T and Cookson B T. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:4312-7
- Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti T D, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant E P and Nunez G. Cytosolic flagellin requires IpaF for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 2006; 7:576-82
- Fredholm B B, AP I J, Jacobson K A, Klotz K N and Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001a; 53:527-52

- Fredholm B B, Chern Y, Franco R and Sitkovsky M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol* 2007; 83:263-76
- Fredholm B B, Irenius E, Kull B and Schulte G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 2001b; 61:443-8
- Gabel C A. P2 purinergic receptor modulation of cytokine production. *Purinergic Signal* 2007; 3:27-38
- Gehrig S, Eberle M E, Botschen F, Rimbach K, Eberle F, Eigenbrod T, Kaiser S, Holmes W M, Erdmann V A, Sprinzi M, Bec G, Keith G, Dalpke A H and Helm M. Identification of modifications in microbial, native tRNA that suppress immunostimulatory activity. *J Exp Med* 2012; 209:225-33
- Gilliet M, Cao W and Liu Y J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:594-606
- Girardin S E, Boneca I G, Carneiro L A, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha M K, Labigne A, Zahringer U, Coyle A J, DiStefano P S, Bertin J, Sansonetti P J and Philpott D J. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003a; 300:1584-7
- Girardin S E, Boneca I G, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott D J and Sansonetti P J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003b; 278:8869-72
- Golovina A Y, Dzama M M, Osterman I A, Sergiev P V, Serebryakova M V, Bogdanov A A and Dontsova O A. The last rRNA methyltransferase of *E. coli* revealed: The yhiR gene encodes adenine-N6 methyltransferase specific for modification of A2030 of 23S ribosomal RNA. *RNA* 2012; 18:1725-34
- Guma M, Ronacher L, Liu-Bryan R, Takai S, Karin M and Corr M. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum* 2009; 60:3642-50
- Gurtler C and Bowie A G. Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends Microbiol* 2013; 21:413-20
- Harder J, Franchi L, Munoz-Planillo R, Park J H, Reimer T and Nunez G. Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol* 2009; 183:5823-9
- Hasko G, Linden J, Cronstein B and Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:759-70
- Hasko G, Pacher P, Deitch E A and Vizi E S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol Ther* 2007; 113:264-75

- Hayashi F, Smith K D, Ozinsky A, Hawn T R, Yi E C, Goodlett D R, Eng J K, Akira S, Underhill D M and Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-103
- Hazuda D J, Strickler J, Kueppers F, Simon P L and Young P R. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *J Biol Chem* 1990; 265:6318-22
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H and Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-9
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K and Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K and Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5
- Hidaka H, Hagiwara M and Chijiwa T. Molecular pharmacology of protein kinases. *Neurochem Res* 1990; 15:431-4
- Hidmark A, von Saint Paul A and Dalpke A. Cutting Edge: TLR13 Is a receptor for bacterial RNA. *J Immunol* 2012; 189:2717-21
- Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, Taya C and Taniguchi T. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 2005; 434:1035-40
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey D R, Latz E and Fitzgerald K A. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458:514-8
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K and Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-52
- Ichinohe T, Pang I K and Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 2010; 11:404-10
- Irmiler M, Hertig S, MacDonald H R, Sadoul R, Becherer J D, Proudfoot A, Solari R and Tschopp J. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J Exp Med* 1995; 181:1917-22
- Jacobson K A and Gao Z G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:247-64
- Janeway C A, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13
- Jarosch A. Dissertation: Das immunstimulatorische Potential von methylierten Adenosinen. 2014;

- Jockel S, Nees G, Sommer R, Zhao Y, Cherkasov D, Hori H, Ehm G, Schnare M, Nain M, Kaufmann A and Bauer S. The 2'-O-methylation status of a single guanosine controls transfer RNA-mediated Toll-like receptor 7 activation or inhibition. *J Exp Med* 2012; 209:235-41
- Juhling F, Morl M, Hartmann R K, Sprinzl M, Stadler P F and Putz J. tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 2009; 37:D159-62
- Kanneganti T D, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park J H, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant E P, Akira S and Nunez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006; 440:233-6
- Kariko K, Buckstein M, Ni H and Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005; 23:165-75
- Kawai T and Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009; 21:317-37
- Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11:373-84
- Kawai T and Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; 34:637-50
- Khakh B S, Burnstock G, Kennedy C, King B F, North R A, Seguela P, Voigt M and Humphrey P P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 2001; 53:107-18
- Kingeter L M and Lin X. C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol* 2012; 9:105-12
- Kobe B and Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994; 19:415-21
- Koski G K, Kariko K, Xu S, Weissman D, Cohen P A and Czerniecki B J. Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172:3989-93
- Kowalak J A, Bruenger E and McCloskey J A. Posttranscriptional modification of the central loop of domain V in Escherichia coli 23 S ribosomal RNA. *J Biol Chem* 1995; 270:17758-64
- Kull B, Svenningsson P and Fredholm B B. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol Pharmacol* 2000; 58:771-7
- Kurt-Jones E A, Popova L, Kwinn L, Haynes L M, Jones L P, Tripp R A, Walsh E E, Freeman M W, Golenbock D T, Anderson L J and Finberg R W. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398-401
- Lamkanfi M and Dixit V M. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28:137-61

- Lee G S, Subramanian N, Kim A I, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks D B, Germain R N, Kastner D L and Chae J J. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca(2+) and cAMP. *Nature* 2012; 492:123-27
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J M and Hoffmann J A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996; 86:973-83
- Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J and et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995; 80:401-11
- Li X D and Chen Z J. Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *Elife* 2012; 1:e00102
- Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:775-87
- Lochner A and Moolman J A. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24:261-74
- Long M C, Escuyer V and Parker W B. Identification and characterization of a unique adenosine kinase from Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol* 2003; 185:6548-55
- Loo Y M and Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011; 34:680-92
- Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P, Valdes-Ferrer S I, Olofsson P S, Kalb T, Roth J, Zou Y, Erlandsson-Harris H, Yang H, Ting J P, Wang H, Andersson U, Antoine D J, Chavan S S, Hotamisligil G S and Tracey K J. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 2012; 488:670-4
- Lukashev D, Ohta A, Apasov S, Chen J F and Sitkovsky M. Cutting edge: Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J Immunol* 2004; 173:21-4
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R and Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198:513-20
- Machnicka M A, Milanowska K, Osman Oglou O, Purta E, Kurkowska M, Olchowik A, Januszewski W, Kalinowski S, Dunin-Horkawicz S, Rother K M, Helm M, Bujnicki J M and Grosjean H. MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:D262-7
- Mackenzie A, Wilson H L, Kiss-Toth E, Dower S K, North R A and Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001; 15:825-35
- Maelfait J, Vercammen E, Janssens S, Schotte P, Haegman M, Magez S and Beyaert R. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *J Exp Med* 2008; 205:1967-73
- Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, Teti G and Beninati C. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10:587-94

- Mariathasan S, Weiss D S, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee W P, Weinrauch Y, Monack D M and Dixit V M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440:228-32
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A and Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440:237-41
- Medzhitov R and Janeway C. Innate immunity. *New Engl J Med* 2000; 343:338-344
- Mizutani H, Schechter N, Lazarus G, Black R A and Kupper T S. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med* 1991; 174:821-5
- Murphree L J, Sullivan G W, Marshall M A and Linden J. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J* 2005; 391:575-80
- Muruve D A, Petrilli V, Zaiss A K, White L R, Clark S A, Ross P J, Parks R J and Tschopp J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 2008; 452:103-7
- Ohta A and Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414:916-20
- Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, Bathke B, Lauterbach H, Suter M, Dreher S, Koedel U, Akira S, Kawai T, Buer J, Wagner H, Bauer S, Hochrein H and Kirschning C J. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* 2012; 337:1111-5
- Ouyang X, Ghani A, Malik A, Wilder T, Colegio O R, Flavell R A, Cronstein B N and Mehal W Z. Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A(2)A receptor and the HIF-1alpha pathway. *Nat Commun* 2013; 4:2909
- Ozinsky A, Underhill D M, Fontenot J D, Hajjar A M, Smith K D, Wilson C B, Schroeder L and Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-71
- Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter P J, Mrowietz U, Dichmann S and Norgauer J. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J* 2001; 15:1963-70
- Park Y G, Kang S K, Noh S H, Park K K, Chang Y C, Lee Y C and Kim C H. PGE2 induces IL-1beta gene expression in mouse osteoblasts through a cAMP-PKA signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2004; 4:779-89
- Parker W B, Barrow E W, Allan P W, Shaddix S C, Long M C, Barrow W W, Bansal N and Maddy J A. Metabolism of 2-methyladenosine in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84:327-36
- Peiser L, Mukhopadhyay S and Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:123-8

- Perregaux D and Gabel C A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 1994; 269:15195-203
- Piccioli D, Sammiceli C, Tavarini S, Nuti S, Frigimelica E, Manetti A G, Nuccitelli A, Aprea S, Valentini S, Borgogni E, Wack A and Valiante N M. Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation. *Blood* 2009; 113:4232-9
- Pietras E M, Saha S K and Cheng G. The interferon response to bacterial and viral infections. *J Endotoxin Res* 2006; 12:246-50
- 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 and Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-8
- Poyet J L, Srinivasula S M, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T and Alnemri E S. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 2001; 276:28309-13
- Reizis B, Colonna M, Trinchieri G, Barrat F and Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nat Rev Immunol* 2011; 11:558-65
- Rock F L, Hardiman G, Timans J C, Kastelein R A and Bazan J F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:588-93
- Rozenski J, Crain P F and McCloskey J A. The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:196-7
- Ryzhov S, Goldstein A E, Biaggioni I and Feoktistov I. Cross-talk between G(s)- and G(q)-coupled pathways in regulation of interleukin-4 by A(2B) adenosine receptors in human mast cells. *Mol Pharmacol* 2006; 70:727-35
- Sander L E, Davis M J, Boekschoten M V, Amsen D, Dascher C C, Ryffel B, Swanson J A, Muller M and Blander J M. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* 2011; 474:385-9
- Saneyoshi M, Oashi Z, Harada F and Nishimura S. Isolation and characterization of 2-methyladenosine from Escherichia coli tRNA Glu 2 , tRNA Asp 1 , tRNA His 1 and tRNA Arg. *Biochim Biophys Acta* 1972; 262:1-10
- Schnurr M, Toy T, Shin A, Hartmann G, Rothenfusser S, Soellner J, Davis I D, Cebon J and Maraskovsky E. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2004; 103:1391-7
- Schulte G and Fredholm B B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 2003; 15:813-27
- Sharma S and Fitzgerald K A. Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog* 2011; 7:e1001310
- Srinivasula S M, Poyet J L, Razmara M, Datta P, Zhang Z and Alnemri E S. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 2002; 277:21119-22

- Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y and Colonna M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* 2010; 33:955-66
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K and Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-51
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt P F, Morr M, Radolf J D, Zychlinsky A, Takeda K and Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13:933-40
- Ting J P, Lovering R C, Alnemri E S, Bertin J, Boss J M, Davis B K, Flavell R A, Girardin S E, Godzik A, Harton J A, Hoffman H M, Hugot J P, Inohara N, Mackenzie A, Maltais L J, Nunez G, Ogura Y, Otten L A, Philpott D, Reed J C, Reith W, Schreiber S, Steimle V and Ward P A. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 2008; 28:285-7
- Tkaczuk K L, Dunin-Horkawicz S, Purta E and Bujnicki J M. Structural and evolutionary bioinformatics of the SPOUT superfamily of methyltransferases. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:73
- Toh S M, Xiong L, Bae T and Mankin A S. The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA. *RNA* 2008; 14:98-106
- Valera S, Hussy N, Evans R J, Adami N, North R A, Surprenant A and Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994; 371:516-9
- van Calker D, Muller M and Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 1979; 33:999-1005
- Verzija D and Ijzerman A P. Functional selectivity of adenosine receptor ligands. *Purinergic Signal* 2011; 7:171-92
- Vladimer G I, Weng D, Paquette S W, Vanaja S K, Rathinam V A, Aune M H, Conlon J E, Burbage J J, Proulx M K, Liu Q, Reed G, Meccas J C, Iwakura Y, Bertin J, Goguen J D, Fitzgerald K A and Lien E. The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity* 2012; 37:96-107
- von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006; 110:415-32
- Walev I, Reske K, Palmer M, Valeva A and Bhakdi S. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J* 1995; 14:1607-14
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen J F, Bannenberg G L, Serhan C N, Hayden M S, Hieny S, Sutterwala F S, Flavell R A, Ghosh S and Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308:1626-9
- Zhang D, Zhang G, Hayden M S, Greenblatt M B, Bussey C, Flavell R A and Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303:1522-6

Zhao X and Yu Y T. Detection and quantitation of RNA base modifications. *RNA* 2004; 10:996-1002

10 Appendix

10.1 Publikationen und Präsentationen

10.1.1 Mündliche Präsentationen

Schleberger R.

Der Einfluss von Adenosinmodifikationen auf die Aktivierung inflammatorischer Kaskaden durch Adenosin- und RNA-Rezeptoren.

Statusseminar, Förderprogramm für Forschung und Lehre, Herrsching, 2012

10.2 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. Carole Bourquin und Dr. Christian Hotz für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung – auch über Landesgrenzen hinweg. Ich bedanke mich besonders bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres für die Möglichkeit, in seiner Abteilung für Klinische Pharmakologie an meiner Promotion arbeiten zu dürfen. Von seiner Unterstützung hat sowohl meine medizinisch-wissenschaftliche als auch persönliche Entwicklung sehr profitiert. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Mitdoktoranden für deren tatkräftige Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Schleberger, Ruben

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
**Charakterisierung der immunmodulatorischen Rezeptoren für methylierte Adenosine
in Nukleosiden und RNA**

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.

Hamburg, 28.02.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand