

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Der Einfluss von Koffein auf die Interferonfreisetzung durch virale Stimuli



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolf Rainer Hohlbein
aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Rothenfuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Andreas Schmidt

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2019

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Der Einfluss von Koffein auf die Interferonfreisetzung durch virale Stimuli“

selbstständig verfasst, mich außer den angegebenen Hilfsmitteln keiner weiteren 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.

München, den 17.10.2019

.....
Wolf Rainer Hohlbein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Koffein	4
1.1.1	Generelle Wirkmechanismen von Koffein	4
1.1.2	Verwendung von Koffein als Pharmakon	6
1.1.3	Koffein und seine Wirkung auf das Immunsystem	6
1.2	Das Immunsystem	7
1.3	Das angeborene Immunsystem	8
1.3.1	Mustererkennungsrezeptoren	8
	Toll- <i>like</i> Rezeptoren	9
	NOD-like Rezeptoren	9
	RIG-I- <i>like</i> Rezeptoren (RLR)	10
1.3.2	Zytokine ¹²	
1.4	Ziele dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Technische Geräte	15
2.1.2	Reagenzien und Kits	15
2.1.3	Verbrauchsmaterial	17
2.1.4	Plasmide	17
2.1.5	Primer	17
2.1.6	Software	18
2.1.7	Virusstämme	18
2.1.8	Zelllinien	19
2.1.9	Medien	19

2.2	Methoden	19
2.2.1	Zellkultur	19
	Wachstumsbedingungen	19
	Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	20
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	20
	Transformation	20
	DNA-Präparation	21
	Synthese von pppRNA	21
	RNA-Isolation	21
	Reverse Transkription von RNA	21
	Quantitative Real-Time-PCR	21
2.2.3	Lipotransfektion	22
2.2.4	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	22
2.2.5	Luciferase Assay	22
2.2.6	Plaque-Assay	23
2.2.7	Statistische Analyse	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Effekt von Koffein auf PBMCs	24
3.2	Einfluss von Koffein auf das angeborene Immunsystem in 1205LU-Zellen	29
3.3	Hemmung der IP-10 Freisetzung durch Koffein nach Überexpression des RIG-I Signalweges	29
3.4	Der Einfluss von Koffein auf Virusreplikation	30
4	Diskussion	33
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	33
4.2	Koffein und seine Wirkung auf inflammatorische Zytokine und Virusreplikation in der Literatur	33

4.2.1	Wirkung von Koffein auf inflammatorische Zytokine	33
4.2.2	Wirkung von Koffein auf die Virusreplikation	34
4.3	Diskussion der eigenen Ergebnisse	34
4.3.1	Der Einfluss von Koffein auf die Freisetzung von Zytokinen	34
4.3.2	Hemmung der Aktivierung des RIG-I-Signalwegs durch Koffein	36
4.3.3	Koffein hemmt die Produktion von Viren	36
5	Zusammenfassung	38
6	Referenzen	40
7	Abkürzungen	44
8	Danksagung	47

1 Einleitung

Koffein ist die meist konsumierte pharmakologische Substanz weltweit. Der wahrscheinlich wichtigste Grund hierfür dürfte der antreibende und aktivierende zentralnervöse Effekt sein. Allerdings besitzt Koffein neben seiner Wirkung auf die Psyche auch eine Reihe anderer Effekte. Metaanalysen von Beobachtungsstudien und Interventionsstudien zeigen, dass Kaffee- und Koffein-Konsum das Risiko reduzieren, Brust-, Kolon-, Endometrium- und Prostata-Tumoren, Diabetes Typ II oder Parkinson zu bekommen ¹. Auch konnte gezeigt werden, dass Koffein die Entstehung von Hautkrebs vermindert ^{2,3}. Diese auf den ersten Blick sehr unterschiedlichen Erkrankungen teilen sich als pathophysiologisch wichtigen gemeinsamen Faktor eine unterschwellig vorliegende, chronische Entzündungsreaktion. Es wird daher in der Literatur vermutet, dass Koffein seinen protektiven Effekt über die Modulation dieser Entzündungsvorgänge bewirkt ⁴.

In Anbetracht dieser epidemiologisch relevanten Effekte, ist jedoch bisher erstaunlich wenig über die immunmodulatorischen Mechanismen von Koffein bekannt ⁵. Hier setzt die vorliegende Arbeit an und möchte einen Beitrag leisten.

1.1 Koffein

Das Alkaloid Koffein gehört der Gruppe der Xanthine und damit den natürlich vorkommenden Purinen an. Neben der Kaffeepflanze und dem Teestrauch enthalten auch viele andere Pflanzen wie Guarana, Mate und die Kolanuss große Mengen Koffein. In diesen Pflanzen dient Koffein als Insektizid.

1.1.1 Generelle Wirkmechanismen von Koffein

Der häufigste Grund für den Konsum von Koffein ist sicherlich seine stimulierende Wirkung. Koffein ist ein kompetitiver Antagonist an Adenosinrezeptoren. Adenosin hemmt die Aktivität von Nervenzellen, um sie vor einer Überlastung zu schützen. Koffein konkurriert mit Adenosin um diese Rezeptoren, jedoch ohne diese zu aktivieren. Des Weiteren hemmt Koffein Phosphodiesterasen, was zu einer intrazellulären Erhöhung von zyklischem AMP (cAMP) und einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Des Weiteren können Xanthine ryanodinsensitive Calciumkanäle für Calcium sensibilisieren und nicht zuletzt sind sie Antagonisten an GABA_A-Rezeptoren ⁶ (Abbildung 1-1).

In Konzentrationen, die durch den normalen täglichen Konsum von Kaffee und koffeinhaltigen Getränken erreicht werden, wirkt Koffein hauptsächlich als Antagonist der

Adenosinrezeptoren. Adenosinrezeptoren spielen auch im Bereich des Immunsystems eine wichtige Rolle sowohl in der Aktivierung, wie auch Inhibition einer Immunantwort. So steigern die Adenosinrezeptoren A_1 und A_2 die Chemotaxis ^{7,8}, wohingegen der Rezeptor A_3 die Chemotaxis hemmt ^{9,10}. Auch konnte gezeigt werden, dass Mastzellen bei Asthmatikern über den A_2B -Rezeptor aktiviert werden können ⁵, nach Inhalation von Adenosin wurden in der Bronchioalveolarflüssigkeit von Asthmapatienten vermehrt Histamin, Prostaglandin 2D und Tryptase gemessen ¹¹. Als Antagonist dieser Adenosinrezeptoren ist für Koffein daher eine Vielzahl an Wirkungen auf das Immunsystem denkbar.

Weitere Ziele von Koffein sind die Phosphatidylinositol-3-Kinasen *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) und *Ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) ¹². ATM und ATR sind wichtige Bestandteile der Zellzyklusregulation. ATM registriert DNA-Doppelstrangbrüche, initiiert die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur und leitet bei schweren Schäden den Zellzyklusarrest und Apoptose ein. ATR hingegen registriert Einzelstrang-DNA als Zeichen einer fehlerhaften Replikation und führt ebenfalls zum Zellzyklusarrest ¹². Eine Inhibition von ATM und ATR durch Koffein führt trotz vorhandener DNA-Schäden zu einem Fortschreiten des Zellzyklus und einer darauffolgenden Apoptose aufgrund von DNA-Schäden ^{13,3}. Auch konnte festgestellt werden, dass Koffein über diesen Mechanismus als Radiosensitizer wirkt, da Strahlung zu DNA-Strangbrüchen führt ³. Dieser Mechanismus erklärt den protektiven Effekt von Koffein gegenüber dem Basalzellkarzinom ^{2,3}.

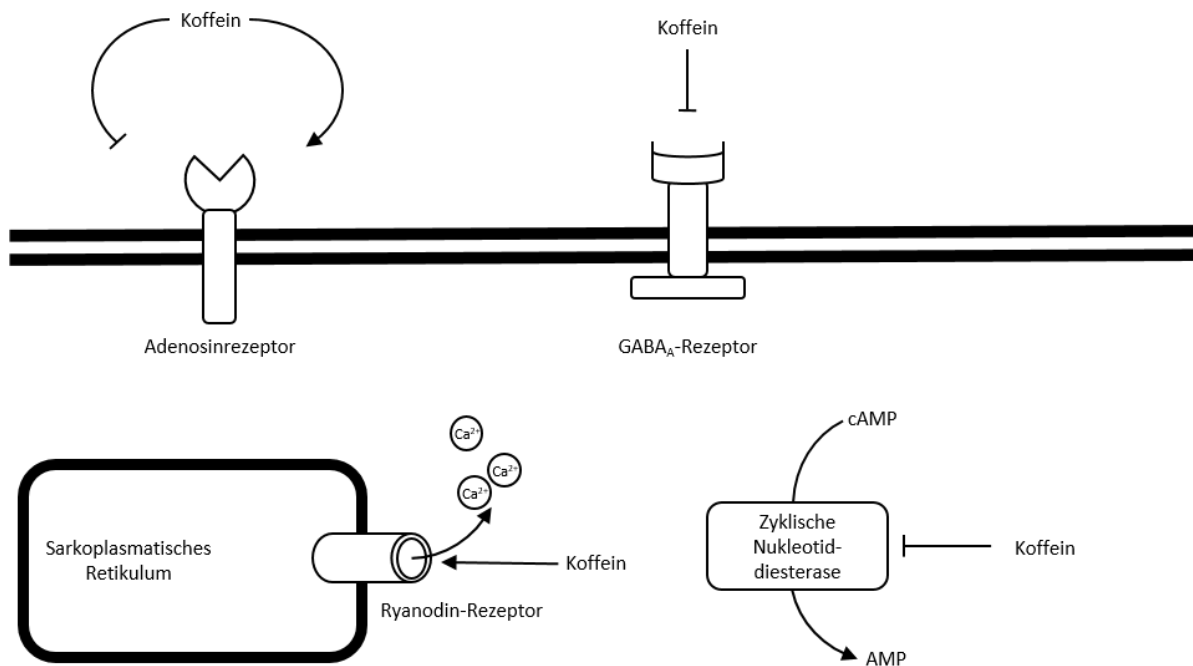


Abbildung 1-1 Verschiedene Angriffsorte von Koffein. Koffein agiert an Adenosinrezeptoren sowohl als Agonist, als auch als Antagonist, die Wirkung ist abhängig von Rezeptorsub- und Zelltyp. An GABA_A-Rezeptoren wirkt Koffein als Kanalblocker. Zyklische Nucleotiddiesterasen werden durch Koffein gehemmt, wodurch die cAMP/cGMP-Level in der Zelle erhöht werden. Darüber hinaus führt Koffein zu Öffnung von ryanodinsensitiven Calciumkanälen des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch es zu einem intrazellulären Calciumanstieg kommt ⁶.

1.1.2 Verwendung von Koffein als Pharmakon

Koffein wird medizinisch als analgetisches Adjuvans verwendet. Ein Adjuvans besitzt selbst keinerlei analgetische Wirkung, verstärkt aber die Wirkung eines Analgetikums. Bereits 1984 konnte gezeigt werden, dass Koffein sowohl die Wirkung der Nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) Acetylsalicylsäure und Ibuprofen, als auch von Paracetamol verstärkt ¹⁴. Die co-analgetische Wirkung von Koffein wird der Interaktion mit den Adenosinrezeptoren A₁, A_{2A} und A_{2B} zugeschrieben ¹⁵.

Eine weitere Anwendung findet Koffein in der Behandlung der Apnoe von frühgeborenen Kindern. Die stimulierende Wirkung von Koffein wird auf die antagonistische Wirkung an Adenosinrezeptoren im Atemzentrum zurückgeführt ⁶.

1.1.3 Koffein und seine Wirkung auf das Immunsystem

In vielen Veröffentlichungen wurden bereits die Wirkungen von Koffein auf das Immunsystem *in vivo* und *in vitro* untersucht. So wurde in LPS-stimuliertem Vollblut eine reduzierte TNF-Freisetzung in Anwesenheit von Koffein beobachtet ¹⁶. Auch konnte gezeigt werden, dass die

Freisetzung von IL-2 und IL-4 von murinen Th1 bzw. Th2 Klonen, sowie von IFN- γ aus Vollblutproben durch Koffein reduziert wird^{5,17}. In PBMCs konnte eine Koffein-induzierte Inhibierung der Lymphozytenproliferation gezeigt werden¹⁷.

In der Literatur wird angegeben, dass Koffein Phosphodiesterasen (PDEs) erst ab Konzentrationen hemmt, die 20x höher sind, als die A1 und A2A-Rezeptoren hemmenden Konzentrationen^{5 18}. Da Adenosin jedoch anti-inflammatorisch wirkt, wäre dann davon auszugehen, dass Koffein als Antagonist inflammatorisch wirkt. Es wurden jedoch bisher sowohl pro- wie auch antiinflammatorische Effekte beschrieben^{5 19}. So konnte gezeigt werden, dass Koffein schon in geringen Dosen zu einer Erhöhung von cAMP in LPS-stimulierten humanen Monozyten führt¹⁶. Die Aktivierung des PKA-Signalwegs hemmt die Freisetzung von TNF und fördert die Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10²⁰.

Der genaue Wirkmechanismus von Koffein auf die Immunantwort ist bisher nicht aufgeklärt. Denkbar wären, neben dem schon beschriebenen Einfluss auf das zelluläre cAMP-Level, auch Interaktionen mit dem Adenosinrezeptor A₃.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem wird schematisch in einen unspezifischen bzw. angeborenen und einen spezifischen, erworbenen Teil untergliedert. Während das erworbene Immunsystem, erst verzögert nach klonaler Expansion entsprechender spezifischer Lymphozyten in eine Infektion eingreift und in der Lage ist, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, bildet das angeborene Immunsystem eine wesentlich frühere Verteidigungslinie, die nicht nur durch spezialisierte Immunzellen vermittelt wird, sondern durch nahezu jede Körperzelle gewährleistet wird. Ebenfalls dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden die neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen, die Pathogene über Mustererkennungsrezeptoren erkennen können und über Effektormechanismen verfügen diese dann unschädlich zu machen. Dendritische Zellen bilden eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und erworbenen Teil des Immunsystems, indem sie Antigene aufnehmen und der spezifischen Immunität präsentieren²¹. Nahezu jede Körperzelle besitzt spezifische Rezeptoren sogenannte Mustererkennungsrezeptoren auf ihrer Oberfläche bzw. in ihrem Zytoplasma, um Pathogene an Hand sogenannter PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) zu erkennen und dann geeignete Gegenmaßnahmen einzuleiten²¹. Im Rahmen einer Virusinfektion beinhaltet dies die Aktivierung eines Genprogramms, das die Replikation des Virus in der infizierten Zelle erschwert. Des Weiteren werden Interferone und Zytokine freigesetzt, die umliegende Zellen warnen und so in einen Alarmzustand versetzen. Außerdem

werden von Interferonen anderen Immunzellen aktiviert und angezogen, die infizierte Zellen abtöten und Pathogene inaktivieren²².

1.3 Das angeborene Immunsystem

Wenn ein Pathogen die Barrieren eines Organismus wie Haut oder Schleimhaut überwunden hat, bedarf es zur Abwehr und Schadensbegrenzung einer Reaktion des Organismus. Der evolutionsbiologisch ältere Teil des Immunsystems, das angeborene Immunsystem, spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

Ein wichtiges Funktionsprinzip des angeborenen Immunsystems sind die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), die von den *pattern recognition receptors* (PRRs)²³ erkannt werden. Charles Janeway postulierte dieses Konzept schon lange vor der Entdeckung der PRRs²⁴. PAMPs sind konservierte Strukturen, die ein Pathogen, ob Virus, Bakterium, Pilz oder Protozoe besitzt, aber im gesunden Wirtsorganismus nicht vorkommen. Diese Rezeptoren sind oftmals nicht spezifisch für Zellen des Immunsystems, sondern kommen auch in anderen somatischen Zellen vor.

1.3.1 Mustererkennungsrezeptoren

In die Gruppe der PRRs fallen eine Vielzahl verschiedener Proteine. Diese werden in verschiedene Familien eingeteilt. Wichtige Gruppen sind hier die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), *NOD-like* Rezeptoren (NLRs) oder die *RIG-I like* Rezeptoren (RLRs).

Die einzelnen Mitglieder der jeweiligen Gruppen erkennen mitunter sehr verschiedene PAMPs, von viralen oder bakteriellen Nukleinsäuren, über bakterielle Zellwandbestandteile, bis hin zu bakteriellem Flagellin. Auch die Lokalisation der verschiedenen PRRs ist unterschiedlich: so kommen TLRs an der Zelloberfläche und in Endo-, bzw. Endolysosomen vor. Eine weitere Gruppe von PRRs ist die Gruppe der *RIG-I-like* Rezeptoren (RLRs). Diese Gruppe dient der Erkennung von viraler RNA und befindet sich im Zytoplasma von Zellen. Die wichtigsten Vertreter werden im folgenden Teil dargestellt.

Toll-like Rezeptoren

Eine große und gut untersuchte Gruppe sind die TLRs. TLRs sind eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Gruppe von Proteinen²³. Verwandte Rezeptoren wurden zuerst in der Fliege entdeckt²¹. Bisher sind 10 verschiedene TLR beim Menschen bekannt²⁵.

TLRs erkennen neben bakteriellen und viralen PAMPs auch Strukturen, die zu Pilzen oder Protozoen gehören. TLR1, 2, 4, 5, 6, 7 und 9 erkennen hauptsächlich bakterielle PAMPs²⁵. TLR4 erkennt zusammen mit CD14, MD2 und LBP Lipopolysaccharid (LPS), welches ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien ist. Gram-positive Bakterien enthalten Peptidoglycan, Mycobakterien Lipoarabinomannan, beides sind Liganden von TLR2²⁵. Doch nicht nur Zellwandbestandteile können Liganden der TLRs sein. TLR5 erkennt Flagellin, welches in begeißelten Bakterien vorkommt. Ebenso kann DNA, ob viral oder bakteriell durch TLR9 erkannt werden. Virale und bakterielle DNA ist auf andere Weise modifiziert und wird darüber und über ihre Lokalisation in Zellkompartements in denen sie unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommt als fremd erkannt²⁵. Bakterielle und virale RNA, die in Endophagosome gelangt, kann von TLR7, TLR8 und TLR3 erkannt werden. Eine Aktivierung von TLR1, 2, 4, 5 und 6 durch PAMP führt zur Freisetzung von inflammatorischen Proteinen, die Aktivierung von TLR9, TLR7 und TLR8 zur Freisetzung von Typ I Interferonen²⁵.

NOD-like Rezeptoren

Eine weitere Gruppe von PRR sind die *NOD-like* Rezeptoren (NLRs). NLRs sind eine Gruppe von zytoplasmatischen Rezeptoren mit 23 bekannten Mitgliedern²⁵.

Als Beispiel seien hier NOD1 und NOD2 genannt. Diese sind zytoplasmatische Rezeptoren und werden durch verschiedenen Peptidoglykane, ebenfalls Bakterienwandbausteine, aktiviert²⁶. NOD2 spielt darüber hinaus auch eine große Rolle in der Abwehr von *Toxoplasma gondii*²⁷. Eine Aktivierung führt zu einer Oligomerisierung der Rezeptoren über spezifische Domänen und so zu einer Freisetzung inflammatorischer Zytokine²⁵. Dass NLRs eine wichtige Rolle in der Balance der Immunabwehr spielt, kann daran festgemacht werden, dass bestimmte genetische Varianten von NOD1 mit Atopie in Verbindung gebracht werden^{28,29}, Varianten von NOD2 mit Morbus Crohn^{30,31}.

In Makrophagen oder dendritischen Zellen kann die Erkennung einiger PAMPs zudem zur Formation eines Inflammasoms führen. Das Inflammasom ist ein Proteinkomplex aus Mitgliedern der NLR-Familie und weiterer nicht-NLRs, der Caspase-1 aktivieren kann, welche

wiederum pro-IL1 β in die aktive proinflammatorische Form IL-1 β überführt²⁵. Das am besten untersuchte Inflammason ist das NLRP3 Inflammason. Dieses besteht aus den Proteinen NLRP3, ASC und Procaspase-1. Nach Aktivierung durch ein PAMP kommt es zu einer Spaltung von Procaspase-1 zu Caspase-1 und somit zur Aktivierung von Caspase-1.

RIG-I-like Rezeptoren (RLR)

Eine andere wichtige Gruppe von PRRs ist die Gruppe der RLRs. Diese Familie besteht aus den drei Mitgliedern *retionic acid inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation antigen 5* (MDA5) und *laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2)²⁵. Die RLRs sind ubiquitär vorkommende zytosolische Nukleinsäurerezeptoren, deren Expression durch Typ I Interferone induziert wird.

Strukturell sind alle RLRs ähnlich aufgebaut. Am C-terminalen Ende befindet sich die C-terminale Domäne (CDT), welche eine wichtige Rolle in der Detektion viraler RNA spielt. Möglichkeiten zur fremd-eigen-Differenzierung von RNA bieten neben dem 5'-triphosphat-Ende - eukaryotische RNA wird im Kern aufwändig prozessiert und am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur versehen - auch Doppelsträngigkeit. dsRNA kommt in eukaryotischen Zellen, mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. tRNA, unter physiologischen Bedingungen nicht vor. Die CDT von RIG-I erkennt das 5'-tri- oder diphosphat-Ende kurzer doppelsträngiger RNA (dsRNA)³², die CDT von MDA5 hingegen erkennt lange doppelsträngige RNA, unabhängig von der Phosphorylierung. Der CDT folgt eine Helikase-Domäne, die ebenfalls für die Bindung der RNA verantwortlich ist³³. Am N-terminalen Ende von RIG-I und MDA5 befinden sich zwei CARD-Domänen, die als Bindeglied zur RIG-I-Signalkaskade dienen (Abbildung 1-1).

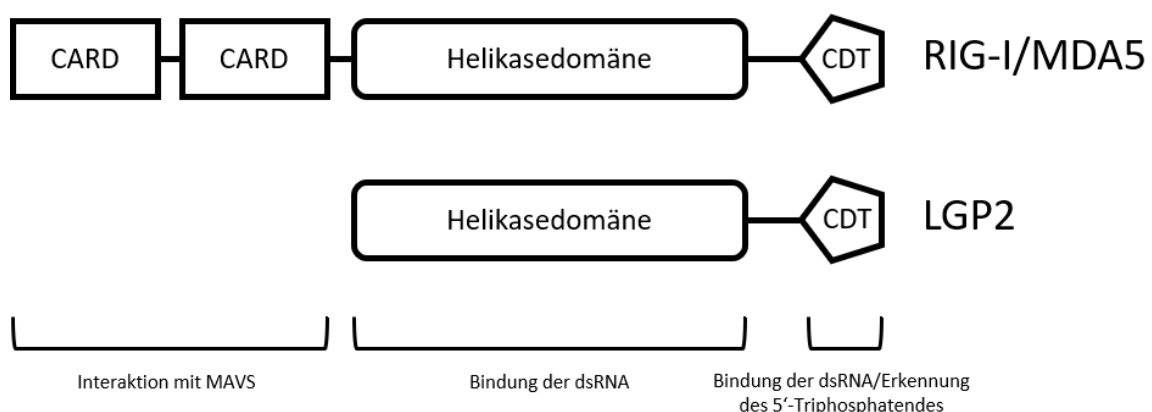


Abbildung 1-1 Schematischer Aufbau der RIG-I like Rezeptoren. Nach Schmidt *et al*³². RLRs bestehen aus jeweils einer C-terminale Domäne (CDT), einer Helikasedomäne (beide sind an der Bindung von Nukleinsäuren beteiligt) und im Falle von RIG-I und MDA5 zweier caspase recruitment domains (CARD), LGP2 fehlen diese CARDS

Bei Aktivierung interagieren die CARD-Domänen der RLRs mit den CARD-Domänen des mitochondrial lokalisierten Proteins *mitochondrial anti-viral signaling* (MAVS) und führen so zu

einer Aktivierung des *interferon regulatory factor 3* (IRF3) und IRF7. Die Aktivierung von IRF3 und 7 führt zur Transkription der Typ I Interferone (siehe Abb. 1-2) ³².

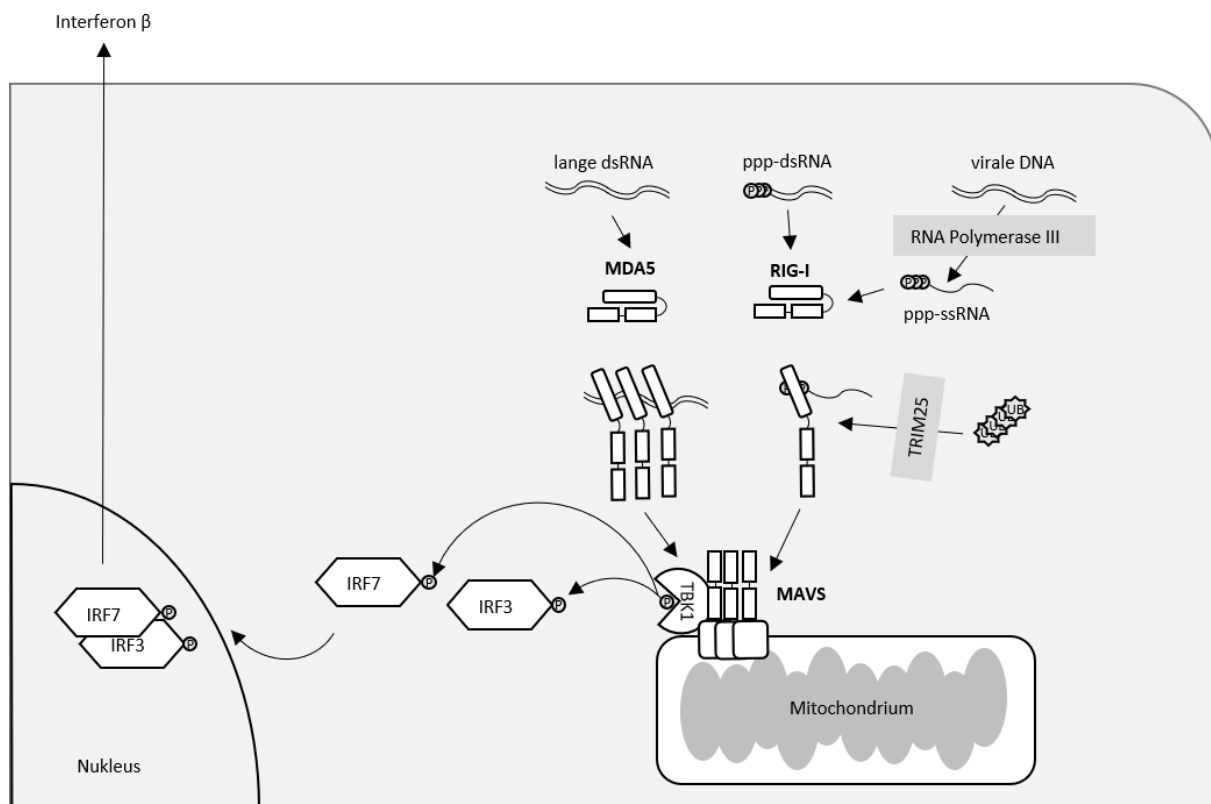


Abbildung 1-2 Schematische Übersicht der verschiedenen Wege zur Erkennung viraler Nucleinsäuren durch RIG-I like Rezeptoren. Nach Schmidt *et al.* ³², Reikine *et al.* ³³ RIG-I erkennt doppelsträngige pppRNA, MDA5 lange dsRNA >1000bp. Die zytosomatische RNA Polymerase III transkribiert AT-reiche DNA und transkribiert diese in pppRNA, welche dann ebenfalls durch RIG-I erkannt wird. Durch Bindung von RNA an RLRs nehmen diese ihre aktive Form an und die CARDs des RLRs werden freigelegt. RIG-I wird durch die E3-Ubiquitin-Ligase TRIM25 poly-ubiquitinyliert. So wird die Interaktion mit MAVS über eine CARD-CARD-Interaktion möglich. Die Aktivierung von MAVS führt über die Kinase TBK1 und die Transkriptionsfaktoren IRF3/IRF7 zur transkriptionellen Induktion von Typ I Interferonen.

RIG-I bindet an doppelsträngige Tri oder bi-phosphat-RNA (pppRNA) ³⁴. Durch Bindung der RNA werden die CARD-Domänen freigelegt und RIG-I so in eine aktive Form überführt. RIG-I ist ein essentieller Teil der viralen Abwehr für eine Reihe von klinisch relevanten Erregern wie zum Beispiel das Influenzavirus oder das Hepatitis C Virus ³². MDA5 hingegen bindet vor allem längere dsRNA (>1000bp) ohne ein spezifisches 5'-Ende zu benötigen ³⁵. Auch sammeln sich mehrere MDA5-Moleküle entlang eines RNA-Stranges ³³. Diese Anordnung erlaubt über die CARD-Domänen eine Oligomerisierung und Aktivierung von MAVS. Bisher konnte gezeigt werden, dass MDA5 Picornaviren wie das Hepatitis A oder Poliovirus erkennt.

Auch konnte gezeigt werden, dass die RNA-Polymerase III AT-reiche DNA im Zytoplasma erkennt und diese in pppRNA umschreibt. Diese pppRNA wird von RIG-I erkannt und aktiviert so die Signalkaskade. Der Effekt wurde sowohl für die synthetische Oligonuklotide mit einer repetitiven dAdT Sequenz, als auch für virale DNA nachgewiesen ^{36,37}.

Sowohl RIG-I, wie auch MDA5 bilden bei Aktivierung Oligomere über ihre CARD-Domänen, wobei RIG-I Oligomere aus weniger Molekülen bestehen, als MDA5 Oligomere³⁸. Diese Gruppierungen stellen die aktiven Formen dar. RIG-I benötigt zur vollen Aktivierung zusätzlich K63-gekoppelte Polyubiquitinketten. Diese poly-Ubiquitylierung geschieht durch die E3-Ubiquitin-Ligase *tripartite motif-containing protein 25* (TRIM25)^{39 33}. Diese Oligomere sind nun in der Lage, wiederum über CARD-Domänen, MAVS Polymere zu bilden, was den nächsten Schritt in der RIG-I Signalkaskade darstellt³³.

LGP2 fehlen die CARD-Domänen, weshalb es nicht in der Lage ist, den RIG-I-Signalweg zu aktivieren. Sowohl eine synergistische Funktion zu den anderen RLRs, wie auch eine inhibitorische Funktion werden diskutiert³³.

MAVS aktiviert die Kinase TBK1, die den Transkriptionsfaktor IRF3 phosphoryliert und somit in seine aktive Form bringt, was zu einer Aktivierung der Typ1-Interferone führt²⁵.

Ein weiterer zytoplasmatischer DNA-Rezeptor ist das *absent in melanoma 2* (AIM2) Inflammasom. AIM2 erkennt zytoplasmatische DNA und spaltet Procaspase-1 zu Caspase-1, welches das proinflammatorische IL-1 β aktiviert²⁵.

Ebenso erkennt das zytosolische Protein *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) zytosolische DNA. Nach Bindung von zytosolischer dsDNA synthetisiert cGAS cyclic di-GMP-AMP (cGAMP), welches als *second messenger* das ER-gebundene Effektorprotein *stimulator für IFN genes* (STING) aktiviert. STING wiederum führt über die Aktivierung von TBK1 zur Freisetzung von Typ-I Interferonen⁴⁰.

1.3.2 Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe zwischen Zellen, die auf einen Stimulus hin freigesetzt werden. Zytokine sind meist kleine Moleküle (<25kDa) und werden über spezifische Rezeptoren erkannt. Die Aktivität von Zytokinen kann autokrin (betrifft die freisetzende Zelle), parakrin (betrifft umliegende Zellen) oder endokrin (systemische Wirkung) sein²¹. Zytokine spielen wichtige Rollen in einer Vielzahl von Prozessen, angefangen bei der Differenzierung und Reifung von Zellen (koloniestimulierende Faktoren) über immunologische Reaktionen (TNF) und Kommunikation zwischen den Immunzellen (Interleukine), bis hin zu Chemoattraktion (Chemokine)²¹.

Im Rahmen von Virusinfektionen spielen vor allem die Gruppe der Interferone eine wichtige Rolle. Unterschieden werden hier drei Familien: Typ-I, -II und -III Interferone. Die wichtigsten Vertreter der Typ-I Interferone sind Interferon- α (IFN- α) (im Moment sind 13 humane Interferon

α Subtypen bekannt), sowie Interferon- β (IFN β). Interferon- γ (IFN- γ) ist der einzige Vertreter der Typ-II Interferone. Während IFN- γ lediglich von NK-Zellen und T-Zellen produziert wird, kann nahezu jede Körperzelle Typ-I Interferone freisetzen⁴⁰. Typ-III Interferone sind IFN λ 1, IFN λ 2 und IFN λ 3.

Typ-I Interferone binden an den Transmembranrezeptor Interferon- α/β Rezeptor (IFNAR), der die Tyrosinkinase JAK1 und TYK2 aktiviert. Diese phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 und setzen so die Transkription der interferoninduzierten Gene (ISG) in Gang^{21,40}. ISGs bilden als Gesamtheit ein mehrere hundert Gene umfassendes antivirales Gen-Programm, das es Viren erschwert in der infizierten Zelle zu replizieren und umliegende Zellen zu infizieren. Beispiele für antivirale ISGs sind MxA und die IFITM-Familie²². Viele Viren haben Mechanismen entwickelt, um die Interferonantwort zu unterdrücken oder zu stören⁴¹. *In vivo* Versuche mit IFNAR1-*Knockout*-Mäusen zeigten, dass die Interferonantwort eine maßgebliche Rolle in der Widerstandsfähigkeit gegen Viren spielt⁴².

Typ-I Interferone wirken auch auf die Zellen des Immunsystems und aktivieren sowohl Zellen des angeborenen (Monozyten, NK-Zellen), wie auch des erworbenen Immunsystems (T-Zellen, B-Zellen).

1.4 Ziele dieser Arbeit

In Experimenten unserer Arbeitsgruppe, die Mechanismen der Apoptose-Induktion durch DNA-Viren untersuchten, wurde Koffein als Inhibitor der Proteinkinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) verwendet und damit eine Rolle des DNA-Reparatur-Signalwegs in der Apoptose-Induktion durch zytoplasmatische virale DNA nahegelegt⁴³. In noch nicht veröffentlichten Daten aus diesem Projekt zeigte sich in Anwesenheit von Koffein in einigen Experimenten neben der verminderten Apoptose auch eine verminderte Freisetzung von Interferon und Inflammatorischen Zytokinen nach einer Infektion mit einem DNA-Virus. Dieser vorläufige Befund sollte in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden und insbesondere der Effekt von Koffein auf die Zytokinproduktion nach Stimulation intrazellulärer Nukleinsäure-Rezeptoren von Typ der RIG-I-like Helikasen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, D
<i>Lamin Air Flow</i> (HB 2448)	Heraeus, Hanau, D
<i>Light Cycler</i> 480 II	Roche Diagnostics, Mannheim, D
<i>Multiplate Reader</i> Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbach, D
Nanodrop ND-1000	NanoDrop, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, D
pH-Meter 720 Inolab benchtop	WTW, Darmstadt, D
<i>Thermocycler</i> T3	Biometra, Göttingen, D
Vortexmischer	Janke & Kunkel, Staufen, D
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf Hamburg, D
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Heraeus, Hanau, D

2.1.2 Reagenzien und Kits

Agar-Agar, Kobe I	Roth, Karlsruhe, D
<i>Annexin V apoptosis detection kit</i>	BD Biosciences, San Diego, USA
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, D
Biocoll	Merck Millipore, Billerica, USA
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenol blue	Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ciprofloxacin	Stada, Bad Homburg, D

Coelenterazine	Promega, Mannheim, D
dAdT	Invivogen, San Diego, USA
dNTPs (10mM)	Fermentas, St. Leon Rot, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Paisley, GB
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Genejuice	Merck Chemicals, Darmstadt, D
GMEM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Human IFN-alpha ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis , USA
Human IL6 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Human IP-10 ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis , USA
Koffein	Sigma Aldrich, Steinheim, D
L-Glutamine	PAA, Linz, A
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lipofectamine RNAiMax	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Luciferase-Assay Kit</i>	BioThema, Handen, S
MCDB 153	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
MegaShortscript T7 Kit	Fa. Ambion, Darmstadt, D
Opti-MEM	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Passive Lysis Buffer</i> Promega	Mannheim, D
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Linz, A
Pfu Polymerase	Fermentas, St. Leon Rot, D
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	PAA, Linz, A
Poly(I:C)	Invivogen, San Diego, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, NL

RT-PCR Reaktionsmix	Peqlab, Erlangen, D
Streptomycin	PAA, Linz, A
Trypan blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tryptose	Sigma-Aldrich, St, Louis, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterial

LeucoSep Röhrchen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Steril-Filter	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zellkulturflaschen	Corning, Corning, USA

2.1.4 Plasmide

Name	Nr.	Promotor	Beschreibung	Resistenz
pGI2-basic (Promega)	46	IFN- β	Firefly-Luciferase unter Kontrolle des IFN- β -Promotors	Ampicillin
pRL-CMV Vector (Promega)	47	CMV	Renilla-Luziferase Kontrollvektor zur Ko-Transfektion mit Luciferase-vektoren	Ampicillin
PCDNA 3.1		CMV		Ampicillin

2.1.5 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Metabion (Planegg/Steinkirchen, D) synthetisiert. Für das Primerdesign für *qRT-PCR*-Assays wurde das *Assay Design* Programm, sowie die *Universal Probe Library* (UPL) von Roche (Basel, CH) verwendet.

Zielgen	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	UPL- <i>Probe</i>
HPRT1 (human)	tgacctgattattttgcatacc	cgagcaagacggtcagtcct	73
Interferon- β (human)	cgacactgttcgtgtgtca	gaggcacaacaggagagcaa	25

Für die Synthese von doppelsträngiger ppp-RNA wurden der T7-Primer, sowie zwei Templates verwendet.

	Sequenz
T7-Promoterprimer	taatacgactcactata
Template 2.2s	tcaaacagagggtcgcctatagtgagtcgta
Template 2.2as	gcatgcgacctctgttgactatagtgagtcgta
5'-ppp-2.2 RNA	gcaugcgaccucuguuuga

2.1.6 Software

GraphPad Prism

GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

Microsoft Office

Microsoft, Redmont, USA

2.1.7 Virusstämme

In dieser Arbeit wurde das *Encephalomyokarditisvirus* (EMCV, *wild typ*) und das *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV, Indiana Strang), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Anne Krug (LMU München), verwendet.

2.1.8 Zelllinien

Als humane Zelllinien wurden in dieser Arbeit die *Human Embryonic Kidney* 293T Zelllinie (HEK293T), sowie die humane Melanomzelllinie 1205Lu verwendet. Die 1205Lu Zelllinie wurde von Dr. Robert Besch (LMU München) zur Verfügung gestellt.

Um Virustiter mittels Plaque-Assay zu bestimmen, wurden *Baby Hamster Kidney* (BHK) Zellen verwendet.

2.1.9 Medien

DMEM Standardzellkulturmedium	DMEM 10%FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin
PBMC Medium	RPMI 10% FCS 2mM L-Glutamin 1%Ciprofloxacin
GMEM Standardzellkulturmedium	GMEM 1% Tryptose 1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Wachstumsbedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Standardzellkulturinkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% des Zellkulturflaschenbodens 1:10 geteilt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Trypsin +0,5% EDTA von der Oberfläche der Zellkulturflaschen gelöst, resuspendiert und anschließend in frischem Medium wieder ausgebracht. Falls für ein Experiment notwendig,

wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, um tote Zellen identifizieren zu können, wurde Trypanblau verwendet. HEK 293T Zellen und 1205LU Zellen wurden in Standardzellkulturmedium DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin kultiviert, PBMCs in RPMI mit 10% FCS, 2mM L-Glutamine und 1% Ciprofloxacin⁴⁴, BHK-Zellen in GMEM mit 1% Tryptose, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS.

Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Vor der Blutentnahme wurden in den Abnahmespritzen 5000 IE Heparin vorgelegt, anschließend erfolgte die Blutabnahme. In *LeucoSep-Blue-Cap* Röhrchen wurden 13ml *Biocoll Separation Solution* gegeben, kurz bei 400g abzentrifugiert und anschließend mit maximal 25ml heparinisierem Vollblut überschichtet. Die befüllten *LeucoSep-Blue-Cap* Röhrchen wurden bei minimaler Beschleunigung und Abbremsen 15min bei Raumtemperatur und 800g zentrifugiert. Nach der Auftrennung und Abnahme der mononukleären Zellen wurden diese mit 0,9% NaCl gewaschen und bei 4°C 10min bei 500g zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden resuspendiert und erneut mit 0,9% NaCl gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes, wurden die Zellen in 3ml Erylyse-Lösung (8,929g NH₄Cl, 0,029g KHCO₃, 1g EDTA, 1l Aqua dest., zur Lösung aufkochen, anschließend den pH auf 7,2 mit HCl einstellen und sterilfiltrieren) resuspendiert und 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen in 0,9% NaCl wurden die Zellen in RPMI-Medium für PBMCs aufgenommen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Transformation

Eingefrorene hitzekompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 1-2µl des zu transformierenden Plasmids zugegeben und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Bakterien wurden dann exakt eine Minute auf 42°C erhitzt und anschließend mit frischem LB-Medium eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Bakteriengemisch wurde auf einer Agarplatte mit in Abhängigkeit des Resistenzgens des Plasmids zugefügtem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank selektioniert. Die über Nacht entstandenen Kolonien wurden gepickt und 16h in LB-Medium, ebenfalls mit Antibiotikum, expandiert.

DNA-Präparation

Die Bakterien wurden bei 12.000g abzentrifugiert. Die Plasmidaufreinigung erfolgte mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits, die Verwendung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Synthese von pppRNA

pppRNA wurde mit Hilfe des MEGAscript T7 Kits synthetisiert. Hierzu wurde zunächst der T7-Primer entweder mit dem 2.2s oder 2.2as Template hybridisiert. Hierzu wurden 2µl Primer mit 2µl Template in 10µl H₂O bei 70°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Um ss-pppRNA zu synthetisieren wurden den hybridisierten Strängen der MEGAscript T7 Polymerasemix zugegeben, wie im Herstellerprotokoll angegeben. Für die Hybridisierung zu ds-pppRNA wurden die entstandenen RNA-Produkte aus dem 2.2s und dem 2.2as-Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Entsprechend den Herstellerangaben folgte ein DNase-Verdau und ein Phenol-Chloroformfällung. Verbliebene Verunreinigungen aus den vorangegangenen Reaktionsschritten wurden mittels RNeasy-Kit (Qiagen) entfernt. Die Konzentration von dsRNA wurde photometrisch mit Hilfe des Nanodrop gemessen.

RNA-Isolation

RNA wurde aus Zellen mit dem *Total RNA Kit* von Peqlab nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die erhaltene Konzentration wurde photometrisch mittels *Nanodrop* gemessen. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80°C.

Reverse Transkription von RNA

Um RNA in cDNA umzuschreiben wurde eine reverse Transkription durchgeführt. 0,2µl *Reverse Transcriptase H* (Fermentas), 0,5µl Riboloc (Fermentas), 2µl dNTPs (10mmol/µl), 2µl 18-poly Primer, 4µl RT-Puffer und 11,3µl (Gesamtansatz 20µl), wurden 60min bei 42°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 70°C für 10min.

Quantitative Real-Time-PCR

Um cDNA und somit RNA quantitativ messen zu können, wurde der *Lightcycler* (Roche) und die zugehörige *Universal Probe Library* (Roche) verwendet. Für jeden Ansatz wurden, wie vom Hersteller angegeben, 9µl cDNA, je 0,4µl Primer (10pmol/µl), 0,2µl der benötigten Sonde und 10µl des *Peqlab Kapa Probe* Reaktionsmix gegeben. Nach einer Denaturierung bei 95°C für 10min erfolgten 45 Zyklen zur Amplifikation im Standardprogramm (10 Sekunden 95°C, 10 Sekunden 60°C, 10 Sekunden 72°C) des *Lightcyclers*.

2.2.3 Lipotransfektion

Um Zellen mit RNA oder DNA zu transfizieren, wurde Lipotransfektion verwendet. pppRNA, dAdT und poly IC wurden mit RNAiMAX transfiziert, Plasmide mit GeneJuice. Die Transfektionen erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Als Medium wurde Opti-MEM verwendet.

2.2.4 *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)*

Der *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein Verfahren, um die Konzentration von Molekülen in einer Lösung zu bestimmen. Hierfür sind zwei verschiedene Antikörper gegen das zu messende Molekül notwendig. Der erste Antikörper wird an die Oberfläche einer 96-Lochplatte gebunden. Die zu untersuchende Lösung wird zu den gebundenen Antikörpern gegeben, für eine bestimmte Zeit inkubiert und anschließend abgewaschen. Es verbleiben nun die Antikörper mit den gebundenen Molekülen in der Platte. Im nächsten Schritt werden Antikörper gegen das Molekül zugegeben, an welches das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt ist. Wiederum erfolgen Inkubation und Abwaschen des nicht gebundenen Antikörpers. HRP setzt ein zunächst farbloses Substrat um, das Produkt dieser Reaktion kann anschließend kolorimetrisch gemessen werden. Die gemessene Absorption korreliert mit der Menge an gebundenem HRP-Antikörper. Damit kann im Vergleich zu einer Standardkurve der gesuchten Substanz mit bekannter Konzentration, die unbekannte Konzentration in der Lösung abgelesen werden.

Um die Konzentrationen der von IFN- α und IP-10 in Zellüberständen zu messen, wurde ein sog. "Sandwich-ELISA" (R&D System) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

2.2.5 Luciferase Assay

Um die Aktivität eines Promotors zu bestimmen, wurde der *Luciferase-Assay* angewendet. Hierbei stehen Luciferasegene unter der Kontrolle des Promotors, dessen Aktivität gemessen werden soll. Die *Firefly*-Luciferase stand unter der Kontrolle des IFN- β -Promotors, die *Renilla*-Luciferase unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die Aktivität des *Firefly*-Luciferase zeigte somit die Induktion des INF- β -Promotors an, die Aktivität des *Renilla*-Luciferase dient dabei der Normalisierung.

Je 10^5 HEK293T-Zellen wurden nach dem Anwachsen mit den Luciferase-Plasmiden und eventuelle Stimulationsplasmiden in einer 96-Loch-Platte transfiziert (Lipotransfektion). Zur Normierung der Plasmidmenge wurde die DNA-Mengen in allen Bedingungen mit dem leeren

PCDNA3.1 Vektor-Plasmid auf 200ng angeglichen. PCDNA3.1 fungiert darüber hinaus als Negativkontrolle. Nach 18 bis 24h Inkubation wurden die Zellen mit *Passive-Lysis-Buffer* lysiert. Die Aktivität der Luciferasen wurde nach Zugabe der Enzym-Substrate (*Firefly-Luciferase: Luciferase-Assay Kit, Renilla-Luciferase: Coeleterazine*) am Mithras *Multiplate-Reader* gemessen.

2.2.6 Plaque-Assay

Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurde ein sog. *Plaque-Assay* durchgeführt. Hierzu wurden $3,5 \times 10^6$ BHK-Zellen in 6-Loch-Platten gegeben. Über Nacht wuchsen diese auf eine Konfluenz von ungefähr 80%. Die Zellen wurden mit einer Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-10} der Viruslösung (Verdünnung in Opti-MEM) infiziert. Nach 2h wurde die Viruslösung entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Agarose-Deckel versiegelt, um das Ausbreiten des Virus zu verhindern. Für den Agarosedeckel wurden 1% Agarose in PBS gelöst und anschließend mit der gleichen Menge GMEN vermischt. Kurz vor Verfestigung der Agarose wurden die Zellen vorsichtig überschichtet.

Nach 24h wurde der Deckel entfernt und der Zellrasen mit Methylenblau gefärbt. Anschließend wurden die Plaques ausgezählt, um die *Plaque-Forming-Unit* (PFU) zu bestimmen.

2.2.7 Statistische Analyse

Die Daten wurden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism analysiert. Es wurde ein *gepaarter zweiseitiger student's T-test* verwendet, um die Signifikanz der Mittelwerte zu bestimmen. Als signifikant wurden $p < 0,05$ angesehen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$), ein p-Wert $> 0,05$ wurde als nicht signifikant (ns) angesehen. Fehlerbalken sind als Standardabweichung vom Mittelwert angegeben.

3 Ergebnisse

Bei Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Apoptose-Induktion in Zelllinien nach Infektion mit dem DNA Virus MVA (modified vaccinia Ankara) wurde von Wenzel et al.⁴³ Koffein eingesetzt, um die Kinase ATM zu inhibieren. Als Nebenbefund dieser Experimente fiel eine Inhibition der MVA-induzierten Zytokinproduktion in Anwesenheit von Koffein auf. Während die ATM-Abhängigkeit der MVA-induzierten Apoptose durch eine siRNA-vermittelte Depletion von ATM und ATR bestätigt werden konnte und publiziert wurde, war die beobachtete Koffein-abhängige Zytokinhemmung nicht durch Depletion von ATM/ATR wieder aufzuheben, so dass hier eine ATM-unabhängige Wirkung von Koffein auf die MVA-induzierte Zytokinproduktion postuliert wurde. Da bekannt ist, dass durch MVA und das ebenfalls bei Wenzel et al.⁴³ eingesetzte virale DNA-Imitat dAdT nach Umschrieb der DNA durch die Polymerase III in triphosphat-modifizierte RNA die Zytokininduktion, zumindest zum Teil durch Aktivierung der RIG-I-like Helikasen erfolgt³⁶, wurde zunächst eine Wirkung von Koffein auf die RLH-induzierte Zytokininduktion vermutet. MVA und dAdT können jedoch je nach Zellsystem auch die Mustererkennungsrezeptoren AIM2, cGAS/Sting und TLR 9 aktivieren, so dass auch eine Beeinflussung dieser Signalwege durch Koffein möglich erschien. Dies sollte daher experimentell weiter untersucht werden.

3.1 Effekt von Koffein auf PBMCs

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) sind eine Mischung von verschiedenen Zelltypen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Um zu untersuchen, ob ein Effekt von Koffein auf die Zytokinausschüttung generell bei Zellen des Immunsystems zu beobachten ist, wurden PBMCs von fünf verschiedenen Spendern isoliert, mit verschiedenen Konzentrationen Koffein behandelt und anschließend mit LPS, dAdT, ppp-RNA, und poly IC stimuliert. dAdT aktiviert dabei RIG-I, ist aber auch in der Lage den zytoplasmatischen Rezeptor cGAS zu aktivieren. ppp-RNA ist ein spezifischer Ligand des zytoplasmatischen RNA-Rezeptors RIG-I. poly IC führt zur Aktivierung von MDA5 und LPS wird durch TLR-4 erkannt. Nach der Erkennung von ppp-RNA und dAdT durch RIG-I/cGAS bzw. von poly IC durch MDA5 folgt eine Signalkaskade, die zur Aktivierung von NFκB und IRFs und in Monozyten und dendritischen Zellen zur Induktion von Interferon-α führt. Die TLR-4-vermittelte Stimulation mit LPS führt in diesen Zellen insbesondere zur einer MYd88 und NF-κB-abhängigen Ausschüttung von TNF-α.

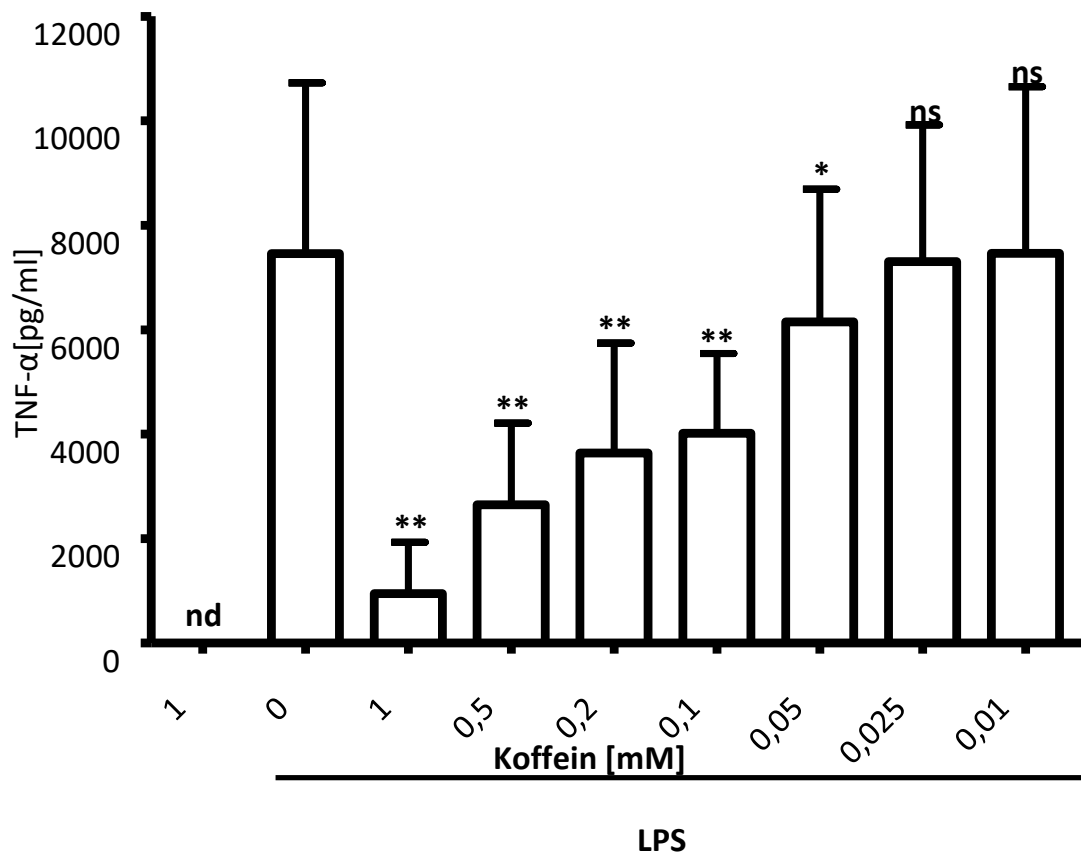


Abbildung 3-1 Koffein hemmt die TNF-Freisetzung von PBMCs nach Stimulation mit LPS. 1×10^5 PBMC wurden in einer 96 Well Platte in $100\mu\text{l}$ Medium in Triplikaten ausplattiert und mit Koffein in der angegebenen Konzentration inkubiert. 1 h später wurden die Zellen mit LPS (100ng/well) stimuliert und nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und TNF- α mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte \pm SD von 5 verschiedenen Spendern. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ zeigt die Signifikanzniveaus jeweils für den Vergleich mit der LPS-stimulierten Bedingung ohne Koffein im zweiseitigen t-Test, nd = nicht messbar, ns = nicht signifikant.

Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung der LPS-induzierten TNF-Ausschüttung durch Koffein (Abbildung 3-1). 1mM Koffein führte zu einer Reduzierung auf nur 12,6% der Freisetzung im Vergleich zur Stimulation in Abwesenheit von Koffein. Auch 0,5mM (36%), 0,2mM (49%), 0,1mM (54%) und 0,05mM (84%) zeigten eine signifikant reduzierte TNF-Freisetzung. 0,025mM und 0,01mM hingegen zeigten nahezu keine Wirkung mehr. Koffein alleine ohne LPS führte zu keiner Freisetzung von TNF.

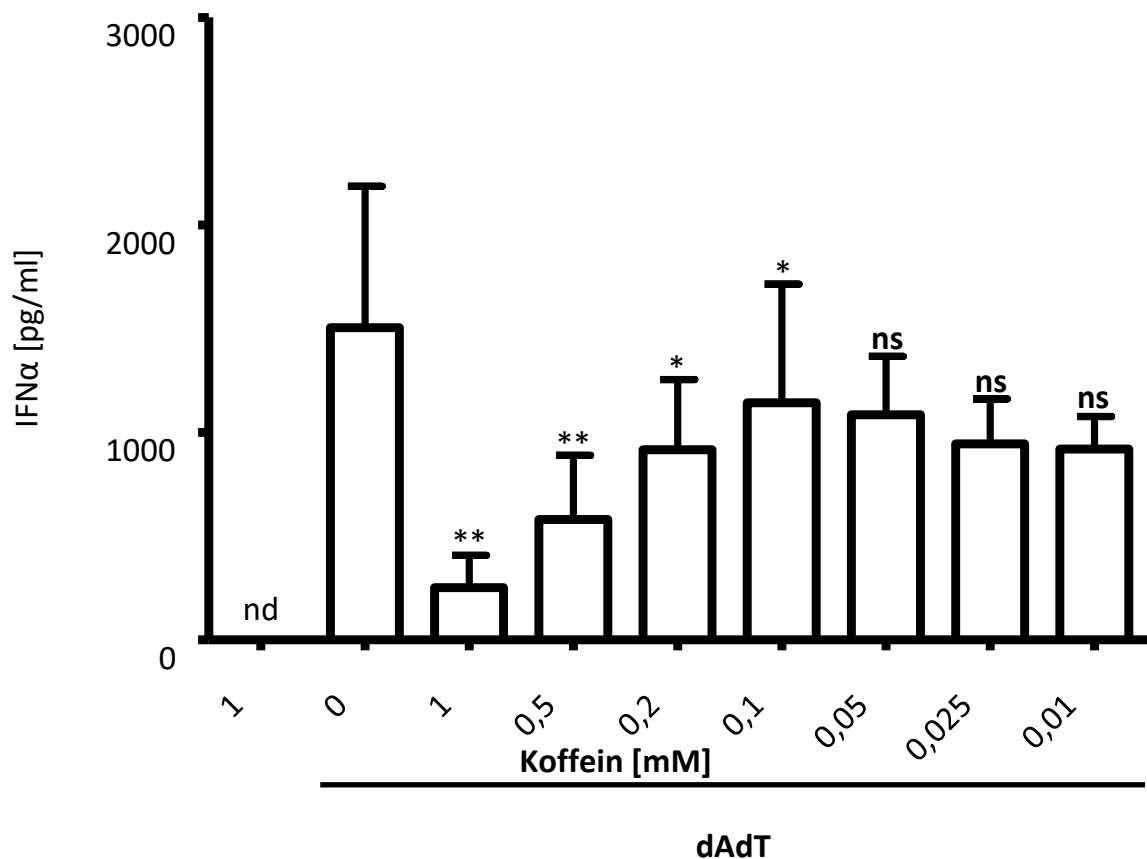


Abbildung 3-2 Koffein hemmt die Interferon- α Freisetzung von PBMCs nach Stimulation mit dAdT. 1×10^5 PBMC wurden in einer 96 Well Platte in 100 μ l Medium in Triplikaten ausplattiert und mit Koffein in der angegebenen Konzentration inkubiert. 1 h später wurden die Zellen mit dAdT (200ng/well) komplexiert mit RNAiMAX stimuliert und nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und IFN- α mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte \pm SD von 5 verschiedenen Spendern. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ zeigt die Signifikanzniveaus jeweils für den Vergleich mit der dAdT-stimulierten Bedingung ohne Koffein im zweiseitigen T-test, nd = nicht messbar, ns = nicht signifikant.

Auch für die dAdT-induzierte Interferon- α Produktion zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Interferonfreisetzung durch Koffein. 1mM Koffein senkte die IFN-Freisetzung auf 16,8% der, 0,5mM auf 38,5%, 0,2mM auf 60% und 0,1mM erbrachte ebenfalls nur eine Freisetzung von 76%. Koffein alleine ohne dAdT führte zu keiner Freisetzung von Interferon.

Da dAdT neben der Aktivierung von RIG-I auch über die Aktivierung von cGAS/Sting Interferon-induzieren kann wurde im nächsten Experiment untersucht, ob die Interferonproduktion durch den direkten RIG-I-Agonisten pppRNA ebenfalls durch Koffein beeinflusst wird.

Auch hier zeigte sich eine Reduzierung der pppRNA-induzierten IFN-Ausschüttung durch Koffein (Abbildung 3-2), die jedoch weniger stark konzentrationsabhängig war. Eine

Konzentration von 1mM Koffein führte zu einer $IFN\alpha$ Freisetzung von 51,4% im Vergleich zur Probe ohne Koffein. Niedrigere Konzentrationen führten noch zu einer Hemmung auf 60-70% der IFN -Ausschüttung. Koffein alleine ohne pppRNA führte zu keiner Freisetzung von Interferon.

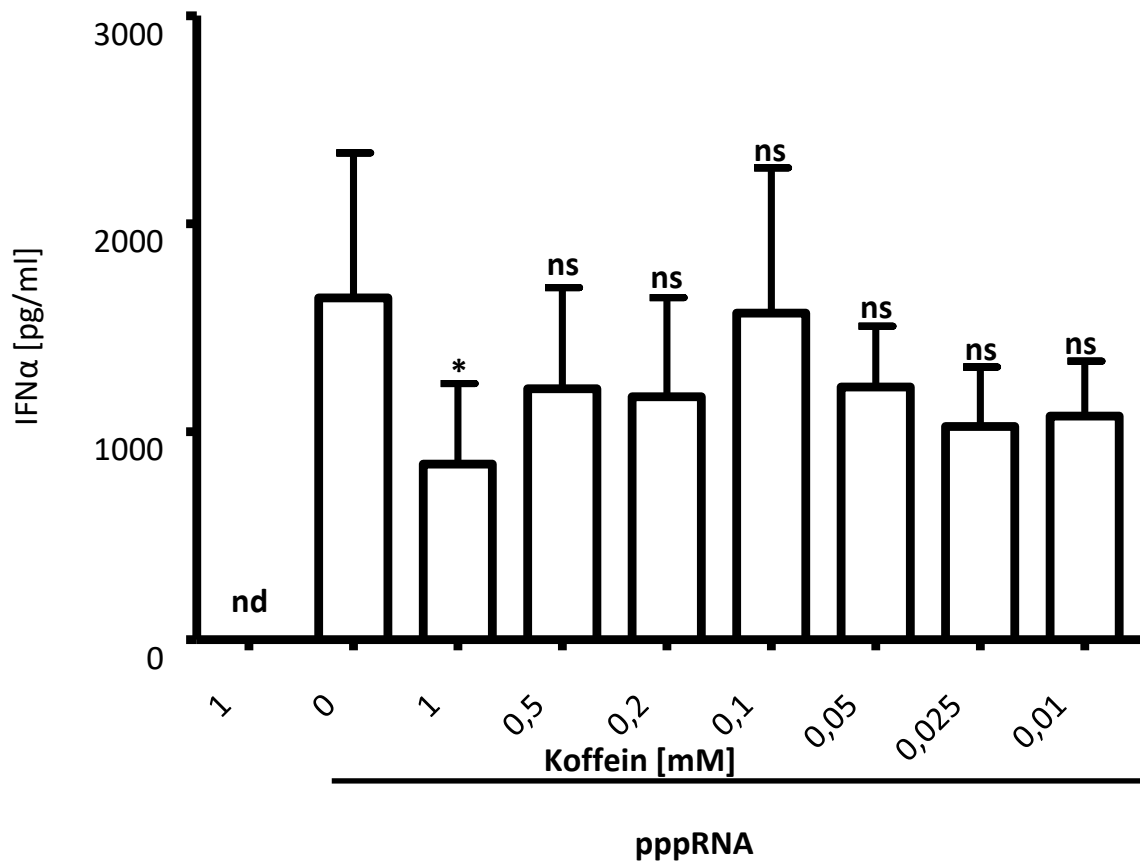


Abbildung 3-3 Koffein hemmt die Interferon- α Freisetzung von PBMCs nach Stimulation mit ppp-RNA. 1×10^5 PBMC wurden in einer 96 Well Platte in $100\mu l$ Medium in Triplikaten ausplattiert und mit Koffein in der angegebenen Konzentration inkubiert. 1 h später wurden die Zellen mit pppRNA ($200ng/well$) komplexiert mit RNAiMAX stimuliert und nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und $IFN-\alpha$ mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte \pm SD von 5 verschiedenen Spendern. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ zeigt die Signifikanzniveaus jeweils für den Vergleich mit der pppRNA-stimulierten Bedingung ohne Koffein im zweiseitigen T-test, nd = nicht messbar, ns = nicht signifikant.

Neben RIG-I ist MDA5 der zweite RLR, der an der Erkennung von fremd-RNA beteiligt ist. Das synthetische Polynukleotid poly IC ist im Zytoplasma ein Ligand von MDA5 kann jedoch auch endosomales bzw. membranständiges TLR3 aktivieren. Um den Effekt von Koffein auf die poly IC-induzierte Interferon-Produktion zu untersuchen wurden PBMCs zunächst mit Koffein in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und anschließend mit poly IC stimuliert. Um eine

MDA5-Aktivierung zu erreichen wurde poly IC dabei via Transfektion ins Zytoplasma geschleust. Wie in Abbildung 3-4 dargestellt.

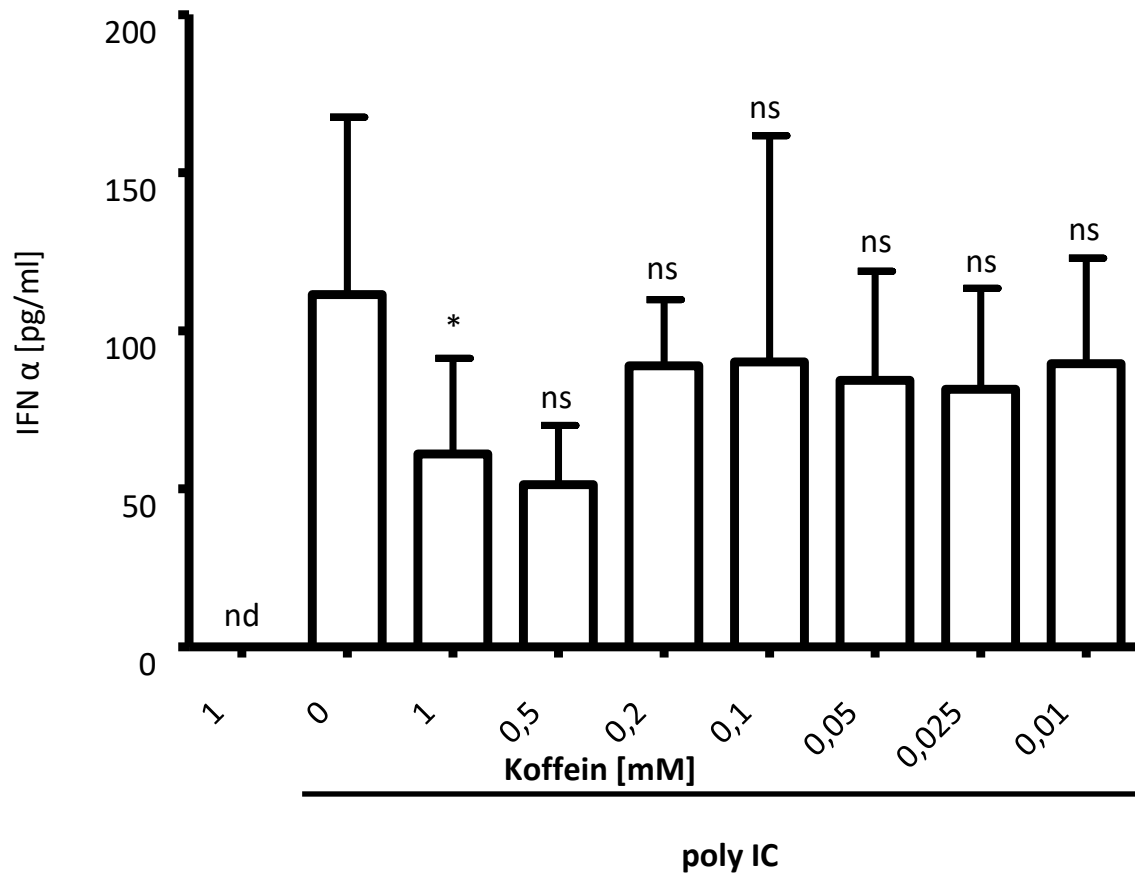


Abbildung 3-4 Koffein hemmt die Interferon- α Freisetzung von PBMCs nach Stimulation mit poly IC. 1×10^5 PBMC wurden in einer 96 Well Platte in 100 μ l Medium in Triplikaten ausplattiert und mit Koffein in der angegebenen Konzentration inkubiert. 1 h später wurden die Zellen mit poly IC (200ng/well) komplexiert mit RNAiMax stimuliert und nach 24 h wurde der Überstand abgenommen und IFN- α mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte \pm SD von 5 verschiedenen Spendern. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ zeigt die Signifikanzniveaus jeweils für den Vergleich mit der poly IC-stimulierten Bedingung ohne Koffein im zweiseitigen T-test, nd = nicht messbar, ns = nicht signifikant.

Zunächst fällt an den Ergebnissen nach Stimulation mit poly IC auf, dass nur 1/10 an Interferon freigesetzt wird, wie bei der Stimulation durch RIG-I. Dennoch lässt sich auch hier eine durch Koffein reduzierte Interferonfreisetzung erkennen. 1mM Koffein reduzieren signifikant die Freisetzung um ca. 50%. Niedrigere Koffeinkonzentrationen erzielen eine 50-10%ige Reduktion von Interferon, wobei die Werte keinen p-Wert $< 0,05$ erreichen, aber einen deutlichen Trend aufweisen. Diese Werte zeigen, dass Koffein nicht lediglich die RIG-I-, sondern auch die MDA5-induzierte Koffeinfreisetzung hemmt.

3.2 Einfluss von Koffein auf das angeborene Immunsystem in 1205LU-Zellen

Um zu untersuchen, ob auch Zellen, die keine spezialisierten Immunzellen sind, auf Koffein mit einer verringerten Zytokinproduktion reagieren, wurden 1205LU-Zellen mit poly IC, einem synthetischen doppelsträngigem RNA-Analogon, stimuliert. poly IC wird vesikulär von TLR3 erkannt. Wird poly IC transfiziert, aktiviert es MDA5.

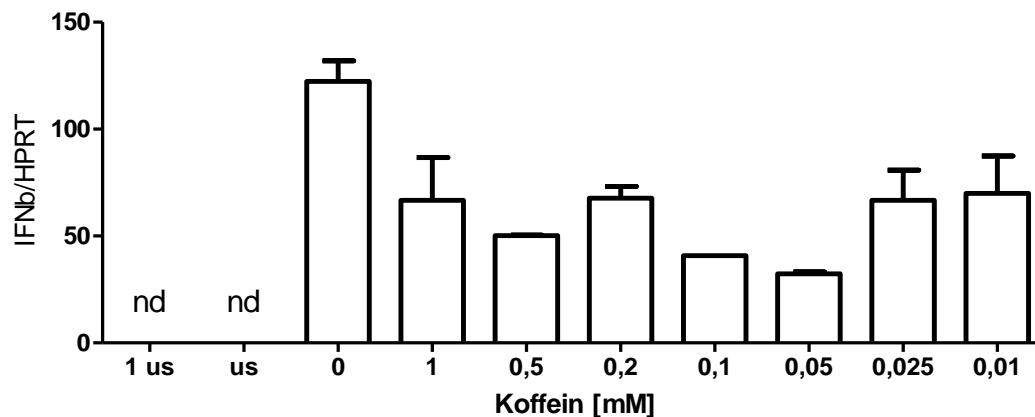


Abbildung 3-5 Koffein hemmt die Freisetzung von Interferon-β in 1205LU-Zellen nach Stimulation mit poly IC

1×10^5 1205LU-Zellen wurden in 12 Well Platte in Duplikaten ausplattiert und nach 24h mit Koffein in der angegebenen Konzentration inkubiert. 1 h später wurden die Zellen mit poly IC (500ng/well) komplexiert mit RNAiMAX stimuliert. Nach 6 h wurde die RNA isoliert. Mittels qRT-PCR wurde die relative Kopienzahl von Interferon-β mRNA im Verhältnis zum *housekeeping*-Gen HPRT gemessen. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. Weder Koffein allein, noch unstimulierte Zellen produzierten messbare Interferon-β mRNA. (us = unstimuliert). Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte +- SD der Duplikate.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt (Abb. 3-5), dass in 1205LU-Zellen die Transkription von IFN-β durch Koffein reduziert wird. Dies kann darauf hindeuten, dass der anti-inflammatorische Effekt von Koffein nicht nur in Immunzellen eine Rolle spielt. Koffein selbst hat keinen immunstimulatorischen Effekt in 1205LU-Zellen.

3.3 Hemmung der IP-10 Freisetzung durch Koffein nach Überexpression des RIG-I Signalweges

Um die Wirkebene von Koffein im RIG-I-Signalweg zu finden, wurden die einzelnen Teile der Signalkaskade aktiviert und versucht, diese Aktivierung durch die Zugabe von Koffein zu hemmen. Dies wurde für RIG-I, MAVS, TBK1 und IRF3 untersucht. Bei RIG-I, MAVS und TBK1 führt die Überexpression zur Aktivierung des Signalwegs. Von IRF3 wurde eine konstitutiv aktive Variante IRF3-5D verwendet.

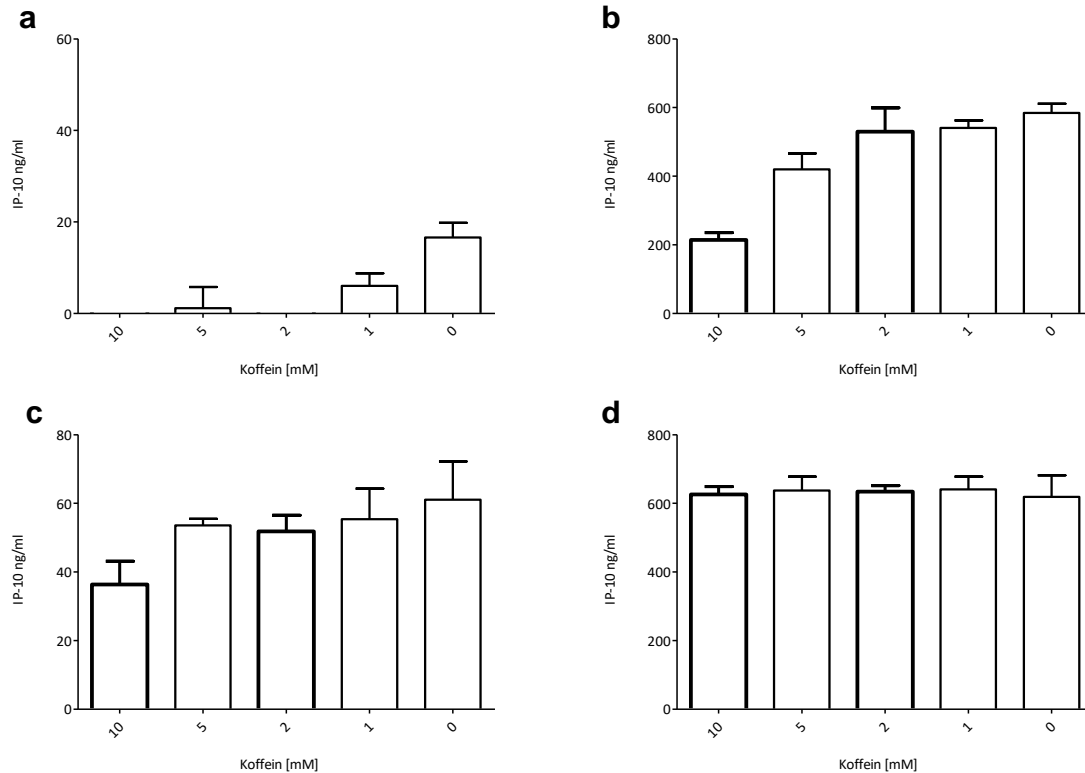


Abbildung 3-6 Koffein hemmt die Freisetzung von IP-10 durch nach Überexpression von RIG-I, MAVS, TBK1 und IRF3 zwischen TBK1 und IRF3.

1x 10⁵ 1205LU-Zellen wurden in 96-Well-Platten in Triplikaten ausplattiert und nach 24h mit Koffein in der angegebenen Konzentration inkubiert. Nach Transfektion von mit GeneJuice komplexierten Überexpressionsplasmiden (RIG-I 200ng DNA, MAVS 50ng, TBK1 50ng, IRF3-5D 200ng, PCDNA3.1 Backboneplasmid) wurden nach 24h die Überstände gesammelt und das freigesetzte IP-10 mittels ELISA bestimmt. RIG-I(a), MAVS(b), TBK1 (c), IRF3-5D(d). PCDNA3.1 zeigte keine IP-10 Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte +- SD der Triplikate.

Koffein hemmt in allen Konzentrationen deutlich die Freisetzung von IP-10 durch die Überexpression von RIG-I. Auch die Freisetzung von IP-10 durch die Überexpression von MAVS und TBK1 wird konzentrationsabhängig gehemmt, wenn auch nicht so deutlich wie bei RIG-I. Die IP-10 Freisetzung durch das konstitutionelle IRF3-5D wird nicht durch Koffein nicht beeinflusst. Diese Daten legen nahe, dass Koffein seine hemmende Wirkung zwischen der Aktivierung von TBK1 und der Phosphorylierung von IRF3 ausüben könnte.

3.4 Der Einfluss von Koffein auf Virusreplikation

Da Koffein einen Einfluss auf die Produktion von Zytokinen hat, war der nächste Schritt, den Einfluss von Koffein auf die Replikation von Viren zu untersuchen. Koffein hemmt die Ausschüttung von Zytokinen, welche dazu dienen, auch Zellen, die noch nicht infiziert sind, in einen Alarmzustand zu versetzen, um eine Verbreitung der Viren zu unterbinden.

Als Modell wurden dabei sowohl ein RIG-I-abhängig erkanntes Virus als auch ein MDA5-abhängiges Virus untersucht. Das Enzephalomyocarditisvirus (EMCV), ist ein Mitglied der Familie der Picornaviren und wird von MDA5 erkannt. Das vesikuläre Stomatitisvirus (VSV) aktiviert RIG-I. Es wurde eine geringe *multiplicity of infection* (MOI) von 0,01 gewählt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass nicht sofort alle Zellen infiziert wurden und somit nicht-infizierte Zellen auf die Zytokine der infizierten Zellen reagieren konnten. Es wäre dann zu erwarten, dass aufgrund der geringeren Zytokinausschüttung durch die Koffeinbehandlung sich die Viren leichter und schneller replizieren können und ein höherer Virustiter gemessen werden könnte.

VSV zeigte jedoch entgegen der ursprünglichen Erwartung bereits ab einer Konzentration von 0,5mM einen um den Faktor 10 verminderten Virustiter nach 24h. Bei einer Konzentration von 1mM war der Titer nach 24h um den Faktor 100 niedriger, nach 48h noch um den Faktor 10. Konzentrationen von 10mM und 5mM verminderten den Virustiter um den Faktor 1000 bis 100, dies war konstant auch noch nach 48h zu beobachten (Abb. 3-8 oben).

Auch auf die Replikation von EMCV hatte Koffein einen suppressiven Einfluss. Bei einer Konzentration von 10mM zeigte sich die Replikation vollkommen supprimiert. Auch bei 5mM und 1 mM kam es noch zu einer Replikationshemmung, die auch nach 48h noch erkennbar war (Abb. 3-8 unten).

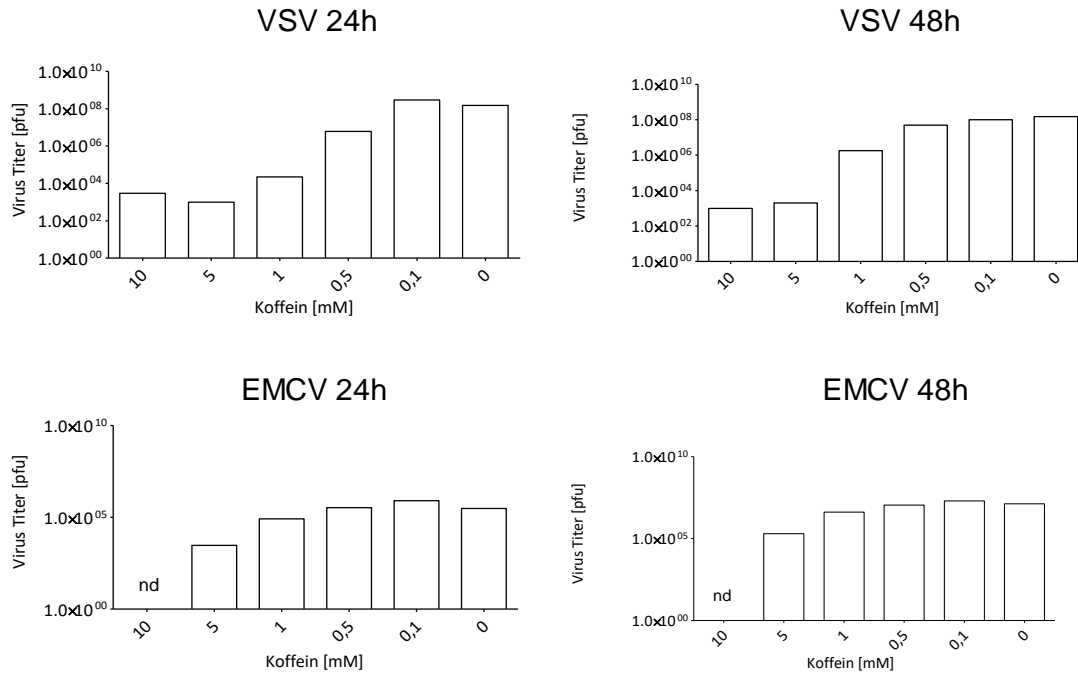


Abbildung 3-8: Koffein hemmt die Replikation von EMCV und VSV in 1205LU-Zellen. 1205LU-Zellen wurden nach Stimulation mit Koffein mit EMCV oder VSV infiziert („multiplicity of infection“ (MOI) 0,01). Nach 24 und 48 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die jeweiligen Virustiter mittels Plaque-Assay als „plaque forming units“ (PFU) gemessen. Die Experimente wurden in Duplikaten gemacht, die Ergebnisse sind als Mittelwerte dargestellt, nd bedeutet eine PFU von unter 1×10^3 .

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, es den Einfluss von Koffein auf die Zytokinproduktion nach Aktivierung des Immunsystems durch Liganden von Mustererkennungsrezeptoren und Viren zu untersuchen und damit verbundene potentielle Effekte auf die Replikation von Viren zu analysieren.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass in PBMCs die *ex vivo* Präinkubation mit Koffein ab Konzentrationen von 50 μM zu einer deutlichen Reduktion der LPS-induzierten TNF- α -Produktion nach 24 h führt. Koffein-Konzentrationen ab 100 μM hemmten zudem die durch Transfektion von dAdT-induzierte Interferon- α Produktion in PBMCs. Dieser hemmende Koffein-Effekt ließ sich, wenn auch etwas weniger deutlich, auch für die durch Transfektion von pppRNA und poly IC induzierte Interferon- α Produktion in PBMC zeigen. Dieser hemmende Effekt von Koffein auf die RLR-induzierte Interferon Typ-I Produktion nach Transfektion von poly IC ließ sich auch in der humanen Melanom Zelllinie 1205lu reproduzieren. In diesem Zellsystem konnte zudem durch Experimente, in denen durch Überexpression von RIG-I, TBK1 und einer konstitutiv-aktiven IRF3 Variante jeweils der RLR-Signalweg aktiviert wurde, gezeigt werden, dass Koffein seinen hemmenden Einfluss auf den RLR-Signalweg unterhalb oder auf Höhe von TBK1 und oberhalb von IRF3 ausübt. Während diese hemmende Wirkung von Koffein auf den RLR-Signalweg zunächst eine Replikationsfördernde Wirkung von Koffein auf Viren erwarten ließ, zeigten Infektionsexperimente mit den beiden durch RLRs erkannten Modellviren VSV und EMCV in 1205lu Zellen jedoch ab Konzentrationen von 500 μM eine deutliche Reduktion der freigesetzten Viruspartikel im Überstand nach 24 und 48 Stunden.

4.2 Koffein und seine Wirkung auf inflammatorische Zytokine und Virusreplikation in der Literatur

4.2.1 Wirkung von Koffein auf inflammatorische Zytokine

Bisher konnte ein immunmodulatorischer Effekt von Koffein in einer Vielzahl von Systemen festgestellt werden. Koffein hat sowohl einen Effekt auf die Zytokinproduktion, aber auch auf die Produktion freier Radikale, die Lymphozytenproliferation, die Antikörperproduktion, die Leukozytenchemotaxis, die Funktion von NK-Zellen und die Apoptose von Immunzellen ⁵.

Bei Konzentrationen von 0,2mM konnten von Van Furth et al. ein statistisch signifikanter Effekt von Koffein auf die Freisetzung von TNF α durch *S. pneumoniae* stimulierte Leukozyten

nachgewiesen werden ⁴⁵. 2004 konnten Horrigan *et al.* zeigen, dass Koffein in einer Konzentration von 100µM einen hemmenden Effekt auf die Freisetzung von TNF-α in Vollblut nach Stimulation mit LPS hat. Eine statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden, dennoch ein Trend ¹⁶. In der gleichen Arbeit zeigten Horrigan *et al.*, dass die reduzierte TNF-α-Freisetzung durch die Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase verursacht wird. Sie beobachteten eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration in Makrophagen. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA). Der PKA-Inhibitor Rp-8-Br-cAMPS konnte den hemmenden Effekt von Koffein auf die Freisetzung von TNF-α wieder aufheben ¹². In einer anderen Arbeit, die den Einfluss von Koffein auf die Antikörperproduktion untersuchte, wurde nachgewiesen, dass die reduzierte Freisetzung von Antikörpern aus murinen Splenozyten durch den PKA-Inhibitor H-89 wieder aufgehoben werden konnte ¹⁷. Für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 und das proinflammatorische Zytokin IL-12 konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung cAMP-abhängig ist. IL-10 wird vermehrt unter einer höheren cAMP-Konzentration freigesetzt, IL-12 vermindert ⁴⁶⁻⁴⁸.

4.2.2 Wirkung von Koffein auf die Virusreplikation

Ein Einfluss von Koffein auf die Virusreplikation wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben. Für das Hepatitis C Virus konnte ein hemmender Effekt für die Replikation *in vitro* ebenso gezeigt werden, wie eine verminderte Rate einer fortgeschrittenen Leberfibrose durch Koffeinkonsum in Patienten mit Hepatitis-C ⁴⁹⁻⁵¹.

Der Effekt, wie Koffein die Virusreplikation hemmt, konnte jedoch bisher nicht abschließend geklärt werden. Die Verfasser oben genannter Arbeiten nehmen zum Teil an, dass die Ursache in der koffeinbedingten Förderung der Apoptose liegt ⁵². Andere Möglichkeiten sind eine Interaktion von Koffein bei der Formation des Virus. Eine Inaktivierung der Viren durch Koffein konnte hingegen ausgeschlossen werden ⁵².

4.3 Diskussion der eigenen Ergebnisse

4.3.1 Der Einfluss von Koffein auf die Freisetzung von Zytokinen

In mehreren Publikationen wurde der Einfluss von Koffein auf die Freisetzung von Zytokinen und auch die Lymphozytenproliferation gezeigt ⁵. In Vollblutproben, die mit abgetöteten *S. pneumoniae* stimuliert wurden, konnte eine Reduzierung der Zytokinfreisetzung durch Koffein beobachtet werden ⁴⁵. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte sich in dieser Arbeit nach Stimulation von PBMCs mit LPS, auch bekannt als Endotoxin, ein Bestandteil der

Zellwand von Bakterien, der beim Zerfall dieser freigesetzt wird, eine Reduzierung der TNF- α -Freisetzung um 80% in Anwesenheit von Koffein in einer Konzentration von 1mM.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass auch die Zytokinfreisetzung durch virale Stimuli, wie pppRNA oder dAdT, durch Koffein konzentrationsabhängig reduziert wird (Abb. 3-2, Abb. 3-3, Abb. 3-4).

Der größte Effekt wurde hier bei dAdT gesehen. dAdT kann dabei über zwei verschiedene Mechanismen die Produktion von Interferon induzieren. Einerseits kann AT-reiche DNA von der RNA-Polymerase III in pppRNA transkribiert werden, die dann über RIG-I erkannt wird. Zusätzlich kann doppelsträngige DNA zytoplasmatisch von cGAS erkannt werden und über diesen Signalweg Sting-abhängig Interferon induzieren. Sollte der cGas-Sting Signalweg stärker durch Koffein gehemmt werden oder in den Monozyten und dendritischen Zellen, die innerhalb von PBMCs die Hauptproduzenten von Interferon darstellen, eine wichtigere Rolle für die Interferonproduktion spielen als RIG-I würde dies den stärkeren Effekt von Koffein auf die dAdT-induzierte Interferonproduktion im Vergleich zur pppRNA- oder Poly IC-induzierten Interferonproduktion erklären.

Denkbare mögliche Mechanismen der verminderten IFN α -Freisetzung sind sowohl eine direkte Interaktion von Koffein mit einem Mitglied der Signalkaskade, als auch die wahrscheinlichere Variante einer indirekten Interaktion durch einen *2nd messenger*, wie z.B. cAMP mit einer folgenden PKA Aktivierung oder die Produktion von IL10, wie dies bereits für die hemmende Wirkung auf TNF α beschrieben wurde^{9,14}. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Auch in Zellen, die nicht dem Immunsystem angehören, wie 1205 LU Zellen konnte eine Hemmung der der Zytokinantwort auf mRNA-Ebene beobachtet werden (Abb. 3-5).

Insgesamt scheint der Effekt auf PBMCs wesentlich größer als auf 1205 LU -Zellen, auch wenn die Ergebnisse von qRT-PCR und ELISA nicht direkt vergleichbar sind. Dennoch wäre dieser Effekt durchaus durch die unterschiedliche Ausstattung an Rezeptoren der einzelnen Zellen bzw. Zelllinien eine mögliche Ursache hierfür. Es ist davon auszugehen, dass PDEs und Adenosinrezeptoren in den für die Interferonproduktion verantwortlichen Monozyten und dendritischen Zellen innerhalb der PBMCs anders exprimiert sind, wie in der Melanomzelllinie 1205LU.

4.3.2 Hemmung der Aktivierung des RIG-I-Signalwegs durch Koffein

Die Daten dieser Arbeit deuten an, dass Koffein seine hemmende Wirkung auf die Freisetzung von Zytokinen durch Aktivierung des RIG-I-Signalwegs zwischen TBK1 und IRF3 hat (Abb. 3-6). *Horrigan et al.*¹⁶ konnten zeigen, dass Koffein die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht und über die Aktivierung von der Proteinkinase A (PKA) eine Reduzierung der TNF-Freisetzung bedingt. Der gleiche oder ein ähnlicher Mechanismus ist bei IFN bzw. IP-10 ebenfalls denkbar. Yan et al beschreiben, dass die PKA zu einer Phosphorylierung von MAVS führt, welche in weiteren Schritten zu einem Abbau von MAVS und somit einer Hemmung der Zytokinfreisetzung führt⁵³. Dies würde mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten übereinstimmen, da die Zytokinfreisetzung durch Überexpression von RIG-I und MAVS Koffein gehemmt wird, wobei die Hemmung auf Ebene von RIG-I deutlicher ist, als auf der Ebene von MAVS. Dass auch die durch Überexpression von TBK1 induzierte Zytokinfreisetzung gehemmt wird, könnte durch die komplexe und zweizeitige Interaktion von MAVS und TBK1 die mehrere Adapterproteine involviert erklärt werden^{54,55}. So bedarf die optimale Phosphorylierung von IRF3 durch TBK1 zunächst der Phosphorylierung von MAVS durch TBK1 und der dadurch induzierten Interaktion von MAVS und IRF3⁵⁶. Der PKA-induzierte Abbau von MAVS könnte daher auch ein gewisse Einflussnahme auf die im Signalweg üblicherweise unterhalb von TBK1gesehene IRF3-Aktivierung erklären.

4.3.3 Koffein hemmt die Produktion von Viren

Entgegen der ersten Annahme, dass durch eine Hemmung der Zytokinausschüttung, die Virusreplikation begünstigt sein sollte, stellte sich das Gegenteil heraus. Sowohl für VSV, als auch für EMCV konnte eine Hemmung der Virusproduktion gezeigt werden. Diese Viren entstammen unterschiedlichen Gruppen, VSV gehört zur Gruppe der Rhabdoviren, EMCV zu den Picornaviren. Es ist daher davon auszugehen, dass hier zunächst kein virusspezifischer Effekt vorliegt. Für das Hepatitis C-Virus konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden⁵⁰. Die in den Experimenten verwendeten Konzentrationen waren allerdings um ein Vielfaches höher, als die Blutkonzentrationen, die bei einem physiologischen Kaffeekonsum erreicht werden

Erklärungsansätze für den virostatistischen Effekt von Koffein wurden bereits von mehreren Autoren versucht, eine endgültige Aussage ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht möglich. Es wurden in anderen Publikationen verschiedene Mechanismen vermutet. Eine Möglichkeit wäre der Einfluss von Koffein auf die Apoptose von Zellen, so dass die Wirtszellen schneller in Apoptose gehen und das Virus seinen Wirt verliert. Auch wird vermutet, Koffein könnte durch

direkte Interaktion mit den vorläufigen Viruspartikeln ein Zusammensetzen behindern. Ebenso ist eine Kombination dieser Effekte denkbar ⁵⁰⁻⁵².

5 Zusammenfassung

Koffein ist auf Grund seiner antreibenden und aktivierenden Wirkung auf das Zentralnervensystem die am meisten konsumierte pharmakologische Substanz weltweit. Der Koffein-Konsum ist dabei jedoch zusätzlich mit einer Vielzahl weiterer, weniger gut verstandener Effekte verbunden. Metaanalysen zeigen, dass Kaffee- und Koffein-Konsum das Risiko reduzieren, Brust-, Kolon-, Endometrium- und Prostata-Tumoren, Diabetes Typ II oder Parkinson zu bekommen. Diese auf den ersten Blick sehr unterschiedlichen Erkrankungen teilen sich als pathophysiologisch wichtigen, gemeinsamen Faktor eine unterschwellig vorliegende, chronische Entzündungsreaktion. Es wird daher in der Literatur vermutet, dass Koffein seinen protektiven Effekt über die Modulation von Entzündungsvorgängen bewirken könnte. Hier setzt die vorliegende Arbeit an. In Experimenten unserer Arbeitsgruppe, die Mechanismen der Apoptose-Induktion durch DNA-Viren untersuchte, wurde Koffein als Inhibitor der Proteinkinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) verwendet und damit eine Rolle des DNA-Reparatur-Signalwegs in der Apoptose-Induktion durch zytoplasmatische virale DNA nahegelegt. In noch nicht veröffentlichten Daten aus diesem Projekt zeigte sich in Anwesenheit von Koffein in einigen Experimenten neben der verminderten Apoptose auch eine verminderte Freisetzung von Interferon und inflammatorischen Zytokinen nach einer Infektion mit einem DNA-Virus. Dieser vorläufige Befund sollte in der vorliegenden Arbeit weiterverfolgt werden und der Einfluss von Koffein auf die Zytokinproduktion nach Aktivierung des Immunsystems durch Liganden von Mustererkennungsrezeptoren und Viren untersucht und damit verbundene potentielle Effekte auf die Replikation von Viren analysiert werden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass in PBMCs die *ex vivo* Präinkubation mit Koffein ab Konzentrationen von 50 μM zu einer deutlichen Reduktion der LPS-induzierten TNF- α -Produktion nach 24 h führt. Koffein-Konzentrationen ab 100 μM hemmten zudem die durch Transfektion von dAdT-induzierte Interferon- α Produktion in PBMCs. Dieser hemmende Koffein-Effekt ließ sich, wenn auch etwas weniger deutlich, auch für die durch Transfektion von pppRNA und poly IC induzierte Interferon- α Produktion in PBMC zeigen. Dieser hemmende Effekt von Koffein auf die RLR-induzierte Interferon Typ-I Produktion nach Transfektion von poly IC ließ sich auch in der humanen Melanom Zelllinie 1205lu reproduzieren. In diesem Zellsystem konnte zudem durch Experimente, in denen durch Überexpression von RIG-I, TBK1 und einer konstitutiv-aktiven IRF3 Variante jeweils der RLR-Signalweg aktiviert wurde, gezeigt werden, dass Koffein seinen

hemmenden Einfluss auf den RLR-Signalweg unterhalb oder auf Höhe von TBK1 und oberhalb von IRF3 ausübt. Während diese hemmende Wirkung von Koffein auf den RLR-Signalweg zunächst eine Replikations-fördernde Wirkung von Koffein auf Viren erwarten ließ, zeigten Infektionsexperimente mit den beiden durch RLRs erkannten Modellviren VSV und EMVC in 1205lu Zellen jedoch ab Konzentrationen von 500 μM eine deutliche Reduktion der freigesetzten Viruspartikel im Überstand nach 24 und 48 Stunden.

Der Genuss einer Tasse Kaffee führt zu Koffeinblutspiegeln von 5 bis 10 μM ⁵⁷. Ähnliche Konzentrationen werden durch die Einnahme Koffein-haltiger Grippemittel wie Grippostad erreicht und bei Frühgeborenen, die aufgrund einer Ateminsuffizienz Koffein erhalten, ergeben sich Konzentrationen von bis zu 100 μM ⁵⁷. Damit wird ein Konzentrationsbereich erreicht, in dem die Effekte, die diese Arbeit beschreibt relevant werden können. Auch wenn die Mechanismen, die den beobachteten Effekten zu Grunde liegen, in dieser Arbeit noch nicht aufgeklärt werden konnten, macht dies deutlich, dass weitere Arbeiten zum Verständnis der immunmodulatorischen Wirkung von Koffein erforderlich sind, um die Vor- und Nachteile dieser von vielen täglich konsumierten Substanz besser beurteilen zu können.

6 Referenzen

1. Grosso G, Godos J, Galvano F, Giovannucci EL. Coffee, Caffeine, and Health Outcomes: An Umbrella Review. *Annu Rev Nutr* 2017;37:131-56.
2. Miura K, Hughes MC, Green AC, van der Pols JC. Caffeine intake and risk of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin in an 11-year prospective study. *Eur J Nutr* 2014;53:511-20.
3. Conney AH, Lu YP, Lou YR, Kawasumi M, Nghiem P. Mechanisms of Caffeine-Induced Inhibition of UVB Carcinogenesis. *Front Oncol* 2013;3:144.
4. Paiva C, Beserra B, Reis C, Dorea JG, Da Costa T, Amato AA. Consumption of coffee or caffeine and serum concentration of inflammatory markers: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017:1-12.
5. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol Ther* 2006;111:877-92.
6. Daly JW. Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2153-69.
7. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J Clin Invest* 1990;85:1150-7.
8. Rose FR, Hirschhorn R, Weissmann G, Cronstein BN. Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J Exp Med* 1988;167:1186-94.
9. Knight D, Zheng X, Rocchini C, Jacobson M, Bai T, Walker B. Adenosine A3 receptor stimulation inhibits migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol* 1997;62:465-8.
10. Walker BA, Jacobson MA, Knight DA, et al. Adenosine A3 receptor expression and function in eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:531-7.
11. Polosa R, Ng WH, Crimi N, et al. Release of mast-cell-derived mediators after endobronchial adenosine challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:624-9.
12. Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett* 2007;247:26-39.
13. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, et al. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 1999;59:4375-82.
14. Laska EM, Sunshine A, Mueller F, Elvers WB, Siegel C, Rubin A. Caffeine as an analgesic adjuvant. *JAMA* 1984;251:1711-8.
15. Lipton RB, Diener HC, Robbins MS, Garas SY, Patel K. Caffeine in the management of patients with headache. *J Headache Pain* 2017;18:107.
16. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Int Immunopharmacol* 2004;4:1409-17.
17. Rosenthal LA, Taub DD, Moors MA, Blank KJ. Methylxanthine-induced inhibition of the antigen- and superantigen-specific activation of T and B lymphocytes. *Immunopharmacology* 1992;24:203-17.

-
18. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zwartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999;51:83-133.
 19. Al Reef T, Ghanem E. Caffeine: Well-known as psychotropic substance, but little as immunomodulator. *Immunobiology* 2018;223:818-25.
 20. Eigler A, Siegmund B, Emmerich U, Baumann KH, Hartmann G, Endres S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol* 1998;63:101-7.
 21. Kenneth Murphy PT, Mark Walport. *Janeway's Immunobiology*. 2008;7th Edition.
 22. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* 2012;13:214-22.
 23. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
 24. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:1-13.
 25. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16-34.
 26. McDonald C, Inohara N, Nunez G. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem* 2005;280:20177-80.
 27. Shaw MH, Reimer T, Sanchez-Valdepenas C, et al. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol* 2009;10:1267-74.
 28. Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet* 2005;14:935-41.
 29. Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, et al. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:177-84.
 30. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
 31. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
 32. Schmidt A, Endres S, Rothenfusser S. Pattern recognition of viral nucleic acids by RIG-I-like helicases. *J Mol Med (Berl)* 2011;89:5-12.
 33. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front Immunol* 2014;5:342.
 34. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.
 35. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-5.
 36. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 2009;10:1065-72.
 37. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009;138:576-91.
 38. Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, et al. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity* 2012;36:959-73.

-
39. Chan YK, Gack MU. RIG-I-like receptor regulation in virus infection and immunity. *Curr Opin Virol* 2015;12:7-14.
 40. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2015;15:87-103.
 41. Versteeg GA, Garcia-Sastre A. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol* 2010;13:508-16.
 42. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264:1918-21.
 43. Wenzel M, Wunderlich M, Besch R, et al. Cytosolic DNA triggers mitochondrial apoptosis via DNA damage signaling proteins independently of AIM2 and RNA polymerase III. *J Immunol* 2012;188:394-403.
 44. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:78-81.
 45. van Furth AM, Seijmonsbergen EM, Langermans JA, van der Meide PH, van Furth R. Effect of xanthine derivatives and dexamethasone on *Streptococcus pneumoniae*-stimulated production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-10 by human leukocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:689-92.
 46. Kambayashi T, Jacob CO, Zhou D, Mazurek N, Fong M, Strassmann G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J Immunol* 1995;155:4909-16.
 47. Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol* 1995;7:517-23.
 48. Procopio DO, Teixeira MM, Camargo MM, et al. Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF-alpha and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. *Br J Pharmacol* 1999;127:1195-205.
 49. Modi AA, Feld JJ, Park Y, et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010;51:201-9.
 50. Batista MN, Carneiro BM, Braga AC, Rahal P. Caffeine inhibits hepatitis C virus replication in vitro. *Arch Virol* 2015;160:399-407.
 51. Khalaf N, White D, Kanwal F, et al. Coffee and Caffeine Are Associated With Decreased Risk of Advanced Hepatic Fibrosis Among Patients With Hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:1521-31 e3.
 52. Murayama M, Tsujimoto K, Uozaki M, et al. Effect of caffeine on the multiplication of DNA and RNA viruses. *Mol Med Rep* 2008;1:251-5.
 53. Yan BR, Zhou L, Hu MM, et al. PKACs attenuate innate antiviral response by phosphorylating VISA and priming it for MARCH5-mediated degradation. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006648.
 54. Liu XY, Chen W, Wei B, Shan YF, Wang C. IFN-induced TPR protein IFIT3 potentiates antiviral signaling by bridging MAVS and TBK1. *J Immunol* 2011;187:2559-68.
 55. Fang R, Jiang Q, Zhou X, et al. MAVS activates TBK1 and IKKepsilon through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006720.
 56. Liu S, Cai X, Wu J, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 2015;347:aaa2630.

57. Lee TC, Charles BG, Steer PA, Flenady VJ. Saliva as a valid alternative to serum in monitoring intravenous caffeine treatment for apnea of prematurity. *Ther Drug Monit* 1996;18:288-93.

7 Abkürzungen

AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
bp	<i>base pair</i>
cAMP	Zyklisches Adenonsinmonophosphat
CDT	C-terminale Domäne
cGAMP	<i>cyclic di-GMP-AMP</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP synthase</i>
dAdT	<i>poly(deoxyadenylic-deoxythymidylic) acid</i>
dsRNA	Doppelstrang-RNA
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Encephalomyokarditisvirus
FCS	Fötales Kälberserum
HEK293T	<i>Human Embyonic Kidney 293T</i>
IFNAR	<i>Interferon-α/β receptor</i>
IFN α	Interferon α
IFN β	Interferon β

IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IRF	<i>IFN-regulatory-factors</i>
ISG	Interferoninduzierten Gene
LGP2	<i>laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAVS	<i>mitochondrial anti-viral signalling</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation antigen 5</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen
PDE	Phosphodiesterase
PFU	<i>Plaque-Forming-Unit</i>
poly IC	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PKA	Proteinkinase A
pppRNA	Triphosphat-RNA

PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RIG-I	<i>retionic acid inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I-like Receptors</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STING	<i>stimulator for IFN genes</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRIM25	<i>tripartite motif-containing protein 25</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>

8 Danksagung

Meine Promotionsarbeit wäre ohne die Hilfe einer großen Zahl von Unterstützern nicht möglich gewesen. Mein größter Dank gilt den Betreuern meiner Doktorarbeit Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß und Dr. rer. nat. Andreas Schmidt, die allzeit bei Fragen ein offenes Ohr und stets die richtigen motivierenden Worte parat hatten, sowie allzeit mit viel Geduld zur Seite standen.

Herr Prof. Dr. med. Stefan Endres war als Leiter der Abteilung für klinische Pharmakologie verantwortlich für eine großartige Atmosphäre des kollegialen Miteinanders. Das Helfen untereinander und der wissenschaftliche sowie persönliche Austausch war ihm stets ein großes Anliegen und wurde in der Abteilung von ihm vorgelebt.

Auch meinen Mitstreitern Michael Wunderlich, Friederike Saathoff, Stefanie Liedtke, Johannes Rapps, Simone Willms, und natürlich allen anderen innerhalb der klinischen Pharmakologie, ganz besonders Peter Düwell, möchte ich für die großartige und lehrreiche Zeit danken.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Ehefrau sowie meiner Familie, die mich vor allem in der Phase des Schreibens immer wieder mit Rat und Tat unterstützt haben.