

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

## **Analyse des pro-inflammatorischen Potenzials von modifizierten Adenosin-Nukleosiden**

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

vorgelegt von  
Alexander Jarosch  
aus Landshut  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Jürgen Schuber

Prof. Dr. Fritz Krombach

Mitbetreuung durch

promovierte Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Christian Hotz

Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2014

Meiner Familie

# Inhalt

1. Fragestellung.....	1
2. Einleitung .....	3
2.1. Das menschliche Immunsystem .....	3
2.2. Die Entzündungsreaktion als Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems .....	4
2.3. Interleukin-1 $\beta$ .....	5
2.4. Die Erkennung von Gefahrensignalen.....	6
2.5. <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	7
2.5.1. Toll- <i>like</i> -Rezeptoren.....	10
2.5.2. NOD- <i>like</i> -Rezeptoren und Inflammasome .....	12
2.5.2.1. Aufbau und Funktion eines Inflammasoms .....	12
2.5.2.2. Aktivierung und Signalkaskade eines Inflammasoms.....	13
2.6. Adenosin als endogener Modulator des Immunsystems.....	15
2.7. Adenosinrezeptoren .....	17
2.7.1. Aufbau und Klassifikation.....	17
2.7.2. Adenosinrezeptoren als Modulatoren inflammatorischer Prozesse.....	17
2.8. Modifizierte Adenosine .....	19
2.9. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe .....	21
3. Material und Methoden .....	23
3.1. Material .....	23
3.1.1. m2A, m6A und Adenosin .....	23
3.1.2. Technische Ausstattung.....	23
3.1.3. Chemikalien und Puffer.....	23
3.1.4. Zellkulturmateriel und Medien .....	24
3.1.5. Stimulanzien und Inhibitoren .....	25
3.1.6. Reagenziensätze .....	25
3.1.7. FACS-Antikörper.....	25

3.1.8. Plasmide .....	26
3.1.9. Primer .....	26
3.1.10. Bakterienstämme.....	27
3.2. Zellulär-immunologische Methoden.....	27
3.2.1. Zellisolation und Kultur .....	27
3.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen .....	27
3.2.1.2. Isolierung von Knochenmarkzellen und Splenozyten.....	27
3.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	28
3.2.1.4. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung.....	28
3.2.2. Stimulationsversuche.....	29
3.2.3. Bakterielle Infektionsversuche .....	30
3.2.4. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	30
3.2.5. Durchflusszytometrie.....	31
3.2.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip.....	31
3.2.5.2. Bestimmung von Oberflächenmolekülen.....	32
3.2.5.3. Determinierung der CD11b intermediären Zellpopulation .....	32
3.3. Molekularbiologische Methoden .....	33
3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion .....	33
3.3.1.1. Allgemeines Funktionsprinzip.....	33
3.3.1.2. PCR zur Klonierung .....	34
3.3.1.3. Colony PCR .....	35
3.3.2. DNA – Aufreinigung und –Restriktion .....	35
3.3.3. Generierung von <i>knock-out</i> - DNA .....	35
3.3.4. Gelelektrophorese.....	36
3.4. Mikrobiologische Methoden.....	37
3.4.1. Allgemeine Kulturbedingungen .....	37
3.4.2. Elektrotransformation von Bakterienzellen.....	37
3.4.2.1. Erstellung elektrokompetenter Zellen .....	37

3.4.2.2.	Transformation mittels Elektroporation .....	38
3.4.3.	Erzeugung von Stammkulturen.....	38
3.4.4.	Chromosomaler Gen- <i>knock-out</i> .....	38
3.5.	Statistische Analyse.....	39
4.	Ergebnisse .....	40
4.1.	m2A stimuliert Gr-1 positive und CD11b intermediäre <i>responder</i> -Zellen.....	40
4.1.1.	<i>Responder</i> -Zellen exprimieren das Oberflächenantigen Gr-1.....	40
4.1.2.	m2A stimuliert CD11b-intermediäre Zellen und verstärkt die Expression des Moleküls .....	43
4.2.	m2A wirkt auf Adenosinrezeptoren und vermittelt eine NLRP3-unabhängige IL-1 $\beta$ -Sekretion.....	46
4.2.1.	Immunstimulation durch m2A erfolgt unabhängig vom P2X7-Rezeptor oder dem NLRP3-Inflammasom .....	46
4.2.2.	Adenosin und m2A unterscheiden sich im Verhalten an den Rezeptoren A <sub>1</sub> und A <sub>2a</sub> .....	47
4.2.3.	Adenosin und m2A gleichen sich unter Inhibition der einzelnen Rezeptoren an.....	50
4.3.	Methyltransferase yfiF vermittelt Immunogenität von Bakterien .....	53
4.3.1.	Generierung von Methyltransferasen-defizienten <i>knock-out</i> -Bakterien .....	53
4.3.2.	Infektion mit <i>E. coli</i> $\Delta$ yfiF bewirkt geringere Interleukin-Ausschüttung .....	57
4.3.3.	IL-1 $\beta$ -Ausschüttung ist eine NLRP3-abhängige Reaktion auf lebende Bakterien.....	59
5.	Diskussion .....	62
5.1.	m2A als immunstimulatorisches Molekül .....	62
5.2.	m2A aktiviert undifferenzierte myeloide Zellen.....	63
5.2.1.	<i>Responder</i> -Zellen exprimieren Gr-1 und eine intermediäre Anzahl an CD11b ...	63
5.2.2.	<i>Responder</i> -Zellen entspringen der myeloiden Zelllinie .....	64
5.3.	m2A wirkt auf verschiedene Adenosinrezeptoren .....	67
5.3.1.	Aktivierung von Adenosinrezeptoren verändert die Zytokinsekretion von Immunzellen .....	67

5.3.2.     Immunmodulatorische Wirkung der veränderten Zytokinproduktion .....	68
5.3.2.1.     Adenosinrezeptor A <sub>2a</sub> .....	68
5.3.2.2.     Adenosinrezeptor A <sub>1</sub> .....	70
5.3.2.3.     Adenosinrezeptor A <sub>3</sub> .....	70
5.3.2.4.     Adenosinrezeptor A <sub>2b</sub> .....	71
5.3.3.     m2A wirkt verstärkt über die Rezeptoren A <sub>2a</sub> und A <sub>2b</sub> .....	72
5.4.     m2A als Erkennungsstruktur für bakterielle Infektionen.....	74
5.4.1.     Wirkungsweise der verschiedenen Methyltransferasen.....	75
5.4.2.     RNA und deren Modifikationen als Erkennungsstrukturen für Immunrezeptoren .....	75
5.4.3.     IL-1 $\beta$ -Sekretion ist eine Reaktion auf lebende Bakterien .....	77
5.4.4.     Kann eine Erkennung von m2A zu einer NLRP3 unabhängigen Aktivierung von Caspase-1 führen? .....	77
5.5.     Offene Fragen und Ausblick .....	80
6.     Zusammenfassung .....	82
7.     Anhang .....	84
7.1.     Abbildungsverzeichnis.....	84
7.2.     Abkürzungsverzeichnis.....	86
7.3.     Literaturverzeichnis.....	88

## 1. Fragestellung

Die alles entscheidende Frage bei der Initiation einer Entzündungsreaktion ist stets die nach der Differenzierung zwischen gefährlichen und ungefährlichen Molekülen. Die zahlreichen Zellen unseres Immunsystems, welche wiederum mit einem riesigen Arsenal verschiedener Erkennungsrezeptoren ausgestattet sind, bewerkstelligen diese Unterscheidung äußerst präzise: In einem gesunden Organismus reagieren sie trotz der ungeheuren Vielfalt der sie umgebenden Stoffe nur auf pathogene Moleküle mit einer inflammatorischen Antwort.

Eine Beteiligung von Adenosin an diversen Entzündungsreaktionen ist hierbei bekannt, auch wenn seine Effekte und die exakte Wirkung der einzelnen Adenosinrezeptoren letztlich noch nicht vollständig verstanden sind. Ebenso sind bereits vor längerer Zeit verschiedene Modifikationen von Adenosin in Nukleinsäuren beschrieben worden. So führte zum Beispiel die Erkenntnis, dass diese Modifikationen die Genexpression und Proteintranskription beeinflussen können, erst kürzlich zur Begründung eines neuen Forschungsfeldes, welches den Überbegriff „RNA-Epigenetik“ erhielt (He, 2010)

In Bezug auf die immunologische Bedeutung von Adenosinmodifikationen richtete sich der Fokus der meisten Studien auf den zelleigenen RNA-Metabolismus und die immunosuppressive Wirkung von Nukleosidmodifikationen (Gehrig et al., 2012; Kariko et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnte Dr. Christian Hotz in unserer Forschungsgruppe nicht nur zeigen, dass sich verschiedene Adenosinmodifikationen in ihrer immunologischen Wirkung unterscheiden, sondern auch, dass einzelne modifizierte Moleküle Immunzellen zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen anregen und somit potenziell immunostimulatorisch wirken können. Interessanterweise unterscheiden sich die Modifikationen dabei nicht nur in ihrem stimulatorischen Verhalten, sondern auch in ihrem Vorkommen in menschlicher und bakterieller RNA. Somit stellte sich im Vorfeld dieser Arbeit die spannende Frage, ob es sich bei den Adenosinmodifikationen um ein weiteres Merkmal handeln könnte, welches unseren Immunzellen eine Unterscheidung zwischen „Selbst und ungefährlich“ und „Fremd und gefährlich“ ermöglicht.

Die im Zentrum dieser Promotionsarbeit stehende Hypothese postuliert demnach, dass bestimmte Adenosinmodifikationen ein Erkennungsmerkmal für Immunzellen darstellen und diese das Vorhandensein bakterieller Erreger anzeigen können. Dies würde das bisherige Wissen von Nukleosidmodifikationen um eine zusätzliche Facette erweitern und modifizierte Adenosine als eine neuartige Erkennungsstruktur für Immunrezeptoren darstellen.

Um dieser innovativen Hypothese Substanz zu liefern, sollte in der vorliegenden Arbeit daher die ausschließlich bakteriell vorkommende Adenosinmodifikation 2-Methyl-Adenosin (m<sub>2</sub>A) erstmals hingehend ihres immunstimulatorischen Potentials und ihres immunologischen Verhaltens untersucht werden.

Hierbei sollte im ersten Teil der Arbeit zunächst untersucht werden, ob m<sub>2</sub>A Immunzellen zur Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  stimuliert und welche Zellen auf eine derartige Stimulation reagieren. In weiteren Experimenten sollte anschließend nach dem mit m<sub>2</sub>A interagierendem Rezeptor und dem zur IL-1 $\beta$ -Ausschüttung führendem Signalweg gesucht werden. Besonders im Fokus sollte hierbei eine mögliche Caspase-1-Aktivierung durch einen Inflamasomkomplex stehen. Im abschließenden Teil dieser Arbeit sollte ein Rückschluss von den Ergebnissen mit den einzelnen synthetisch hergestellten Molekülen auf das immunologische Verhalten von Adenosinmodifikationen in vollständiger bakterieller RNA ermöglicht werden. Hierfür sollte untersucht werden, inwieweit die Methylierungen bakterieller RNA klinisch eine Rolle spielen und ob sich Immunzellen nach einer Infektion durch Bakterien mit unmethylierter RNA anders als nach einer Infektion mit normalen Wildtypbakterien verhalten.

## 2. Einleitung

### 2.1. Das menschliche Immunsystem

Im alltäglichen Leben ist der Mensch als Organismus konstant verschiedenen Krankheitserregern ausgesetzt. Um dennoch das unbeeinträchtigte Funktionieren des Körpers aufrecht erhalten zu können, bedarf es einiger besonderer Mechanismen welche uns im Rahmen des Immunsystems bereitgestellt werden und es uns ermöglichen, der täglichen Bedrohung durch die zahlreichen Mikroorganismen unserer Umwelt trotzen können.

Als erste Schutzeinrichtung dieses mehrschichtigen Systems fungieren unsere Haut und Schleimhäute. Sie verhindern als physikalische Barriere das Eindringen von Krankheitserreger in unseren Organismus. Zusätzlich werden an manchen Oberflächenepithelien antimikrobiell wirkende Stoffe sezerniert, welche als chemische Barriere wirken können, so wie die in Tränenflüssigkeit und Speichel enthalten antibakteriellen Enzyme Phospholipase A und Lysozym. (Williams, 2011)

Auch für den Fall dass Krankheitserreger diese Epithelbarriere überwinden können liefert uns das Immunsystem ein breites Repertoire an Möglichkeiten zur Bekämpfung der Erreger, wobei grundsätzlich zwischen den Mechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems unterschieden werden muss. Das angeborene Immunsystem stellt dabei das evolutionär ältere System dar, welches für die erste und somit kurzfristige Reaktion auf eine Infektion verantwortlich ist. Das adaptive Immunsystem hingegen ist ein hochspezialisiertes System, über welches ausschließlich höher entwickelte Vertebraten verfügen. Es entfaltet seine Hauptwirkung wenn das angeborene Immunsystem nicht in der Lage ist eine Infektion initial zu verhindern oder einzudämmen und stellt damit zwar eine verzögerte, jedoch höchst effektive Abwehrreaktion dar. (Murphy et al., 2009)

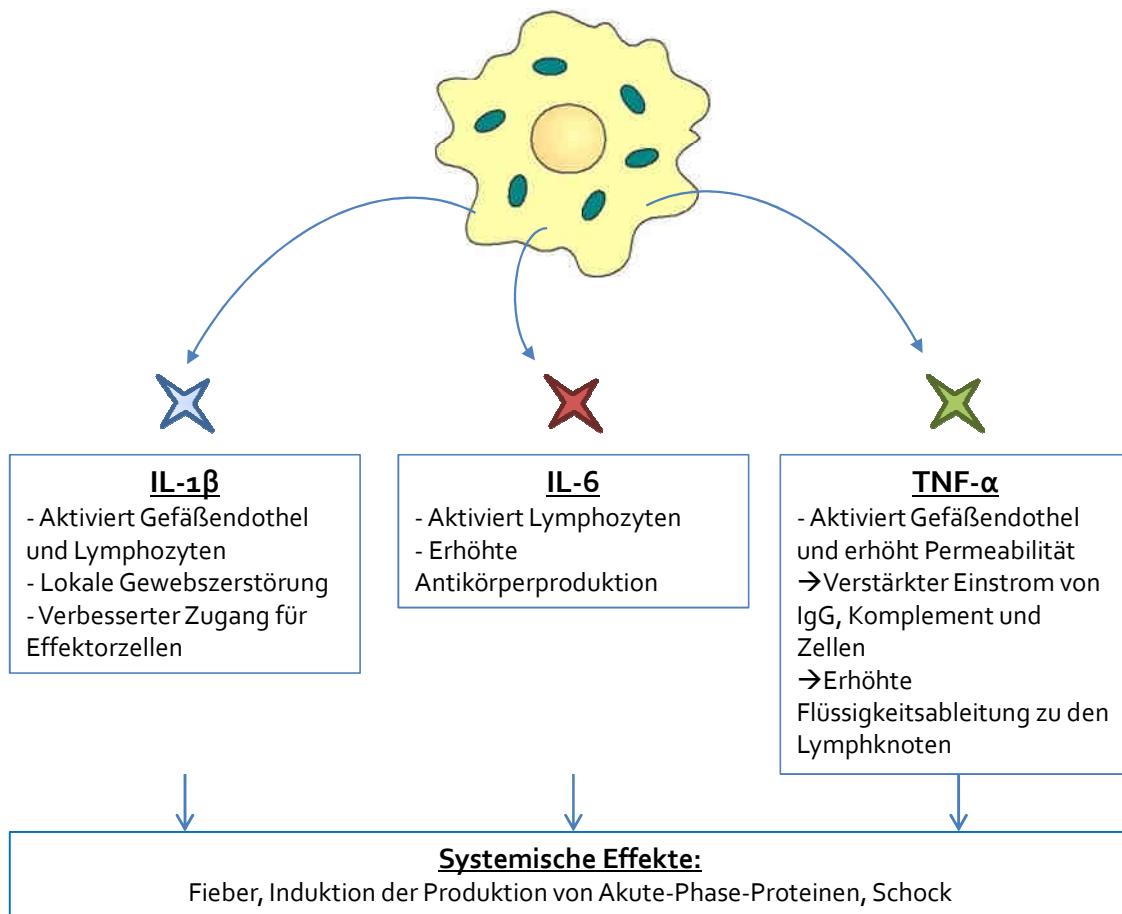
Zusammen bieten uns diese unterschiedlichen Schichten des Immunsystems einen optimalen Schutz gegen potentiell infektiöse Mikroorganismen und ermöglichen es dadurch die Integrität des menschlichen Organismus aufrecht zu erhalten.

## 2.2. Die Entzündungsreaktion als Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems

Wenn Krankheitserreger die natürliche physikalische und chemische Barriere der Oberflächenepithelien überwunden haben, treffen sie zunächst auf die Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie bilden die erste Verteidigungsline gegen die eindringenden Keime. An vorderster Front stehen hierbei die im Blut zirkulierenden Monozyten und die daraus entstehenden Makrophagen. Sie sind befähigt, die Fremdorganismen zu erkennen und mittels Phagozytose zu internalisieren. In der Folge werden die aufgenommenen Erreger zerstört und die Zellen beginnen Proteine zu sezernieren, welche das Vorhandensein von pathogenen Keimen anzeigen und eine Entzündungsreaktion initiieren. Proteine, die weitere Abwehrzellen rekrutieren bezeichnet man dabei als Chemokine und solche, die andere Immunzellen aktivieren als Zytokine.

Zytokine sind demnach immunmodulatorische Proteine, die von Immunzellen auf einen Aktivierungsreiz hin ausgeschüttet werden und den weiteren Ablauf der Entzündungsreaktion beeinflussen. Die sezernierte Menge und der Anteil eines einzelnen Zytokins richten sich dabei nach der aktivierte Zellart und dem aktivierenden Agens. Makrophagen als Initiator der Entzündungsreaktion sekretieren eine strukturell heterogene Gruppe an Proteinen, zu denen die Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-12 und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), sowie das Chemokin CXCL8 (früher IL-8) gehören. Gemeinsam vermitteln diese proinflammatorischen Zytokine am Ort der Entzündung verschiedene lokale Effekte, wie zum Beispiel eine Aktivierung von Lymphozyten oder eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, was zusammen mit dem Lockstoff CXCL8 zur verstärkten Einwanderung von Immunzellen führt. Neben diesen lokalen Reaktionen vermitteln sie aber auch systemische Effekte wie Fieber oder die Auslösung einer Akute-Phase-Reaktion in der Leber. (Murphy et al., 2009)

Eine Übersicht über die Effekte der genannten Zytokine gibt **Abb. 1**, wohingegen im folgenden Abschnitt genauer auf IL-1 $\beta$  eingegangen werden soll, da es als proinflammatorisches Zytokin in dieser Arbeit als repräsentatives Maß für eine Entzündungsreaktion herangezogen wurde.



**Abb. 1** Überblick über die wichtigsten von aktivierten Makrophagen sezernierten Zytokine und Chemokine

Nach dem Kontakt mit potentiellen Krankheitserregern kommt es zu einer Aktivierung von Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen, welche darauf hin beginnen proinflammatorische Zytokine und Chemokine auszuschütten. Dies initiiert lokal eine Entzündungsreaktion, welche durch neue einwandernde Zellen weiter verstärkt wird. Systemisch führen die Zytokine zur Induktion von Akute-Phase-Proteinen, Fieber und können zu Schockzuständen bis hin zum SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) führen. Modifiziert nach Janeway Immunologie, 7. Auflage, 2009

### 2.3. Interleukin-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  ist ein Mitglied der IL-1-Superfamilie, wozu auf Grund ihrer homologen Strukturen und ihrer gemeinsamen Wirkungsweise auch IL-1 $\alpha$ , IL-18, IL-33 und IL-1RA gezählt werden (Dinarello, 2009). In dieser Gruppe ist IL-1 $\beta$  ein essentielles proinflammatorisches Zytokin, das verschiedene Wirkungen auf unterschiedlichste Zelltypen vermittelt. In der akuten Phase der Entzündung bewirkt seine Ausschüttung sowohl lokale als auch systemische Effekte. Die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber ist auf die Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  angewiesen. Weiterhin gelangt IL-1 $\beta$  als endogenes Pyrogen über den Blutstrom zum Gehirn und bewirkt dort eine Erhöhung des Temperatursollwertes am Hypothalamus, was zur Entstehung von Fieber führt. An Endothelzellen bewirkt es eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen, was

zusammen mit der Wirkung anderer Zytokine und Chemokine das Einwandern von Immunzellen begünstigt. Ebenso ist bekannt, dass IL-1 $\beta$  auf Grund seiner vasodilatierenden Wirkung zu einer Hypotension führen, sowie ferner die Schmerzempfindlichkeit von Nozizeptoren steigern kann. Seine proinflammatorische Wirkung wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass IL-1 $\beta$  einen fördernden Einfluss auf die Proliferation und Ausdifferenzierung von Immunzellen im Knochenmark nimmt. (Dinarello, 1997, 2010)

Entsprechend diesen inflammationsfördernden Eigenschaften wird IL-1 $\beta$  hauptsächlich von Immunzellen wie Monozyten, Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen produziert, jedoch sind auch andere Zelltypen wie zum Beispiel Endothelzellen dazu befähigt IL-1 zu bilden (Feldmeyer et al., 2010). Gemeinsam ist diesen Zellen, dass die Produktion und Sekretion des Zytokins strengen Regulationsmechanismen unterliegen muss, da eine Fehlregulation und übermäßige Sekretion als mögliche Ursache einer großen Palette an diversen inflammatorischen Erkrankungen angesehen wird (Dinarello, 2011). Im Rahmen von bakteriellen Erkrankungen spielt dabei eine spezielle Eigenschaft der Immunzellen eine ganz besondere Rolle, nämlich die Fähigkeit gefährliche Krankheitserreger zu erkennen und diese von ungefährlichen, körpereigenen Zellen zu unterscheiden.

## 2.4. Die Erkennung von Gefahrensignalen

Die Erkennung von potentiellen Krankheitserregern wird von den Zellen des angeborenen Immunsystems bewerkstelligt. Sie sind in der Lage evolutionär-konservierte Strukturen von Pathogenen zu erkennen, welche erstmals von Charles Janeway als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) beschrieben wurden (Janeway, 1989). Erkannt werden diese Strukturen durch bestimmte Rezeptoren der Immunzellen, sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs). Da die PAMPs ausschließlich auf körperfremden Pathogenen - und nicht auf körpereigenen Zellen - vorkommen, ermöglichen die Rezeptoren der Immunzellen eine Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ (Akira et al., 2006).

Die Beobachtung, dass Entzündungsreaktionen jedoch nicht nur in Folge einer bakteriellen Infektion ablaufen, sondern unter anderem auch durch verletzte oder nekrotische Zellen ausgelöst werden kann, führte dazu, dass diese strikte Unterscheidung überdacht werden musste. Mit der Erkenntnis, dass nicht nur exogene, sondern auch endogene Signale zu einer inflammatorischen Reaktion führen können, war es erstmals Polly Matzinger, die im Rahmen ihrer „danger theory“ postulierte, dass neben den klassischen PAMPs auch weitere Strukturen dazu in der Lage sind, Immunzellen zu stimulieren (Matzinger, 1994). Obwohl diese Theorie

ursprünglich für das adaptive Immunsystem aufgestellt wurde, fanden sich bis zum heutigen Zeitpunkt zahlreiche immunstimulatorische Moleküle, welche das angeborene Immunsystem aktivieren und unter dem Begriff *alarmins* oder *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) zusammengefasst werden (Bianchi, 2007). Zu diesen immunstimulatorischen DAMPs zählen Moleküle, die bei diversen Erkrankungen vorkommen, wie zum Beispiel Urat- (Shi et al., 2003) oder Cholesterolkristalle (Dewell et al., 2010), aber auch natürlich vorkommende endogene Moleküle wie Hitzeschockproteine (Schmitt et al., 2007) oder IL-1 $\alpha$  (Werman et al., 2004). Eine potentielle Noxe stellt auch der Untergang von Zellen, beispielsweise bei nekrotischen Vorgängen, dar. Bei dieser Art von Zelltod gelangen großen Mengen von eigentlich intrazellulären Nukleotiden (wie ATP) oder Nukleosiden (wie Adenosin) unkontrolliert in den extrazellulären Raum. In diesem Milieu können nun auch diese Substanzen ein Gefahrensignal darstellen und als DAMP fungieren (Zeh et al., 2005).

Die Unterscheidung zwischen gefährlichen und ungefährlichen Molekülen ist somit ein essentieller Mechanismus im Rahmen einer Immunreaktion und ist entscheidend dafür, dass diese nur auf sinnvolle Reize hin abläuft. Eine Störung dieser Diskriminierung kann zu überschießenden Entzündungsreaktionen führen, was häufig als Ursache von Autoimmunerkrankungen oder Allergien angenommen wird (Medzhitov, 2008). Anhand dessen wird nicht nur deutlich wie wichtig diese Unterscheidung für ein korrektes Ablauen von Entzündungsreaktionen ist, sondern auch wie spezifisch die jeweiligen PRRs die entsprechenden Gefahrensignale erkennen müssen.

## 2.5. *Pattern-recognition-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems*

Auf Grund der Vielfalt an Krankheitserregern und Gefahrensignalen ist es nötig, dass auch die Zellen des angeborenen Immunsystems ein breit gefächertes Arsenal an Erkennungsrezeptoren besitzen. Beispielsweise unterscheiden sich in den Organismus eingedrungene Bakterien in Struktur und Verhalten von Viren. Dennoch müssen Immunzellen in der Lage sein, beide Gefahren unmittelbar zu erkennen und die nötigen Gegenmaßnahmen zu initiieren. Hierfür steht ihnen ein breites Spektrum an sowohl oberflächlichen als auch zytosolischen PRRs zur Verfügung. (Kumar et al., 2011)

Mittlerweile sind fünf verschiedene Klassen der PRR-Familie bekannt. Dazu zählt man neben den Toll-*like*-Rezeptoren (TLRs) auch *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) -*like* Rezeptoren (NLRs), RIG-I-*like* Helikasen (RLHs), C-Typ Lektin Rezeptoren (CLRs) und den Rezeptor für *advanced glycation end products* (RAGE). Ihnen gemeinsam ist, dass sie für die

Erkennung von PAMPs und DAMPs verantwortlich sind und bis auf wenige NLRs mit einer Hochregulation der Transkription von Genen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, reagieren. Zwar unterscheiden sich die Expressionsmuster der induzierbaren Gene zwischen den verschiedenen PRRs, dennoch kodieren sie alle für proinflammatorische Zytokine, Chemokine, antimikrobielle Proteine oder Moleküle, welche die Signalkaskaden der PRRs beeinflussen. Den entscheidenden Stimulus für den nachfolgenden Signalweg und die daraus resultierenden Zytokine stellt allerdings die Aktivierung der PRRs mit ihren jeweiligen Liganden dar. Beispielsweise werden RNA-Viren, welche die Wirtszellen infiziert haben von den zytosolischen RLHs erkannt, wobei ihnen die virale RNA als Ligand und somit als Erkennungsstruktur dient, wohingegen die Erkennung bakterieller Strukturen bisher eher den TLRs zugeschrieben wurde. (Kvarnhammar et al., 2012; Takeuchi et al., 2010)

Zu den RLH zählt man die drei Rezeptoren RIG-I, MDA-5 und LGP2. Sie detektieren alle virale RNA, jedoch unterscheiden sich deren Liganden in ihren spezifischen Eigenschaften. Neben der Theorie, dass RIG-I und MDA-5 dsRNA unterschiedlicher Länge detektieren (Kato et al., 2008), wird dies besonders darin deutlich, dass unterschiedliche Klassen von Viren entweder von RIG-I oder von MDA-5 erkannt werden. Bei einer Infektion mit bestimmten Viren wie dem Dengue oder West Nil Virus hingegen werden zur Generierung einer echten Immunreaktion wiederum beide Helikasen benötigt (Kato et al., 2006; Loo et al., 2008). In jedem Fall führt jedoch die Stimulation einer dieser Helikasen in einer gemeinsamen Endstrecke der Signalkaskade zu einer Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferonen (Takeuchi et al., 2010), welche sowohl infizierte als auch gesunde Zellen in einen antiviralen Status versetzen (Kumar et al., 2011).

Zu den weiteren Aufgaben der PRRs zählt auch die Erfassung von mikrobieller DNA von Bakterien oder Viren. Mittlerweile sind neben TLR9 noch einige weitere an der DNA-Erkennung beteiligte Rezeptoren bekannt, welche sich jedoch nur schwer zu einer einheitlichen Gruppe zusammenfassen lassen. Die bekanntesten hierunter sind wahrscheinlich der *DNA-dependent activator of interferon (IFN)-regulatory factors* (DAI), der als erster dsDNA detektierender Rezeptor entdeckt wurde, sowie *absent in melanoma 2* (AIM2), ein zytosolischer Rezeptor, der neben der Produktion von antiviralen Interferonen auch dazu in der Lage ist über die Bildung eines Inflammasomkomplexes die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 zu synthetisieren (Sharma et al., 2011).

Als weitere Klassen an PRR zählen die TLRs und die NLRs. Die membrangebundenen TLRs können unterschiedliche mikrobielle Pathogene, wie Mykobakterien, Bakterien, Viren und Parasiten erkennen. Die NLRs hingegen befinden sich im Zytosol und interagieren mit einer

großen Palette an verschiedenen Liganden, wobei einige von ihnen nach der Stimulation ähnlich wie AIM2 inflammatorische Proteinkomplexe, sogenannte Inflammasome, bilden. Da diese Rezeptorklassen ebenso wie die Inflammasom-bedingte Prozessierung von IL-1 $\beta$  für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, soll auf sie im Folgenden gesondert eingegangen werden. **Tab. 1** hingegen gibt eine allgemeine Übersicht über die wichtigsten PRRs und ihre Liganden.

PRR	Lokalisation	Ligand	Ursprung des Liganden
<b>TLR</b>			
TLR1	Plasmamembran	Triacyl-Lipoprotein	Bakterien
TLR2	Plasmamembran	Lipoprotein	Bakterien, Viren, Parasiten
TLR3	Endolysosom	dsRNA	Viren
TLR4	Plasmamembran	LPS	Bakterien, Viren
TLR5	Plasmamembran	Flagellin	Bakterien
TLR6	Plasmamembran	Diacyl-Lipoprotein	Bakterien, Viren
TLR7 (human TLR8)	Endolysosom	ssRNA	Viren, Bakterien
TLR9	Endolysosom	CpG-DNA	Viren, Bakterien, Protozoen
TLR11	Plasmamembran	<i>Profilin-like molecule</i>	Protozoen
<b>RLH</b>			
RIG-I	Zytoplasma	kurze dsRNA, 5' Triphosphat dsRNA	RNA Viren, DNA Viren
MDA5	Zytoplasma	lange dsRNA	RNA Viren
LPG2	Zytoplasma	unbekannt	RNA Viren
<b>NLR</b>			
NOD1	Zytoplasma	iE-DAP	Bakterien
NOD2	Zytoplasma	MDP	Bakterien
NLRP1	Zytoplasma	MDP	Bakterien
NLRP3	Zytoplasma	u.a. Kristalline Strukturen, ATP, RNA, UV-Licht	Fungi, Bakterien, Viren, endogene Moleküle
NLRC4	Zytoplasma	Flagellin	Bakterien
<b>Andere</b>			
AIM2	Zytoplasma	dsDNA	Bakterien, Viren
DAI	Zytoplasma	dsDNA	Bakterien, Viren
Dektin-1	Plasmamembran	$\beta$ -Glucan, Zymosan	Fungi
RAGE	Plasmamembran	HMGB1	endogene Moleküle

Tab. 1 Übersicht über die verschiedenen PRRs, ihre Lokalisation und ihre Liganden

(Kumar et al., 2011; Kvarnhammar et al., 2012; Takeuchi et al., 2010)

### 2.5.1. Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren waren die ersten PRRs, welche entdeckt wurden. Sie sind evolutionär hoch-konservierte Transmembranproteine, welche ihren Namen der strukturellen Homologie zum erstmals in der *Drosophila*-Fliege entdeckten Toll-Rezeptor verdanken (Anderson, 2000).

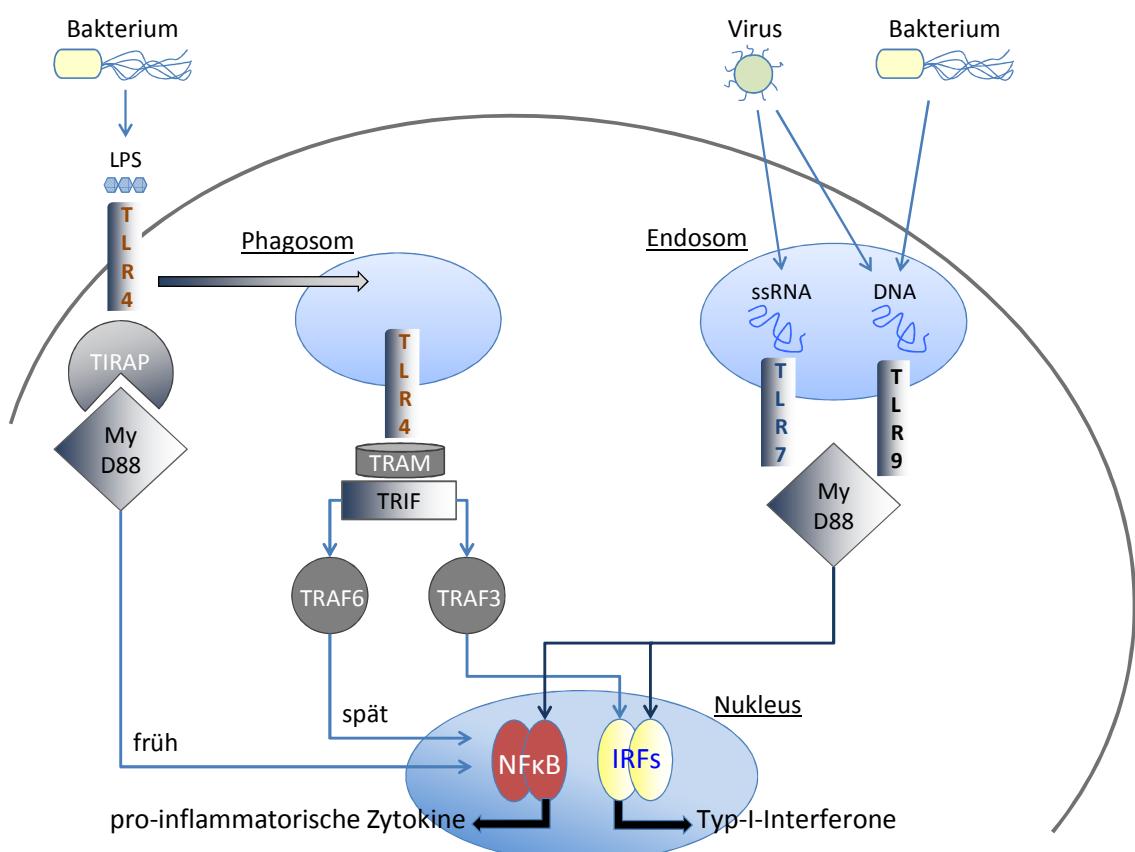
Zum heutigen Zeitpunkt sind 10 humane und 12 murine Subtypen an TLRs bekannt. Sie sind Proteine mit einer Leucin-reichen Ektodomäne, welche für die PAMP Erkennung verantwortlich ist, einer transmembranären Region und einem intrazellulären Toll-IL-1 Rezeptor (TIR), welcher durch Rekrutierung weiterer Proteine die *downstream*-Signalkaskade aktiviert. Exprimiert werden sie entweder auf der Zelloberfläche oder in der Membran von intrazellulären Vesikeln (Kawai et al., 2011).

Wie bereits erwähnt ist jeder TLR für die Erkennung spezifischer PAMPs von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten zuständig. Je nach Lokalisation und Zuständigkeitsbereich werden hierbei verschiedene Signalkaskaden genutzt, was letzten Endes immer in einer erhöhten Transkription von antimikrobiellen Proteinen mündet. Die im Endosom befindlichen TLR7 und TLR9 zum Beispiel sind ähnlich den RLHs für die Erkennung von Viren verantwortlich, weswegen sie neben der klassischen NF-κB-abhängigen Zytokinproduktion in bestimmten Zellen (pDCs) über einen weiteren Signalweg verfügen. Dieser führt über die Rekrutierung mehrerer Adapterproteine zur Hochregulation des Transkriptionsfaktors IRF7 und löst durch die damit verbundene Ausschüttung von Interferonen eine antivirale Immunreaktion aus. (Meylan et al., 2006)

Als bekanntester Vertreter der oberflächlichen TLRs hingegen galt lange Zeit TLR4. Er wurde von Janeway und seinen Mitarbeitern zwar bereits im Jahr 1997 identifiziert (Medzhitov et al., 1997), jedoch war es letztendlich Poltorak der ein Jahr später seine immense Bedeutung für das angeborene Immunsystem belegen konnte. Ihm gelang es nämlich Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien, als Liganden für TLR4 zu beschreiben und zu zeigen, dass durch diese Interaktion die Immunreaktion im Rahmen einer Sepsis vermittelt wird (Poltorak et al., 1998a; Poltorak et al., 1998b). Heute weiß man, dass TLR4 nicht nur an der Oberfläche und gegen Bakterien wirkt, sondern zusätzlich im Endosom aktiviert werden kann und durch die Bindung viralen Hüllproteine an der Detektion von Viren wie dem H5N1 Influenzavirus beteiligt ist (Imai et al., 2008).

Möglich ist dies dadurch dass TLR4 als einziger TLR vier Adapterproteine und zwei verschiedene Signalwege nutzen kann, den klassischen „MyD88-abhängigen“ oder den „TRIF-

abhängigen“ Weg. An der Zelloberfläche rekrutiert TLR4 nach LPS-Stimulation das Adapterprotein TIRAP, welches die Plasmamembran durchwandern kann somit die Brücke zwischen TLR4 und MyD88 schlagen kann (Barton et al., 2009). MyD88 wiederum rekrutiert weitere Proteine wie IRAKs, TRAF6, und den TAK1 Komplex, was zu einer frühen NF- $\kappa$ B Aktivierung und Zytokinproduktion führt (Kawai et al., 2010). Anschließend wird TLR4 mittels Endozytose internalisiert und bildet innerhalb dieser Vesikel einen Komplex mit TRAM und TRIF (Barton et al., 2009). Dieser Komplex ist in der Lage sowohl TRAF3, als auch TRAF6 zu binden, was in erstem Fall über die Hochregulation des Transkriptionsfaktors IRF3 zur Bildung von Typ-1 Interferonen (Barton et al., 2009), in letzterem Fall über eine neue NF- $\kappa$ B Aktivierung zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führt (Kawai et al., 2011).



**Abb. 2 Signalkaskade ausgewählter Toll-like-Rezeptoren**

TLRs sind in der Lage verschiedene mikrobielle Moleküle zu erkennen. Je nach Ligand und Rezeptor wird durch deren Interaktion eine spezifische Signalkaskade ausgelöst. Der klassische Ligand für TLR4 ist das bakterielle Oberflächenmolekül LPS. Durch die Interaktion des oberflächlichen TLR4 mit MyD88 kommt es zu einer frühen Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Nach der Internalisierung von TLR4 in das Phagolysosom wird über TRIF und TRAF6 eine späte NF- $\kappa$ B Aktivierung induziert. Andererseits kann TRIF auch TRAF3 rekrutieren was wiederum die Transkription von Interferonen durch IRF steigert. TLR 7 und TLR 9 sind endosomale Rezeptoren, die durch Nukleinsäuren stimuliert werden. Über das Adapterprotein MyD88 kann in allen Immunzellen eine NF- $\kappa$ B bedingte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen stattfinden. Die IRF-bedingte Ausschüttung von Interferonen hingegen ist lediglich in pDCs möglich. (Kawai et al., 2010, 2011)

### 2.5.2. NOD-like-Rezeptoren und Inflammasome

Neben den beschriebenen TLRs gibt es noch NLRs, die als wichtige Sensoren einer bakteriellen Infektion fungieren. Die Familie der NLR besteht aus mehr als 20 zytoplasmatischen Pathogen- und Gefahrensensoren, deren Funktion und Liganden in den meisten Fällen noch nicht vollständig geklärt ist. Zu ihnen zählt man NOD1 und NOD2, welche ähnlich den TLRs Bestandteile der bakteriellen Zellwand erkennen und zu einer NF-κB bedingten Transkription von proinflammatorischen Zytokinen führen (Kumar et al., 2011). Daneben gibt es andere Vertreter, die durch eine Rekrutierung von weiteren Molekülen inflammatorische Komplexe bilden, welche man als Inflammasome bezeichnet (Creagh et al., 2006; Fritz et al., 2006). Unter diesen NLRs konnte bisher lediglich für NLRP1, NLRP3, NLRC4 (IPAF), NLRP6 und NLRP12 gezeigt werden, dass sie zur Ausbildung des Inflammasomkomplexes befähigt sind (Rathinam et al., 2012), jedoch gibt es neben ihnen noch eine zweite Rezeptorenklasse namens PYHIN, welche hierzu in der Lage ist. Unter diesen kennt man bisher IFI16 und das bereits erwähnte AIM2, zwei echte Rezeptoren die durch eine direkte Bindung von dsDNA aktiviert werden (Goubau et al., 2010).

#### 2.5.2.1. Aufbau und Funktion eines Inflammasoms

Grundsätzlich besteht ein aktiviertes Inflammasom aus einem Rezeptor, einem Adaptermolekül und einer Caspase. Als Adaptermolekül dient hierbei meist das Protein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*). ASC fungiert während der Inflammasomaktivierung als eine Art molekulare Verknüpfungsplattform, welche durch Protein-Protein Wechselwirkungen eine Oligomerisation der beteiligten Proteine hin zu großen scheibenförmigen Strukturen katalysiert (de Alba, 2009). In diesen Komplex wird auch die Pro-Form der Caspase-1 eingebaut, welche durch die Konformitäts- und Umgebungsinduzierte Multimerisation mittels Autoproteolyse aktiviert wird (Rathinam et al., 2012). Die Caspase-1 stellt letztlich das funktionelle Enzym des Komplexes dar, welches durch die proteolytische Abspaltung eines Peptidanteils die Umwandlung der bis dato inaktiven Zymogene pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL18 hin zu ihren aktiven Formen IL-1 $\beta$  und IL-18 vermittelt. Durch diese Funktion wird der Caspase-1 die entscheidende Rolle an der Sekretion des aktiven IL-1 $\beta$  im Rahmen einer Immunreaktion gegen mikrobielle Erreger zu Teil. Die Abwehrreaktion durch Inflammasome erstreckt sich jedoch nicht nur auf die Sekretion aktiver Formen proinflammatorische Zytokine, sondern kann in Form eines weiteren Inflammasom-induzierten Mechanismus ablaufen. So können mit Mikroorganismen infizierte Zellen der Pyroptose

zugeführt werden, einem regulierten Zelltod welcher eine weitere Ausbreitung der Erreger verhindern soll (Franchi et al., 2012).

### **2.5.2.2. Aktivierung und Signalkaskade eines Inflammasoms**

Auch wenn die Bildung der verschiedenen Inflammasome immer eine immunologische Reaktion nach sich zieht, so sind doch die Aktivierungsmechanismen der einzelnen Rezeptoren recht verschieden und oftmals noch kaum verstanden. Am weitesten erforscht ist hierbei das NLRP3-Inflammasom, da es durch zahlreiche und teils sehr unterschiedliche Moleküle aktiviert werden kann. Zu diesen gehören mikrobielle PAMPs wie LPS, MDP, bakterielle und virale RNA, das dsRNA-Analogon polyI:C und die Imidazoquinoline R837 und R848 (Kanneganti et al., 2006), ebenso wie nicht-mikrobielle DAMPs. Zu ihnen zählt man beispielsweise kristalline Strukturen, wie Harnsäure- (Martinton et al., 2006) oder Cholesterinkristalle (Dewell et al., 2010) ebenso wie Feststoffe wie Asbest oder Quarz (Dostert et al., 2008). Die Vielfalt der aktivierenden Stoffe erschwert dabei die Suche nach dem Mechanismus der Inflammasomentstehung, weswegen aktuell drei teils kontrovers diskutierte Modelle in der Literatur zu finden sind. Allgemein anerkannt ist dabei jedoch, dass die Inflammasom-bedingte Aktivierung der Caspase-1 ein zweischrittiger Mechanismus ist. Im ersten, als *Priming* bezeichneten Schritt muss eine NF-κB bedingte Transkription der für den Zusammenschluss benötigten Moleküle stattfinden. Die Aktivierung von NF-κB wird dabei entweder durch eine Interaktion von Pathogen und TLR (oder NOD1/2) oder durch ein Zytokinsignal wie von TNF-α vermittelt und mündet in der Transkription von NLRP3, pro-Caspase-1, pro-IL-1β und pro-IL-18 (Bauernfeind et al., 2009; Toma et al., 2010). Der zweite Schritt ist die eigentliche Aktivierung des Rezeptormoleküls NLRP3 und der darauf folgende Zusammenschluss zum Inflammasom. Extrazelluläres ATP stimuliert den purinergen P2X7 Rezeptor, einen ATP abhängigen Ionenkanal, was einen K<sup>+</sup>-Ausstrom auslöst (Kahlenberg et al., 2004). Nachdem gezeigt werden konnte, dass P2X7 eine schrittweise Rekrutierung des großen Porenbildenden Proteins Pannexin-1 fördert, besagte das erste Modell, dass diese Porenbildung es extrazellulären NLRP3 Agonisten erlaubt, Zugang zum Zellinneren zu erhalten und NLRP3 direkt zu aktivieren (Kanneganti et al., 2007). Zwar ist der Einfluss von P2X7 und des damit verbundenen K<sup>+</sup>-Ausstroms immer noch gültig, jedoch erscheint eine direkte Interaktion mit NLRP3 auf Grund der strukturellen Inhomogenität der NLRP3 Agonisten heute nicht mehr als die wahrscheinlichste Variante. Dementsprechend konnte eine aktuelle Studie zeigen, dass Pannexin-1-defiziente Makrophagen nach einer Stimulation mit ATP und einigen anderen NLRP3 Stimulanzien ebenso eine Caspase-1 Aktivierung und IL-1β-Ausschüttung aufweisen wie Wildtypmakrophagen (Qu et al., 2011). Im zweiten Modell

wird die Entstehung von Sauerstoffradikalen (ROS) für die Inflammasomaktivierung verantwortlich gemacht, jedoch konnte auch in diesem Fall der Effekt von ROS-Inhibitoren auf eine Caspase-1 Aktivierung unter Zugabe von LPS aufgehoben werden. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die ROS-Produktion zwar für den *Priming*-Schritt, nicht aber für die eigentliche Aktivierung des Inflammasoms benötigt wird (Bauernfeind et al., 2011). Das dritte Modell vermutet eine Destabilisierung von Lysosomen nach der Phagozytose als Ursache der NLRP3 Entstehung. Dabei austretende lysosomale Proteasen könnten hier die aktivierenden Moleküle sein, wobei der Fokus zunächst auf den Enzymen Cathepsin B und L lag. Jedoch konnte auch hier gezeigt werden, dass Mäuse ohne diese Enzyme keine verminderte NLRP3 Aktivierung nach einer Stimulation zum Beispiel mit Cholesterinkristallen zeigten (Duewell et al., 2010).

Diese unterschiedlichen Theorien zeigen, dass der exakte Mechanismus letztlich noch nicht eindeutig geklärt werden konnte und möglicherweise mehrere verschiedene zelluläre Kaskaden daran beteiligt sind. Obwohl neuere Studien existieren, welche auf eine P2X<sub>7</sub>-unabhängige NLRP3 bedingte IL-1 $\beta$ -Sekretion in murinen DCs (He et al., 2013) oder bovinen Monozyten (Hussen et al., 2012) hindeuten, erscheint eine Beteiligung von P2X<sub>7</sub> an der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms nach wie vor als sehr wahrscheinlich. Eindeutig ist hingegen, dass für die Ausschüttung von aktivem IL-1 $\beta$  eine Caspaseaktivierung durch ein Inflammasom benötigt wird und im Falle des NLRP3-Inflammasoms eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B essentiell ist. (Koizumi et al., 2012; Schroder et al., 2010)

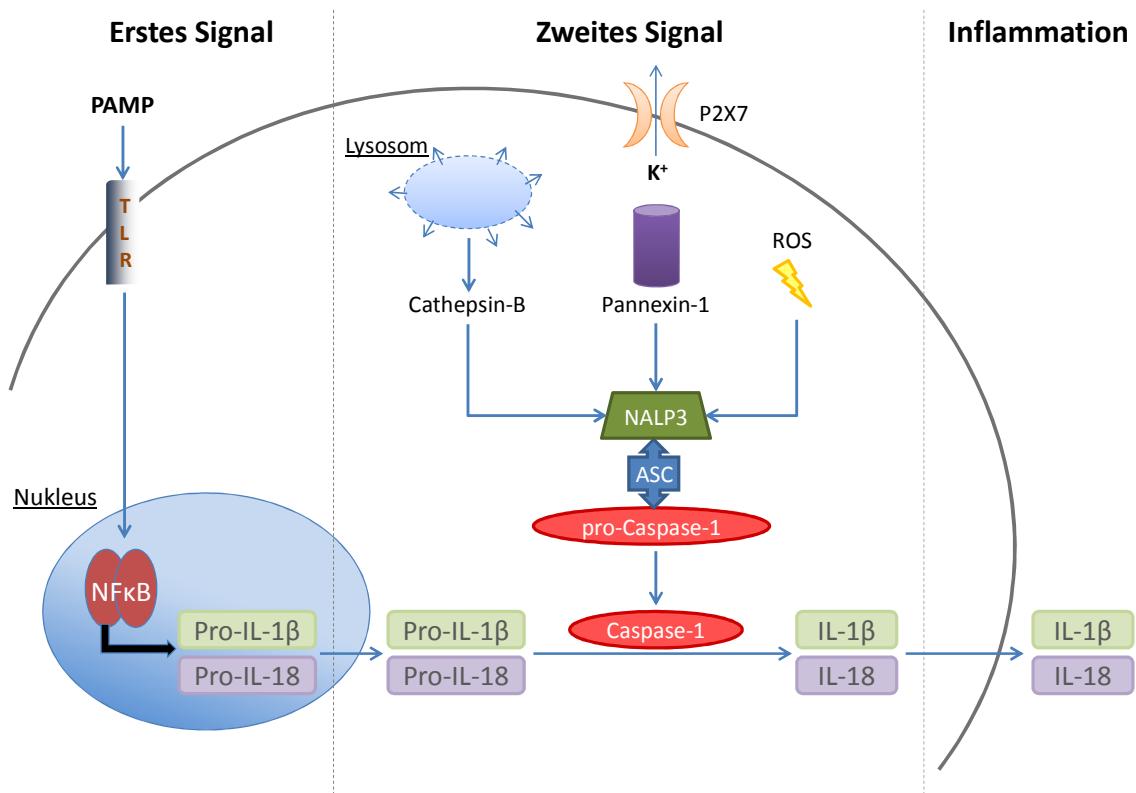


Abb. 3 „Two-Hit-Theory“: Prozessierung der aktiven Metabolite IL-1 $\beta$  und IL-18 durch das NLRP3-Inflammasom

Zur Sekretion von aktiven IL-1 $\beta$  und IL-18 durch Immunzellen sind zwei unabhängige Stimuli notwendig. Das erste Signal aktiviert über TLRs die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription von Pro-IL-1 $\beta$  und Pro-IL-18, welche aus dem Nukleus ins Zytosol transloziert werden. Das zweite Signal wird zur Aktivierung des Inflammasoms benötigt. Eine Aktivierung des Ionenkanals P2X7 ist beispielsweise mit ATP möglich. Drei mögliche Mechanismen führen zum Zusammenbau des NLRP3-Inflammasoms: 1) P2X7 bildet zusammen mit Pannexin-1 Poren in der Zellmembran und ermöglicht PAMPs in Zytosol zu gelangen, 2) PAMPs werden phagozytiert und gelangen zusammen mit lysosomalen Enzymen wie Cathepsin-B durch die undichte Membran der Phagolysosomen ins Zytosol, 3) PAMPs aktivieren die Generierung von radikalen Sauerstoffmolekülen (ROS). Nach der Aktivierung wandelt der multimerisierte Inflammasomkomplex das Protein pro-Caspase-1 in die aktive Caspase-1 um, welche wiederum mittels Proteolyse Pro-IL-1 $\beta$  und Pro-IL-18 in das aktive IL-1 $\beta$  und IL-18 umwandelt.

## 2.6. Adenosin als endogener Modulator des Immunsystems

Wie das Beispiel des NLRP3-Inflammasoms zeigt, können Nukleotide wie ATP im extrazellulären Milieu Immunreaktionen auslösen und somit als endogene Gefahrensignale wirken. In großen Mengen freigesetzt werden diese von untergehenden Zellen im Rahmen einer Nekrose, jedoch auch durch einige andere Einflüsse auf die Zellen, wie zum Beispiel eine Endotoxinstimulation, Plättchenaggregation oder starke Scherkräfte (Zeh et al., 2005). Allerdings kann nicht nur das Purin-Nukleotid ATP, sondern auch das zugehörige Nukleosid Adenosin eine immunmodulatorische Wirkung vermitteln.

Adenosin ist ein purinerges Nukleosid, welches in allen Zellen des Körpers vorkommt und neben dem Immunsystem auch Einfluss auf zahlreiche andere Körperfunktionen nimmt. Die

Wirkung von Adenosin als extrazellulärer Signalstoff auf das Herz wurde bereits 1929 von Drury und Szent-Györgyi beschrieben (Drury et al., 1929), allerdings dauerte es bis Mitte der achtziger Jahre, dass diese Erkenntnis therapeutisch genutzt werden konnte. So wird Adenosin bis heute bei supraventrikulären Tachykardien genutzt, um die Herzfrequenz zu senken (diMarco et al., 1985) oder um bei einer Myokardszintigraphie den koronaren Blutfluss zu steigern (Travain et al., 1999). Neben diesen Effekten auf das menschliche Herz, weiß man heute, dass Adenosin in nahezu jedem bisher untersuchten Organsystem regulatorische Aufgaben übernimmt.

Obwohl Adenosin auch in gesundem Gewebe in niedrigen Konzentrationen ( $<1\mu\text{M}$ ) im extrazellulären Milieu zu finden ist, akkumuliert es wie ATP in hypoxischem Gewebe, nach einem Trauma oder während einer Entzündung. Dabei können die Konzentrationen rasch um das hundertfache ansteigen. So konnten beispielsweise in Sepsispatienten systemische Adenosinspiegel zwischen 4 und 10  $\mu\text{M}$  (Martin et al., 2000) und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis sogar Konzentrationen bis zu 100 $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Sotofatto et al., 2001). Das Gros des extrazellulären Adenosins wird hierbei durch Ektonukleotidasen der Zelloberfläche mittels Phosphohydrolyse aus ATP gewonnen, es gibt aber auch transmembranäre Nukleosidtransporter, welche intrazelluläres Adenosin in das extrazelluläre Milieu befördern (Hasko et al., 2004).

Das Besondere an Adenosin ist, dass es im Rahmen einer Entzündung nicht als DAMP im engeren Sinne gesehen werden darf, da es zwar am Ort der Entzündung in hohen Konzentrationen vorhanden, nicht jedoch der direkte Auslöser dieser ist. Vielmehr kann Adenosin durch unterschiedliche Interaktionen mit diversen Zelltypen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte vermitteln und wird deswegen eher als ein Modulator der Immunantwort angesehen. So kann es zum Beispiel die Phagozytoseleistung von Makrophagen ebenso wie deren Synthese von Sauerstoffradikalen vermindern oder die Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  in B- und T-Zellen beeinflussen (Stagg et al., 2010). Am deutlichsten wird die Diversität der Immunmodulation jedoch am Beispiel der DCs. So wirkt Adenosin an unreifen DCs als starker chemotaktischer Faktor, bewirkt jedoch neben einer Reifung der DCs gleichzeitig eine Veränderung im Rezeptorprofil und dadurch einen Verlust der Chemotaxis sowie eine Inhibition der Zytokinproduktion (Schnurr et al., 2004).

Möglich wird diese Vielfalt an immunmodulatorischen Effekten von Adenosin durch dessen Wirkung an seinen verschiedenen Rezeptoren. Zusammen mit den Unterschieden in den Expressionsmustern der Rezeptoren auf den einzelnen Zielzellen ergibt sich daraus eine Vielfalt an möglichen Effekten auf den Ablauf einer Entzündungsreaktion.

## 2.7. Adenosinrezeptoren

### 2.7.1. Aufbau und Klassifikation

Um die zahlreichen Effekte von Adenosin vermitteln zu können, bedarf es demnach eines differenzierten Rezeptorsystems. Im Falle der Adenosinrezeptoren (AR) handelt es sich hierbei um ein System aus vier Subtypen, welche in mehr oder minder starker Ausprägung auf nahezu allen Zellen zu finden sind und als Adenosin-A<sub>1</sub>-Rezeptor (A<sub>1</sub>R), A<sub>2a</sub>R, A<sub>2b</sub>R oder A<sub>3</sub>R bezeichnet werden. Ihnen gemeinsam sind die Struktur aus sieben transmembranären Domänen und die Verknüpfung mit intrazellulären GTP-Bindungsproteinen (G-Proteine). Die Einteilung der AR erfolgt anhand der Klasse des rekrutierten G-Proteins und des damit verbundenen Effekts auf die Adenylatzyklase und den *second messenger* cAMP. Eine Aktivierung der Rezeptorklassen A<sub>2a</sub> und A<sub>2b</sub> führt dabei zur Bindung eines G<sub>s</sub>-Proteins, was wiederum eine erhöhte Enzymaktivität der Adenylatzyklase bewirkt und somit zu einer Steigerung des intrazellulären Botenstoffs cAMP führt. Die Rezeptoren A<sub>1</sub>R und A<sub>3</sub>R hingegen bewirken über G<sub>i/o</sub>-Proteine eine Inhibition der Adenylatzyklase und damit eine Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels (Fredholm et al., 2011). Der Hauptunterschied zwischen den beiden A<sub>2</sub>-Rezeptoren besteht in ihrer Bindungssaffinität von Adenosin. So wird der A<sub>2a</sub>R bereits bei physiologischen Konzentrationen zwischen 0,1 und 1µM aktiviert, wohingegen eine A<sub>2b</sub>R Aktivierung pathologisch erhöhte Werte über 10 µM benötigt (Fredholm et al., 2001). Obwohl die zelluläre Antwort auf Adenosin maßgeblich von der Adenosinkonzentration an der Zelloberfläche abhängig ist, spielen einige weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Rezeptordichte und die Funktionalität der intrazellulären Signalkaskade eine entscheidende Rolle in der Art und Intensität des Adenosineffekts. Erweitert wird dieses Repertoire noch dadurch, dass neben den klassischen Signalkaskaden mittlerweile zusätzliche G-Protein unabhängige Effekte beschrieben werden konnten (Fredholm et al., 2007).

### 2.7.2. Adenosinrezeptoren als Modulatoren inflammatorischer Prozesse

Auch die Modulation der Immunantwort durch Adenosin wird über eine Stimulation der spezifischen Adenosinrezeptoren vermittelt. Beispielsweise konnte im Rahmen von entzündlichen Lungenerkrankungen wie COPD und Asthma gezeigt werden, dass eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R die Rekrutierung von Immunzellen ins entzündete Lungengewebe und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen vermindert (Reutershan et al., 2007). Bekräftigt wurde dieser A<sub>2a</sub>R spezifische anti-inflammatorische Effekt auch anhand von Studien mit KO-Mäusen, die zeigten, dass A<sub>2a</sub>R defiziente Mäuse im murinen Asthmamodel

eine stärkere Lungenreaktivität und -entzündung aufweisen als die Wildtyp-Kontrolltiere (Nadeem et al., 2007). Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen, dass eine selektive Blockade von A<sub>2b</sub>R die Progression asthmatischer Erkrankungen verlangsamt, und A<sub>2b</sub>R somit im Asthmamodel einen pro-inflammatorischen Effekt vermittelt (Mustafa et al., 2007; Sun et al., 2006). Anhand dieses Beispiels wird bereits deutlich, dass die Adenosinrezeptoren während einer Inflammation verschiedene Effekte vermitteln können, was allerdings nicht generell auf die einzelnen Rezeptortypen zurückzuführen ist. Anhand des Asthmamodells zeigt sich, dass die pro- oder antiinflammatorischen Effekte unter anderem von der stimulierten Zellart abhängig sind: Dabei wird der anti-inflammatorische Effekt von A<sub>2a</sub>R vor allem von Neutrophilen und anderen Leukozyten der Lunge und Atemwege vermittelt, wohingegen die pro-inflammatorische Wirkung von A<sub>2b</sub>R besonders in der Aktivierung und Degranulation von Mastzellen begründet liegt (Ryzhov et al., 2008). Dieser Unterschied zwischen den verschiedenen Immunzellen ist eine der Ursachen, warum in der Literatur für verschiedene Inflammationsmodelle unterschiedliche Wirkungen der einzelnen Rezeptorklassen beschrieben sind. Beispielsweise wird im murinen Asthmamodel die pro-inflammatorische Wirkung durch die Mastzellaktivierung neben A<sub>2b</sub>R auch dem Rezeptor A<sub>3</sub> zugeschrieben (Salvatore et al., 2000), wohingegen im murinen Sepsismodel eine selektive A<sub>3</sub>R Blockade die Mortalität der Tiere steigert und eine Stimulation protektiv wirkt (Lee et al., 2006). Als weitere Ursache lässt sich anführen, dass nicht nur zwischen den verschiedenen Zellarten Unterschiede bei der Adenosinrezeptorwirkung auszumachen sind, sondern teilweise auch zwischen denselben Zellen in unterschiedlichen Spezies. So konnte die Degranulation von Mastzellen im Mausmodell für A<sub>2b</sub>R und A<sub>3</sub>R beschrieben werden, in humanen Mastzellen konnte dieser Zusammenhang allerdings bisher lediglich für A<sub>2b</sub>R nachgewiesen werden (Ryzhov et al., 2006; Ryzhov et al., 2004).

Anhand dieser Beispiele lässt sich bereits erkennen, wie unterschiedlich die Wirkungen der Adenosinrezeptoren im Falle einer Entzündung sein können und wie komplex die Regulation einer Immunreaktion durch diese funktioniert. Im Rahmen dieser Arbeit rückte die Wirkung der verschiedenen Rezeptortypen verstärkt in den Fokus der Untersuchungen. Aus diesem Grund wurde als Bewertung dieser stets die auf eine Stimulation folgende Zytokinausschüttung gemessen und die Werte untereinander verglichen. Die exakte Einordnung der pro- bzw. antiinflammatorischen Wirkungen der Rezeptoren und der von uns gemessenen Zytokinausschüttung soll zusammen mit den restlichen Ergebnissen dieser Arbeit jedoch im Diskussionsteil weiter ausgeführt werden.

## 2.8. Modifizierte Adenosine

Der extrazelluläre Adenosinspiegel entsteht neben der Degradation aus ATP ebenso durch Transport von Adenosin aus dem Zellinneren. Auch innerhalb der Zelle ist Adenosin ein vielfältig vorkommendes Molekül. Im Rahmen der ATP-Synthese befindet es sich in einem streng kontrollierten Fließgleichgewicht zwischen Adenosin, AMP, ADP und ATP und ist damit das Grundmolekül des Hauptenergielieferanten der zellulären Enzyme. Weiterhin ist Adenosin als Purinnukleotid auch ein essentieller Baustoff von Nukleinsäuren wie DNA oder RNA. (Hasko et al., 2007)

Dabei fungiert Adenosin als eine von vier verschiedenen Nukleinbasen, welche ihrerseits zum Beispiel durch Methylierungen weiter verändert werden können. Solche Modifikationen stellen eine Möglichkeit dar, die genetische Information temporär zu verändern oder dessen Transkriptionsrate zu regulieren. Beispielsweise weiß man heute, dass die Methylierung von DNA-Abschnitten bei Eukaryoten dazu dient, aktive von inaktiven Genabschnitten zu unterscheiden (Jeltsch, 2002). Allerdings gibt es diese Modifikationen nicht nur in der DNA, sondern auch in anderen Nukleinsäuren wie zum Beispiel der RNA.

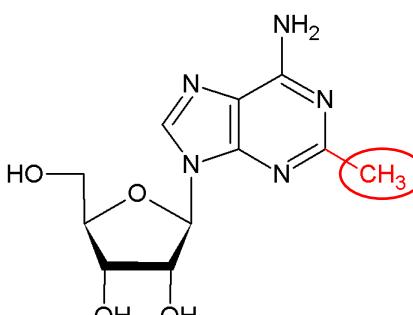
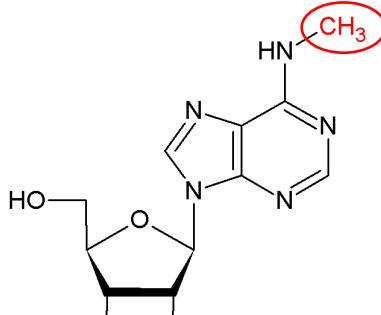
Eine der häufigsten Modifikation innerhalb der RNA ist dabei das N6-Methyladenosin (m6A), bei welchem das Stickstoffatom an sechster Stelle des Adenosinringgerüstes methyliert ist. Obwohl diese Modifikation schon seit längerem bekannt ist (Schmidt et al., 1975; Sommer et al., 1976; Tanaka et al., 1975), ist ihre Funktion letztlich immer noch nicht vollständig geklärt. Für die mRNA, welche das Transkriptionsprodukt des Dihydrofolatreduktase-Gens darstellt, konnte gezeigt werden, dass die methylierte mRNA 20% effektiver translatiert wurde als nicht-methylierte (Tuck et al., 1999). Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass m6A einen Einfluss auf die Effektivität der Translation und damit der Proteinsynthese nehmen könnte. Bekräftigt wurde diese Hypothese durch die neuerliche Entdeckung einiger spezifischer m6A-Bindungsproteine. Diese Proteine dürfen als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass eine Methylierung die Affinität von mRNA zu seinen Bindungsproteinen verändert und dadurch sowohl Einfluss auf den RNA-Metabolismus nimmt, als auch eine elementare Rolle in der Genexpression zukommt (Dominissini et al., 2012). Den Nachweis, dass m6A in dieser Funktion ein kurzlebiges und strikt kontrolliertes Molekül ist, brachte neben dem Wissen um das humane METTL3-Gen, welches für die N6-Adenosin-Methyltransferase kodiert, vor allem die Entdeckung der mRNA-Demethylase FTO, welche für die spezifische Demethylierung von m6A verantwortlich gemacht werden kann (Jia et al., 2011).

Analog zu den Mechanismen in der mRNA findet man diese auch in rRNA und tRNA. In der tRNA bewirken Modifikationen im Allgemeinen eine verstärkte Bindungsaffinität an Ribosomen, eine verringerte Rate an *misreading* und eine Modulation des *frame-shifting* - allesamt Methoden zur Beeinflussung der Translationsrate und -genauigkeit (Agris et al., 2007; Yarian et al., 2002). Auch für tRNA konnte gezeigt werden, dass Modifikationen einer dynamischen Reprogrammierung unterliegen und sie gerade im Rahmen zellulären Stresses in Zusammenarbeit mit anderen Modifikationen als Teil eines größeren Mechanismus die Regulation der Transkription übernehmen können (Chan et al., 2010).

Einen völlig neuen Aspekt in den Untersuchungen über die Funktion von Nukleosidmodifikationen erbrachte allerdings eine Studie der Arbeitsgruppe Kariko et al. aus dem Jahr 2005 (Kariko et al., 2005). Sie stellten erstmals Modifikationen der RNA als immunologisch relevante Strukturen in das Zentrum ihrer Überlegungen. Dabei konnten sie belegen, dass bakterielle und mitochondriale RNA von TLR<sub>3</sub>, TLR<sub>7</sub> und TLR<sub>8</sub> erkannt wird, die RNA von höher entwickelten Säugern jedoch nicht mehr dazu in der Lage war, DCs und TLR-exprimierende Zellen zu aktivieren. Als Ursache für diesen Verlust an stimulatorischer Aktivität der Säuger-RNA, konnten sie den hohen Anteil an modifizierten Nukleosiden m5C, m5U, s2U und eben m6A innerhalb dieser RNA ausmachen. Mit dieser Erkenntnis war es nun die Arbeitsgruppe um Stefanie Gehrig, die zeigen konnte, dass isolierte, vollständig modifizierte bakterielle tRNA, im Gegensatz zu eukaryotischer RNA, humane Blutmonozyten und pDCs zur Sekretion von IFN- $\alpha$  anregen kann und das dies in Abhängigkeit von TLR<sub>7</sub> geschieht (Gehrig et al., 2012). Hierfür konnte sie im Speziellen die Methylierung am zweiten Sauerstoffatom von G<sub>m</sub>18 der tRNA ausmachen, welche neben ihrer primären strukturellen Funktion, auch eine sekundäre Rolle als Antagonist von TLR<sub>7</sub> zukommt.

Dieses neuartige Wissen über Nukleosidmodifikationen als Interaktionspartner und Modulatoren von PRRs, wird nun vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass die verschiedenen Modifikationen sich in ihrem Vorkommen in den RNA-Arten und zwischen den verschiedenen Spezies unterscheiden. Das besondere an der Modifikation m6A ist dabei dass sein Verteilungsmuster, zum Beispiel in der humanen mRNA nicht nur einer evolutionär stark konservierten Struktur entspricht, sondern gleichzeitig in allen anderen Formen von RNA vorkommt (Dominissini et al., 2012). Andere Modifikationen, wie zum Beispiel das 2-Methyladenosin (m2A), kommen hingegen nur in einzelnen RNAs vor, wie im Falle von m2A ausschließlich in rRNA und tRNA. Ein weiterer, entscheidender Unterschied zwischen diesen beiden Methylmodifikationen ist, dass m6A sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten,

wie Bakterien und Archaeen zu finden ist, wohingegen m<sub>2</sub>A ausschließlich in bakterieller RNA vorkommt. (Machnicka et al., 2013)

	2-Methyladenosin	N6-Methyladenosin
Struktur		
Abkürzung	m <sub>2</sub> A	m <sub>6</sub> A
Vorkommen in RNA	rRNA, tRNA	mRNA, rRNA, snRNA, tRNA
Vorkommen in Stämmen	Bakterien	Archaeen, Bakterien, Eukaryoten

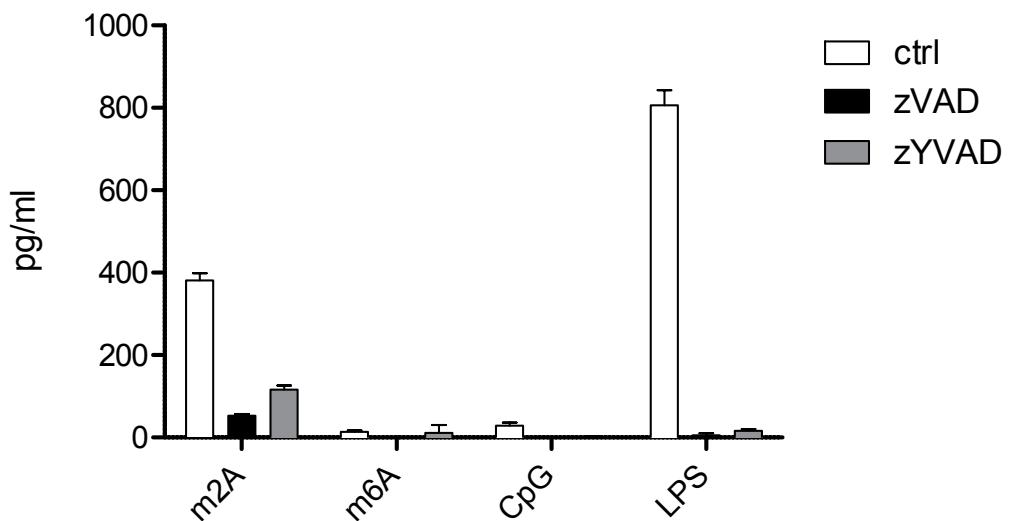
Tab. 2 Ausgewählte Adenosinmodifikationen (<http://modomics.genesisilico.pl/>)

## 2.9. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe

In Anbetracht dieser Unterschiede wurden im Vorfeld dieser Promotionsarbeit in unserer Arbeitsgruppe die Adenosinmodifikationen m<sub>2</sub>A und m<sub>6</sub>A hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Wirkung auf Immunzellen untersucht und deren Zytokinausschüttung nach einer Stimulation mit m<sub>2</sub>A oder m<sub>6</sub>A gemessen.

Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Stimulation von Immunzellen mit modifizierten Adenosinen zu einer Sekretion von Interleukin-1 $\beta$  führt. Da m<sub>2</sub>A diejenige Modifikation ist, welche ausschließlich in Bakterien vorkommt war hierbei besonders aufmerksamkeitsregend, dass ein Unterschied zwischen den verschiedenen Modifikationen besteht. So konnte man nach der Stimulation mit m<sub>6</sub>A keine IL-1 $\beta$ -Antwort messen, bei der Stimulation mit m<sub>2</sub>A hingegen schon. Ferner konnte man nachweisen, dass die IL-1 $\beta$ -Produktion Caspasen-abhängig ist. Hierzu wurden Stimulationsversuche unter Zugabe des Caspase-1 - Inhibitors zYVAD und des pan-Caspase - Inhibitors zVAD durchgeführt.

Dabei zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit der Interleukin-1 $\beta$  Sekretion sowohl von Caspase-1, als auch von anderen Caspasen. Weiterhin wurde ersichtlich, dass die Prozessierung der IL-1 $\beta$ -Proform zum hauptsächlichen Teil von Caspase-1 übernommen wird (Abb. 4).



**Abb. 4 Caspase-Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -Antwort nach Stimulation mit Adenosinmodifikationen**

Stimulierte Knochenmarkzellen wurden mit den Inhibitoren zVAD (25  $\mu$ M) und zYVAD (25  $\mu$ M) über Nacht inkubiert. Zur Stimulation wurden m2A (200  $\mu$ g/ml), m6A (200  $\mu$ g/ml), CpG (3  $\mu$ g/ml) und LPS (10  $\mu$ g/ml) verwendet.

Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Christian Hotz zu Verfügung gestellt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. m2A, m6A und Adenosin

Die synthetische Herstellung der Moleküle m2A und m6A erfolgte, ebenso wie die Aufreinigung von Adenosin mittels HPLC durch die Carell Group der Ludwig-Maximilians-Universität München, wofür an dieser Stelle nochmals ein herzlicher Dank ausgesprochen werden soll.

##### 3.1.2. Technische Ausstattung

Alpha Imager HP	Alpha Innotech, San Leandro, USA
BD FACS Canto II	BD Biosciences, USA
DynaMag 15/50 Magnet	Invitrogen Dynal, Carlsbad, USA
Gelelektrophorese-Systeme	Bio-RAD, Hercules, USA
GenePulser XCell	Bio-RAD, Hercules, USA
LAS-4000mini <i>luminescent image analyzer</i>	Fuji Film, Tokio, Japan
MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wasser-Deionisierungsmaschine	SG Reinstwasser-Sys., Hamburg, Deutschland

##### 3.1.3. Chemikalien und Puffer

Agarose LE	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Arabinose	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACSFlow, FACSSafe	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
GeneRuler DNA Ladder Mix	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gentamycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbott, Zug, Schweiz
Kanamycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine 2000 reagent	Invitrogen, San Diego, USA
Luria Bertani (LB) Agar Powder	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luria Bertani (LB) Broth Powder 20 g/L	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypan-Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland

MACS Puffer

2 mM EDTA 2% PFA  
10% FCS in PBS  
in PBS

ELISA Coating Puffer

0,2 M Natriumphosphat  
in Wasser  
pH 6,5 bzw. 9,5

ELISA Assay Diluent

10% FCS  
in PBS  
pH 7,0

ELISA Wash Puffer

0,05% Tween 20  
in PBS

TE-Puffer

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
pH 8,0 in HCl

TBE-Puffer

89 mM Tris  
89 mM Boransäure  
2 mM EDTA  
pH 8,3 in Aqua dest.

Erythrozyten-Lysepuffer

Ortho-mune Lysereagenz  
In PBS

SOB/SOC-Medium

(Hanahan, 1983)

**3.1.4. Zellkulturmateriale und Medien**

Dulbecco's PBS (1x)

PAA, Pasching, Österreich

Dulbecco's modified Eagle's medium  
(DMEM), high glucose  
Fötale Kälberserum (FCS)

PAA, Pasching, Österreich

L-Glutamin 200 mM

GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland

Natriumpyruvat

PAA, Pasching, Österreich

Penicillin / Streptomycin (100x)

PAA, Pasching, Österreich

Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

PAA, Pasching, Österreich

1640 medium

PAA, Pasching, Österreich

Trypsin (10x)

PAA, Pasching, Österreich

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), BD Biosciences (San Diego, USA) und Costar (Corning, USA) bezogen.

DMEM Vollmedium

10% FCS  
2 mM L-Glutamin  
100 IU/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
in DMEM

DC-Medium

10% FCS  
2 mM L-Glutamin  
100 IU/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
in RPMI 1640

Infektionsmedium I

10% FCS  
2 mM L-Glutamin  
in RPMI 1640

Infektionsmedium II

10% FCS  
2 mM L-Glutamin  
100 µg/ml Gentamycin  
in RPMI 1640

### 3.1.5. Stimulanzien und Inhibitoren

#### Stimulanzien:

2-Methyladenosin	AG Carell (Synthese), LMU München, Deutschland
Adenosin	AG Carell (HPLC), LMU München, Deutschland
ATP	Invivogen, San Diego, USA
CpG ODN 1826	Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	Invivogen, San Diego, USA
N6-Methyladenosin	AG Carell (Synthese), LMU München, Deutschland
Resiquimod (R848)	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz

#### Inhibitoren:

DPCPX	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
MRS 1220	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
MRS 1754	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
ZM 241385	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
zVAD	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
zYVAD	Tocris Bioscience, Ellisville, USA

### 3.1.6. Reagenziensets

#### Zellseparation:

Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Gr1 Biotin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD45R (B220) MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

#### ELISA-Kits:

IL-1 $\beta$ Murin	BD Biosciences, San Diego, USA
IL-6 Murin	BD Biosciences, San Diego, USA
IL-12p70 Murin	BD Biosciences, San Diego, USA

#### PCR-Kits:

ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
--------------------------------	---------------------------------------

### 3.1.7. FACS-Antikörper

anti-CD11b	Rat (DA) IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$
anti-CD11c	Armenian Hamster IgG <sub>1a</sub> , $\lambda$ 2
anti-CD3	Rat IgG <sub>2b</sub>
anti-CD45R/B220	Rat IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$
anti-CD80 (B7-1)	Armenian Hamster IgG <sub>2</sub> , $\kappa$

anti-Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Rat IgG2b, κ

Alle FACS-Antikörper wurden von den Firmen BD Biosciences/Pharmingen (San Diego, USA) und BioLegend (San Diego, USA) erworben.

### 3.1.8. Plasmide

Name	Charakteristika	Quelle
pKD3	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , priming-Sequenzen für die Generierung von KO-Fragmenten	(Datsenko et al., 2000)
pkD4	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , priming-Sequenzen für die Generierung von KO-Fragmenten	(Datsenko et al., 2000)
pkD46	Amp <sup>r</sup> , TSR, Kodierung für λ-red System für homologe Rekombination	(Datsenko et al., 2000)
pCP20	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , TSR, Kodierung für flp-Rekombinase	(Cherepanov et al., 1995)

Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistenz; Cm<sup>r</sup>: Chloramphenicol-Resistenz; Kan<sup>r</sup>: Kanamycin-Resistenz; TSR: Temperatursensitive Replikation

### 3.1.9. Primer

Name	Sequenz	Charakteristika
c1 down	5' TTTTCACCATGGGCAAATAT 3'	Detektion der Cm <sup>r</sup> -Kassette
k1 down	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'	Detektion der Kan <sup>r</sup> -Kassette
yfiF down	5' GGAAAATCTCGTGCTGAC 3'	Nachweis von yfiF
yfiF up	5' CAGTACCATTTCGCTGG 3'	Nachweis von yfiF
yfiF-KO down	5' CAGAGTCAGCCCCGTGACCGCAAGT GGGAAGATTATGAATATCCTCCTTA 3'	Generierung von KO-Fragmenten
yfiF-KO up	5' CTGACGGAAATCATCCAGCACGTTAA CAATGTTGTCGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'	Generierung von KO-Fragmenten
yfgB down	5' CCTGAAAACGTACCACG 3'	Nachweis von ygdE
yfgB up	5' GGTTGATCTTACACGGCG 3'	Nachweis von ygdE
yfgB-KO down	5' CAACCTGCTGGATCTAACCGTCAGC AGATGCGCGATATGAATATCCTCCTTA 3'	Generierung von KO-Fragmenten
yfgB-KO up	5' GCGCGTGTTCAGTGCCGTCGTTAACG TGGTCAAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'	Generierung von KO-Fragmenten

Alle Primer wurden von der Firma Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland bestellt.

### 3.1.10. Bakterienstämme

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterien handelt es sich um Escherichia coli des Stammes BW25113 ( $lacI^q$   $rrnB_{T14}$   $\Delta lacZ_{WJ16}$   $hsdR514$   $\Delta araBA-D_{AH33}$   $\Delta rhaBAD_{LD78}$ ). Diese sind Abkömmlinge des F, λ E. coli K-12 Stammes BD 792 [CGSC6159] und enthalten keine weiteren bekannten Mutationen (Wanner, 1983).

## 3.2. Zellulär-immunologische Methoden

### 3.2.1. Zellisolation und Kultur

#### 3.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %-igen CO<sub>2</sub>/Luftgemisch. Sämtliche Experimente mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einem Laminar Air Flow durchgeführt. Die Zellen wurden, wenn nicht explizit etwas anderes erwähnt ist, in Kulturflaschen in DMEM-Vollmedium mit FCS kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Das Medium wurde, dem Zellwachstum entsprechend, alle zwei bis drei Tage dekantiert und durch frisches Medium substituiert.

#### 3.2.1.2. Isolierung von Knochenmarkzellen und Splenozyten

Die Mäuse wurden mit Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Femur und Tibia wurden unter aseptischen Bedingungen entnommen und das Knochenmark mittels einer Kanüle mit PBS ausgespült. Die entstehende Suspension wurde durch ein 40 µM Sieb gedrückt und anschließend abzentrifugiert (400g, 7 min, 4°C). 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer wurde für 3 Minuten auf das resuspendierte Pellet angewandt. Anschließend wurde nochmals mit gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert und die Zellen in Medium gelöst.

Falls nicht anders erwähnt wurden Knochenmarkzellen und Splenozyten aus Mäusen des black6-Stammes aus hausinterner Haltung verwendet.

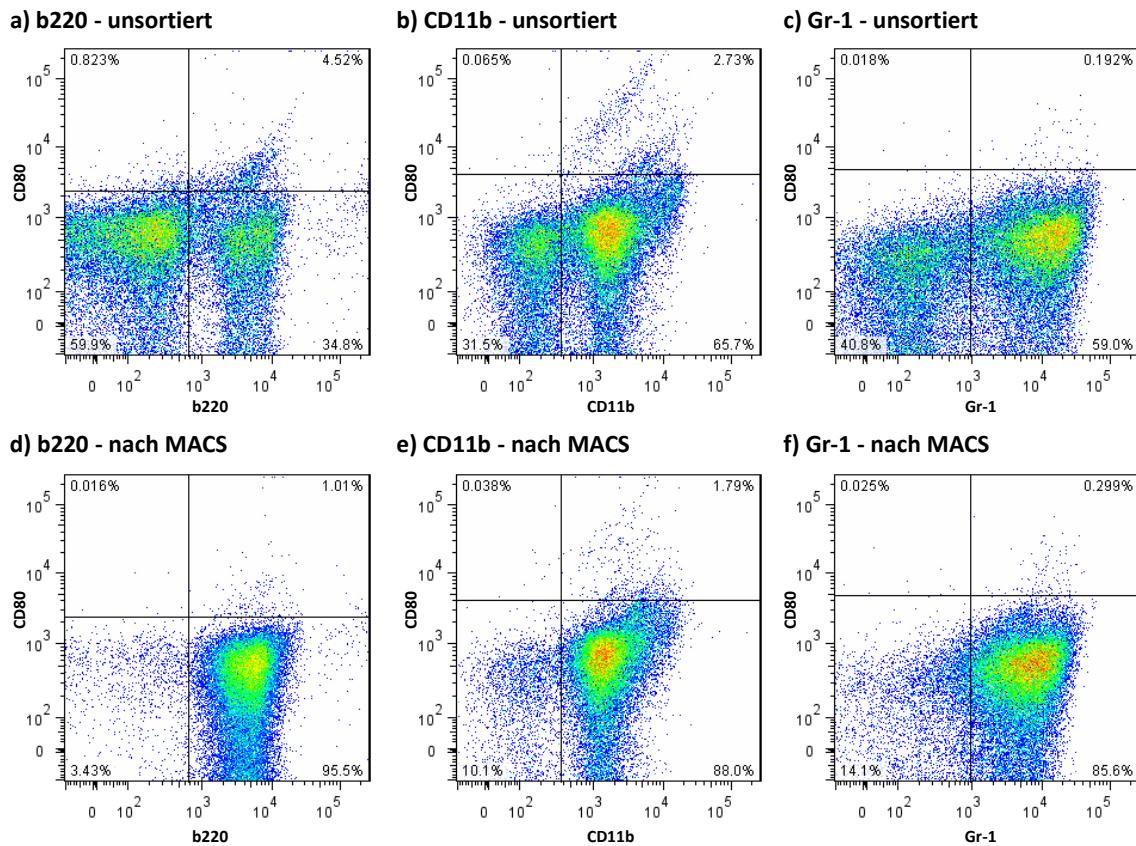
### **3.2.1.3. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

### **3.2.1.4. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung**

Bei der *Magnetic-activated cell sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 Minuten in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert wurden, werden sie gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht und somit alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden.

Innerhalb der unter Punkt **4.1.** beschriebenen Versuchsreihe erfolgte die Zellsortierung zunächst anhand des Oberflächenantigens b220. Die daraus hervorgehende b220<sup>+</sup> Zellpopulation wurde für die Stimulationsversuche verwendet, wohingegen die b220<sup>-</sup> Zellpopulation in einem zweiten Schritt erneut sortiert wurde. In diesem zweiten Sortierungsschritt wurden die verbliebenen Zellen zum einen nach dem Oberflächenantigen CD11b, zum anderen nach Gr-1 geordnet. Abschließend wurde der negative Überstand nach der zweiten Sortierung nochmals entsprechend des jeweiligen Oberflächenmarkers depletiert.



**Abb. 5 Reinheit der verschiedenen Zellpopulationen nach magnetischer Zellsortierung**

Knochenmarkzellen wurden zunächst mittels MACS-System nach b220 sortiert. Die negative Fraktion wurde anschließend nochmals entweder nach CD11b oder nach Gr-1 sortiert. Die Reinheit der jeweiligen positiv gewerteten Zellpopulation wurde mittels FACS-Analyse bewertet und beträgt für b220 ca. 97% (d), für CD11b ca. 90% (e) und für Gr-1 ca. 86% (f).

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechendem Hersteller-Protokoll verwendet.

### 3.2.2. Stimulationsversuche

Bei den Stimulationsversuchen wurden zunächst  $4 \times 10^5$  Knochenmarkzellen pro well ausgesät. Dabei wurden diejenigen wells, welche später einen Stimulus in Kombination mit LPS erhalten sollten, bereits mit LPS (0,1 µg/ml) vorbehandelt.

Falls die Versuche unter Zugabe von Inhibitoren stattfinden sollten, wurden diese nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten entsprechend ihrer effektiven Konzentration hinzugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach dieser zweistündigen Vorinkubation wurden die eigentlichen Stimuli aufgetragen. Alle verwendeten Zellen und Substanzen wurden in DC-Medium verdünnt und in die entsprechenden Konzentrationen gebracht. Da die stock-Lösung

der Inhibitoren in DMSO gelöst war, wurde während des gesamten Versuchs darauf geachtet, dass der Gesamt-DMSO-Gehalt der einzelnen Proben nicht über 0,5% hinausging.

Die fertig präparierten Proben wurden über Nacht bei 37°C und 5%-iger CO<sub>2</sub>-Begasung im Inkubator gelagert. Am nächsten Morgen wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA ausgewertet.

### 3.2.3. Bakterielle Infektionsversuche

Um eine Infektion von Immunzellen mit lebenden Bakterien durchführen zu können, mussten die Zellen zunächst in Antibiotika- und FCS- freiem Medium gelöst werden (Infektionsmedium I) um anschließend 2x10<sup>5</sup> Zellen pro well auf einer Platte aufzutragen.

Zur Aufbereitung der Bakterien wurden diese mit PBS gewaschen und an Hand ihrer optischen Dichte bei 600nm (OD600) die Zellzahlbestimmt. Eine Kontrolle dieser fand durch das Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB-Agar-Platten statt. Für die Infektion wurden die Bakterien im Infektionsmedium verdünnt und entsprechend einer *multiplicity of infection* von eins (MOI=1) den Knochenmarkzellen hinzugefügt (2x10<sup>5</sup> Bakterien pro well). Nach einer Inkubationszeit von 90 - 120 Minuten wurden die Zellen mit Infektionsmedium gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit FCS-haltigem Medium, versehen mit 100µl/ml Gentamycin (Infektionsmedium II), über Nacht inkubiert.

Im Falle einer Stimulation mit abgetöteten Bakterien wurden diese nach Bestimmung der Zellzahl für 30 - 60 Minuten bei 60°C hitzeinaktiviert. Nach einer Abkühlphase von mindestens zwei Stunden wurden sie in entsprechender Konzentration den Knochenmarkzellen hinzugegeben (2x10<sup>5</sup> Bakterien pro well). Sowohl die Zellen als auch die Bakterien wurden hierbei in DC-Medium gehalten.

Die Auswertung der Überstände wurde am nächsten Morgen mittels ELISA durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay

Zur Bestimmung verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt.

Dabei werden Zell-freie Kultur-Überstände abgenommen und in eine vorpräparierte Platte gegeben, die mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichtet sind. Nach der Bindung des spezifischen Proteins an die Antikörper wird ein zweiter, biotinylierter Antikörper

zugegeben, welcher an einem anderen Epitop des Proteins andockt. Unter Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats bilden sich mehrere Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wodurch eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht wird. Die Auswertung erfolgt durch Zugabe einer Substratlösung, welche das gebundenes Enzym zu Farbstoff umgesetzt. Die Farbintensität der Proben kann nun mit Hilfe eines ELISA-*Readers* im Vergleich zur genormten Standardreihe ausgewertet und anhand seiner bekannten Proteinmengen quantifiziert werden.

Die Durchführung des ELISA fand in dieser Arbeit mit dem BD OptEIA™ - Kit der Firma BD Biosciences (San Diego, USA) statt und erfolgte strikt nach Protokoll des Herstellers.

### 3.2.5. Durchflusszytometrie

#### 3.2.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS = *fluorescence-activated cell sorting*) können Zellen an Hand ihrer morphologischen Eigenschaften und mittels Markierung von Oberflächenantigenen oder intrazellulären Molekülen differenziert und quantifiziert werden. Dadurch können spezifische Subpopulationen innerhalb der Zellgesamtheit erkannt und separiert werden.

Hierbei befinden sich Zellen in einem laminären Flüssigkeitsstrom, welcher im Küvettenzentrum so verengt und beschleunigt wird, dass die Zellen einzeln und in ausreichendem Abstand voneinander, durch einen Laserstrahl geführt werden können. Durch bestimmte Zelleigenschaften, wie Größe, Granularität oder Oberflächenbeschaffenheit entsteht eine Lichtstreuung, welche von zwei Linsen detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) wird von einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls gemessen und hauptsächlich durch die Zellgröße bestimmt, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*) im rechten Winkel dazu gemessen wird und die intrazelluläre Granularität wiederspiegelt.

Mittels fluoreszierender Antikörper, welche gegen spezifische und für die entsprechende Zellpopulation charakteristische Oberflächenantigene gerichtet sind, kann eine weitere Differenzierung vorgenommen werden. Das Chromophor der Antikörper wird durch den Laserstrahl zur Emission von Lichtquanten angeregt, welche durch eine Linse gesammelt werden. Hier trennen Filter das gesammelte Licht entsprechend seiner Wellenlänge auf und leiten es zu den entsprechenden Photodetektoren, wodurch Signale verschiedener Wellenlängen voneinander unabhängig analysiert werden können (Mehrfarbenanalyse).

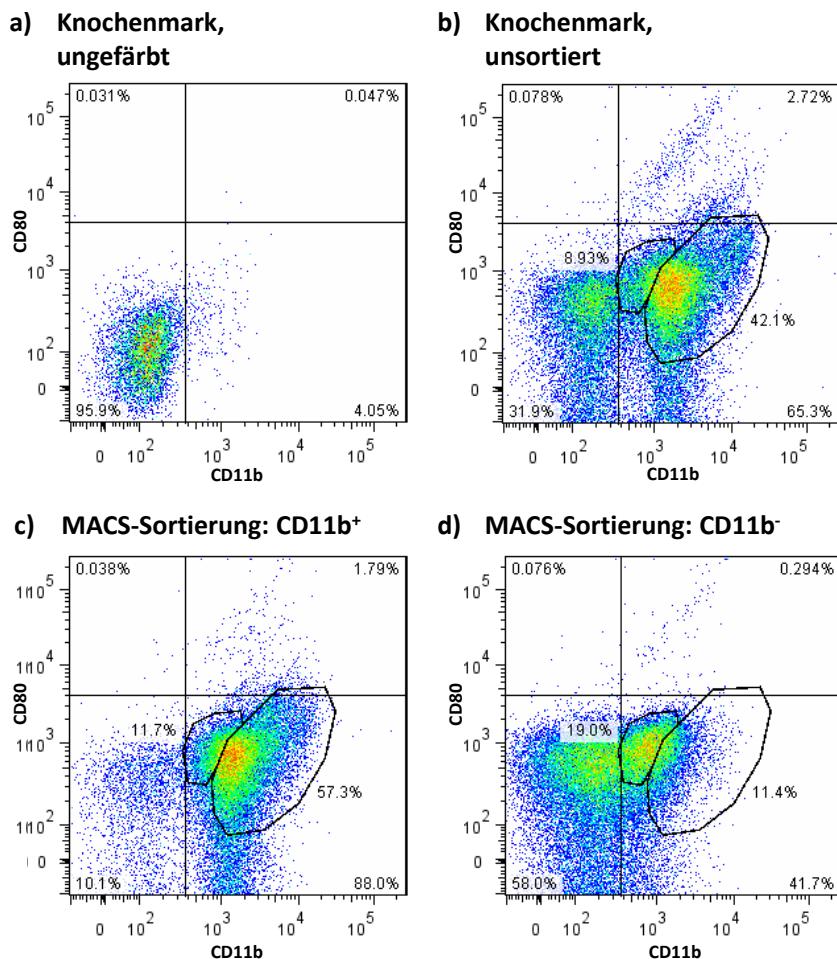
Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und somit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle.

### **3.2.5.2. Bestimmung von Oberflächenmolekülen**

Für die FACS-Analysen wurden die Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 500µl PBS gespült. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in 50µl PBS resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C unter Zugabe von 0,5µl Fluoreszenz-gelabelter Antikörper inkubiert. Anschließend wurden sie nochmals mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und resuspendiert. Die Messung erfolgte mit der Software FACSDiva auf einem BD FACS Canto II und wurde anschließend mit Hilfe der FlowJo-Software ausgewertet.

### **3.2.5.3. Determinierung der CD11b intermediären Zellpopulation**

Ein besonderes Augenmerk bei der Auswertung der mittels FACS erhobenen Daten fiel in dieser Arbeit auf die unterschiedlichen Expressionsmuster des Oberflächenantigens CD11b. In Kombination mit der magnetischen Zellsortierung zeigte sich, dass eine strikte Unterscheidung in CD11b positive (CD11b<sup>+</sup>) und CD11b negative Zellen (CD11b<sup>-</sup>) nicht ausreichend ist, um das exakte Expressionsmuster dieses Moleküls im Rahmen unserer expliziten Fragestellung abzubilden. So erkannten wir anhand unserer Stimulationsversuche, dass eine Zellpopulation existiert, welche nicht von der MACS-Sortierung als CD11b positiv erkannt wird, allerdings dennoch CD11b Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Besondere an dem CD11b Expressionsmuster dieser Zellpopulation war, dass die Anzahl der exprimierten Moleküle im Vergleich zur CD11b positiven Gruppe geringer ausfällt, weswegen diese Population im Folgenden als CD11b intermediäre Zellen (CD11b<sup>intermed</sup>) bezeichnet werden soll.



**Abb. 6 Darstellung der CD11b intermediären Zellpopulation**

$10^6$  Zellen/Tube wurden jeweils vor und nach der magnetischen Zellsortierung gefärbt und mittels FACS analysiert. Färbung: CD11b – PacBlue, CD80 – APC

- a) Als Kontrolle der CD11b Positivität dienten ungefärbte Knochenmarkzellen.
- b) Vor der magnetischen Zellsortierung erkennt man sowohl die CD11b intermediäre (kleiner Kreis, 8,93%), als auch die „echte“ CD11b positive Zellpopulation (großer Kreis, 42,1%).
- c) Die Sortierung nach CD11b bewirkt eine Anreicherung, v.a. der CD11b positiven Zellen (42,1%  $\rightarrow$  57,3%).
- d) In der negativ sortierten Fraktion findet sich der größte Anteil an CD11b intermediären Zellen (8,93%  $\rightarrow$  19,0%).

### 3.3. Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion

##### 3.3.1.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Das Ziel einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es ein in geringer Menge vorhandenes, spezifisches DNA-Fragment zu vervielfältigen. Hierzu kann entweder ein linearer DNA-Strang oder ein zirkuläres Plasmid als Matrize dienen (*template*). 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.

Eine PCR durchläuft in mehreren Zyklen drei Arbeitsschritte: Anfangs findet bei 95°C ein Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge statt (Denaturierung), was bei anschließend verminderten Temperaturen von 50 - 60°C eine Anlagerung der Primer an ihre jeweilige spezifische DNA-Sequenz ermöglicht (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 nun das daraus gewonnene DNA-Fragment seinerseits als Matrize fungieren, was zu einer exponentiellen Vermehrung der zwischen den Primern gelegenen Nukleotidsequenz führt.

Daraus ergibt sich die Zusammensetzung eines typischen Ansatzes wie folgt:

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

Die hierfür benötigten Reagenzien stammten aus dem *ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix* der Firma Sigma Aldrich.

### 3.3.1.2. PCR zur Klonierung

Zur Herstellung von linearen DNA Fragmenten, welche später als *knock-out* - Fragmente benutzt werden sollten, wurden die entsprechenden Nukleotidsequenzen mittels PCR nach oben genanntem Prinzip und nachfolgendem Schema amplifiziert.

Denaturierung	95°C	5 min
Zyklus (30x)	95°C	1 min
	54°C	1 min
	72°C	3 min
Endelongation	72°C	5 min
Lagerung	4°C	∞

### 3.3.1.3. Colony PCR

Die *Colony PCR* diente in dieser Arbeit dazu einzelne Bakterienkolonien nach spezifischen DNA-Sequenzen zu untersuchen und somit den Nachweis einer Gentransformation oder eines Gen-*knock-outs* in diesen Stämmen zu erbringen. Die PCR erfolgte hierbei nach folgendem Schema.

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

### 3.3.2. DNA – Aufreinigung und –Restriktion

Die Aufreinigung mittels PCR amplifizierter DNA wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* der Firma Fermentas durchgeführt. Dabei bindet die DNA zunächst selektiv an Silica-Säulen, wird anschließend gewaschen und letztlich in leicht alkalischem Tris-EDTA - Puffer (TE Puffer) eluiert. Die Durchführung erfolgte stets nach Protokoll des Herstellers.

Der anschließende Plasmidverdau erfolgte mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI* unter Zugabe von *Tango-buffer*. Hierbei macht man sich eine spezifische Eigenschaft des Restriktionsenzymes *DpnI* zunutze, welches ausschließlich methylierte DNA schneidet. Da das *template*-Plasmid bakteriellen Ursprungs ist, enthält es methylierte Nukleotide und wird durch das Enzym verdaut, wohingegen die neusynthetisierte lineare DNA ohne Methylierungen nicht verdaut wird und als Endprodukt übrig bleibt.

Ein typischer Ansatz wurde 120 - 180 Minuten bei 37°C inkubiert und bestand aus:

Aufgereinigte DNA, in TE-Puffer gelöst	43 µl
<i>Tango</i> -Puffer (10x)	5 µl
<i>DpnI</i> (Enzymaktivität 10U/µl)	3 µl

### 3.3.3. Generierung von *knock-out* - DNA

Zur Generierung von linearen *knock-out* – Nukleotidsequenzen (KO-DNA) wurden diese zunächst mittels PCR nach oben genanntem Schema amplifiziert. Als *template* wurden, je

nach gewünschter Antibiotikaresistenz der KO-DNA, die Plasmide pKD3 oder pKD4 verwendet. Die dadurch vermittelte Resistenz richtet sich entweder gegen das Antibiotikum Chloramphenicol (Cm<sup>r</sup>; pKD3) oder Kanamycin (Kan<sup>r</sup>; pKD4). Dabei wurden abhängig von dem entsprechenden Gen, welches entfernt werden sollte, entsprechende Primer gewählt.

Gen	Produkt	Primer
yfiF	Uncharacterized tRNA/rRNA methyltransferase YfiF	yfiF-KO up / yfiF-KO down
yfgB (alternat.: rlmN)	Dual-specificity RNA methyltransferase RlmN	yfgB-KO up / yfgB-KO down

Tab. 3 Übersicht über die mittels PCR generierten KO-Sequenzen mit den für die Kontroll-PCR gewählten Primer

Die amplifizierte Sequenz wurde anschließend aufgereinigt und in vorgeheiztem TE - Puffer (70°C) ausgewaschen. In dem Eluat wurde nun die DNA-Restriktion vorgenommen, um anschließend eine erneute Aufreinigung durchzuführen, welche diesmal in dH<sub>2</sub>O gelöst werden sollte. Eine Kontrolle auf Reinheit und Länge der KO-Sequenzen erfolgte mittels Gelelektrophorese.

### 3.3.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente entlang eines elektrischen Feldes. Dies erfolgte in einem 1%igen Agarosegel, für dessen Herstellung 1,5 g Agarose gelöst in 150ml TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) für 2 Minuten in einer Mikrowelle aufgekocht wird. Das Gemisch wird in eine Gelwanne gegossen und unter Zugabe von 6µl Ethidiumbromid unter Raumtemperatur bis zur Erhärtung abgekühlt. Nach der Überführung des fertigen Gels in die Elektrophorese-Kammer wird diese mit TBE-Puffer gefüllt bis das Gel vollständig von Puffer umspült ist. Anschließend werden die Geltaschen mit einem Kontrollmarker und den Proben beladen. Hierfür wurden 2µl des zu untersuchenden Materials mit 10µl Ladepuffer (6x *loading dye*; 30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau) versehen. Unter Anlage eines Spannungsfeldes von 100 - 120V erfolgte nun die Auftrennung der DNA-Fragmente. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, kann diese Auftrennung im UV-Licht (366nm) kontrolliert werden und mittels eines Polaroid-Negativfilms mit Blende fotografiert werden.

## 3.4. Mikrobiologische Methoden

### 3.4.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Um Kulturen anzuzüchten wurde eine einzelne Bakterienkolonie mit einer Impföse von einer Agarplatte gepickt oder aus den tiefgefrorenen Stammkulturen entnommen und in 3ml LB-Medium über Nacht bei 30°C oder 37°C im Bakterienröttler inkubiert. Dem Medium wurde je nach Bedarf das entsprechende Antibiotikum in passender Dosierung hinzugefügt. Üblicherweise dauert das Wachstum von *overnight*-Kulturen ca. 18h an, bis es die stationäre Phase erreicht. Um Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten, wurden *overnight*-Kulturen 1:200 in 50ml LB-Medium verdünnt und unter steten Kontrollen bis zur gewünschten OD600 inkubiert.

### 3.4.2. Elektrotransformation von Bakterienzellen

#### 3.4.2.1. Erstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Transformation sowohl von Plasmiden als auch von KO-DNA ist es zunächst nötig, die zu transformierenden Bakterien elektrokompetent zu machen. Dabei sollen die Zellen in eine Salz-freie Suspension überführt werden um während des Hochspannungsimpulses der Transformation einen Stromfluss zu verhindern.

Um dies zu erreichen wurden die Bakterien in der logarrhythmischen Phase bei einer OD600 von 0,6-0,8 geerntet und zunächst für 10 Minuten zur Abkühlung auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 3000-4000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gefäß mit 10% Glycerol (in dH<sub>2</sub>O) bis auf das Ursprungsvolumen von 50ml befüllt, um anschließend nochmals für 10 Minuten zu zentrifugieren. Dieser Waschschritt wurde nochmals mit dem halben Volumen (25ml) wiederholt. Abschließend wurden die Bakterien für eine Transformation mit KO-DNA 1:200 in 10% Glycerol (in dH<sub>2</sub>O) verdünnt und in Einheiten von 100µl aliquotiert, wohingegen die Bakterien für eine Plasmidtransformation 1:100 verdünnt und in 50µl Einheiten aliquotiert wurden. Die so aufbereiteten Aliquots elektrokompetenter Zellen wurden entweder unmittelbar für die Elektrotransformation verwendet oder zunächst bei -80°C verwahrt.

Bei allen durchgeführten Arbeitsschritten wurden die Zellen stets gekühlt um ein weiteres Wachstum zu vermeiden.

### 3.4.2.2. Transformation mittels Elektroporation

Das Ziel der Transformation ist eine Übertragung von freier DNA in die bakterielle Zelle. Für diesen Vorgang ist es notwendig dass die bakterielle Zellmembran kurzzeitig permeabel und somit für die zu transferierende DNA passierbar wird. Eine Möglichkeit diese Durchlässigkeit der Membran herbeizuführen ist die Elektroporation. Hierbei wird auf die Zellsuspension mittels eines schnell entladenden Kondensators kurzzeitig ein starkes elektrisches Feld angelegt, was durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. der Konformationsänderung von Membranbestandteilen, der Abschnürung von Vesikeln oder der Ausbildung von Poren, die Aufnahme der DNA ins Zellinnere ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Transformation von KO-DNA zu 100µl elektrokompetenten Bakterien 5µl der KO-DNA hinzugegeben. Zur Transformation von Plasmiden wurden 50µl elektrokompetenter Zellen je 3µl Plasmide hinzugefügt. Nach der Überführung in, bei -20°C vorgekühlten 0,1cm-Küvetten fand die Elektroporation bei einer angelegten Spannung von 1,8kV statt. Im Anschluss daran wurden die transformierten Zellen in 900µl SOC-Medium gelöst, 1h bei 37°C inkubiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusatz ausplattiert.

Eine Gefahr dieses Verfahrens besteht darin, dass bei den starken Spannungsimpulsen ein Stromfluss entsteht und eine kleine Explosion abläuft, welche die Zellen abtöten würde. Um dieses Risiko zu minimieren muss darauf geachtet werden dass die Zellen elektrokompetent, in einer Salz-freien Suspension gelöst sind und die Elektroden der Küvetten gekühlt, jedoch trocken sind.

### 3.4.3. Erzeugung von Stammkulturen

Zur Erzeugung von Stammkulturen wurde eine *overnight*-Kultur angelegt, aus welcher am nächsten Morgen 2ml des Mediums entnommen wurde. Die Zellen wurden 3 Minuten bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend in 1ml 10% Glycerol (in PBS) resuspendiert. Nach der Überführung in ein entsprechendes Cryotube wurden die Stammkulturen bei -80°C gelagert.

### 3.4.4. Chromosomaler Gen-*knock-out*

Der *knock-out* chromosomaler Gene erfolgte in mehreren Schritten nach der erstmals von Datsenko und Wanner im Jahr 2000 beschriebenen Methode (Datsenko et al., 2000).

Das Ziel hierbei war die Entfernung verschiedener Methyltransferasen in *E. coli* Bakterien. Da die Etablierung dieser Methode und die Generierung der *knock-outs* einen maßgeblichen Bestandteil dieser Promotionsarbeit darstellt, soll darauf im Verlauf gesondert eingegangen werden und an dieser Stelle lediglich die verwendeten Konzentrationen angegeben werden.

Ampicillin:	100 µg/ml
Arabinose, anteilig:	0,2 %
Chloramphenicol:	10 µg/ml
Kanamycin:	25 µg/ml

### 3.5. Statistische Analyse

Die Ergebnisse der nachfolgenden Versuche werden als arithmetisches Mittel, die Streuung wird als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the means*; SEM) angegeben. Für die statistische Auswertung wurde zum Vergleich zweier Proben der zweiseitige Student-t-Test, beim Vergleich mehrerer Proben innerhalb eines Versuchs wurde ein *one-way* ANOVA mit Tukey Test gewählt. Das Verfahren wird in den entsprechenden Abbildungen angegeben. Als signifikant wurde ein Test gewertet, wenn  $p < 0,05$  war. Die Signifikanzniveaus werden durch folgende Markierungen angezeigt: \* bei  $p < 0,05$ , \*\* bei  $p < 0,01$  und \*\*\* bei  $p < 0,001$ . Die statistische Analyse erfolgte mit der Software Prism 5 von der Firma GraphPad, La Jolla, USA.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. m2A stimuliert Gr-1 positive und CD11b intermediäre *responder*-Zellen

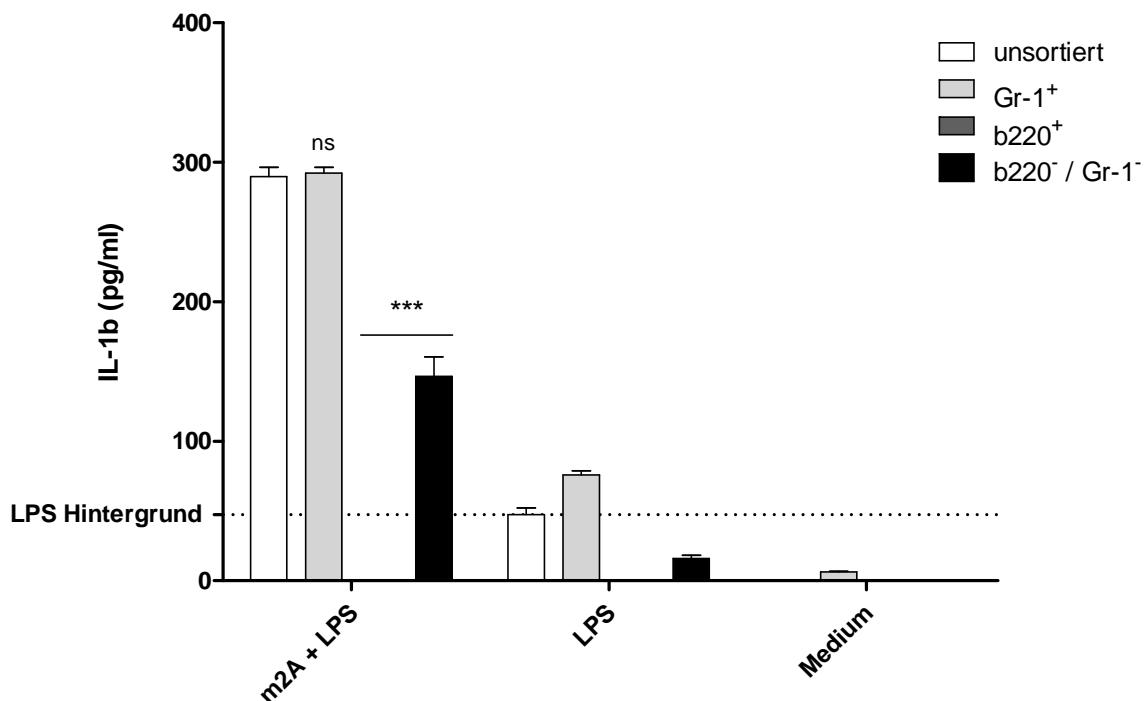
Ein Aspekt dieser Arbeit sollte sein, herauszufinden welche Zellen auf die Stimulation durch m2A mit einer Ausschüttung von Interleukin-1 $\beta$  reagieren (*responder*-Zellen). Da das Knochenmark der Ort der Hämatopoiese ist, enthält es sowohl Vorläufer-, als auch reife Zellen aller Blutzelllinien. Dazu gehören auch die verschiedenen Arten der Immunzellen, weswegen für die Charakterisierung der *responder*-Zellpopulation zunächst Knochenmarkzellen geerntet und mittels MACS in verschiedene Subpopulationen getrennt wurden. Anschließend wurden diese im Rahmen von Stimulationsversuchen mittels ELISA und FACS-Analysen ausgewertet.

#### 4.1.1. *Responder*-Zellen exprimieren das Oberflächenantigen Gr-1

Im ersten Versuch wurden die Zellen zunächst nach den Oberflächenantigenen b220 und anschließend nach Gr-1 sortiert. Die übriggebliebene doppelt negative Fraktion wurde nochmals mittels MACS nach Gr-1 depletiert.

Für den Versuchsaufbau wurden demnach vier verschiedene Gruppen gewählt: unsortierte Knochenmarkzellen als Kontrollpopulation (KM), b220 positiv sortierte Zellen (b220 $^+$ ), Gr-1 positiv sortierte Zellen (CD11b $^+$ ) und doppelt negativ sortierte Zellen (b220 $^-$ /Gr-1 $^-$ ).

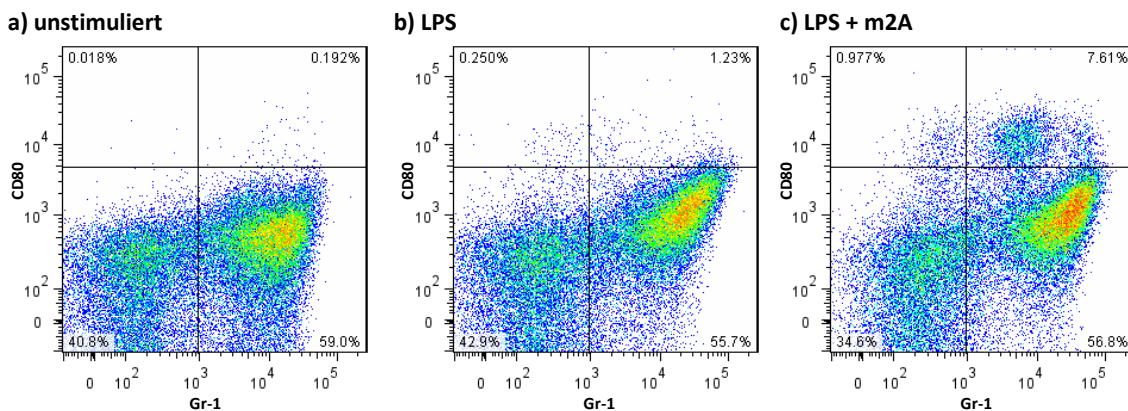
Diese Gruppen wurden einem Stimulationsversuch mit m2A und LPS unterzogen und die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Überständen mittels ELISA gemessen.



**Abb. 7 Interleukin-1 $\beta$ -Ausschüttung der verschiedenen Zellpopulationen nach Stimulation mit LPS und m2A**  
 Die wells wurden mit je  $4 \times 10^5$  Zellen beladen. Es erfolgte eine Vorstimulation mit LPS und eine Restimulation mit m2A. Am nächsten Morgen wurden die Überstände mittels ELISA analysiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen lediglich in Medium behandelt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich auf die unsortierte Kontrollgruppe. (m2A = 200  $\mu$ g/ml; LPS = 0,1  $\mu$ g/ml; One-way ANOVA with Tukey's Test)

**Abb. 7** zeigt die mittels ELISA gemessenen Interleukin-1 $\beta$  Konzentrationen in den Überständen nach einer entsprechenden Stimulation mit oder ohne m2A. Wie bereits in den Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe produzieren unsortierte Knochenmarkzellen nach einer Stimulation mit m2A und LPS eindeutig höhere IL-1 $\beta$ -Spiegel als nach einer Stimulation mit LPS. Des Weiteren lassen sich zwischen den unterschiedlich sortierten Gruppen nach einer m2A-Stimulation eindeutige Unterschiede erkennen. So bewirkt die Stimulation von Gr-1 $^{+}$  sortierten Zellen eine ähnlich hohe IL-1 $\beta$ -Ausschüttung wie die Zellen der unsortierten Kontrollgruppe, wohingegen die b220 $^{-}$ /Gr-1 $^{-}$  sortierten Zellen signifikant geringere IL-1 $\beta$ -Spiegel in den Überständen aufweisen. Die b220 $^{+}$  sortierte Gruppe hingegen lässt keine IL-1 $\beta$ -Sekretion nach einer Stimulation mit m2A und LPS erkennen.

Zusätzlich zu der Auswertung der IL-1 $\beta$ -Sekretion erfolgte eine Analyse der verschiedenen sortierten Gruppen mittels FACS. Hierbei sollten die einzelnen Zellgruppen anhand ihrer charakteristischen Oberflächenantigene (b220, Gr-1) hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades nach einer Stimulation untersucht werden. Als repräsentativer Aktivierungsmarker wurde das Oberflächenantigen CD80 ausgewählt.



**Abb. 8 FACS-Analyse unsortierter Knochenmarkzellen hinsichtlich ihrer Gr-1 Expression und Aktivierung**  
**a)** unstimulierte KM-Zellen; **b)** KM-Zellen nach Stimulation mit LPS; **c)** KM-Zellen nach Vorstimulation mit LPS und Restimulation mit m2A  
 Es wurden  $10^6$  Zellen/tube am Morgen nach der Stimulation angefärbt und auf das Expressionsmuster ihrer Oberflächenantigene untersucht. Färbung: CD80 – APC, Gr1 – PacBlue

**Abb. 8** stellt das Ergebnis der FACS-Analyse von unsortierten Knochenmarkzellen dar. In der Grafik wird das Vorhandensein des Oberflächenmarkers Gr-1 (x-Achse) der Aktivierung in Form der CD80-Expression (y-Achse) gegenübergestellt. Hierbei wird deutlich, dass eine Stimulation mit m2A und LPS, analog zur erhöhten IL-1 $\beta$ -Sekretion, zu einer Steigerung der CD-80 Expression und somit einer verstärkten Aktivierung der Zellen führt. Dass dieser Effekt tatsächlich durch m2A vermittelt wird, zeigt sich daran, dass der Anteil an aktivierte, CD80 positiven Zellen in der unstimulierten Kontrolle, ebenso wie in der mit LPS versehenen Probe, mit ca. 0,2% bzw. 1,5% im Vergleich zu einer m2A-Stimulation mit ca. 8,6% der gesamten Zellen deutlich geringer ausfällt (vgl. obere Hälften **a**) bzw. **b**) mit **c**)).

Neben der höheren Aktivierung durch m2A zeigt sich allerdings auch, dass die aktivierte Zellpopulation nahezu vollständig das Oberflächenantigen Gr-1 exprimiert, was zusammen mit den ELISA-Ergebnissen dafür spricht, dass die *responder*-Zellpopulation Gr-1 positiv ist (vgl. **c**), rechter oberer Quadrant).

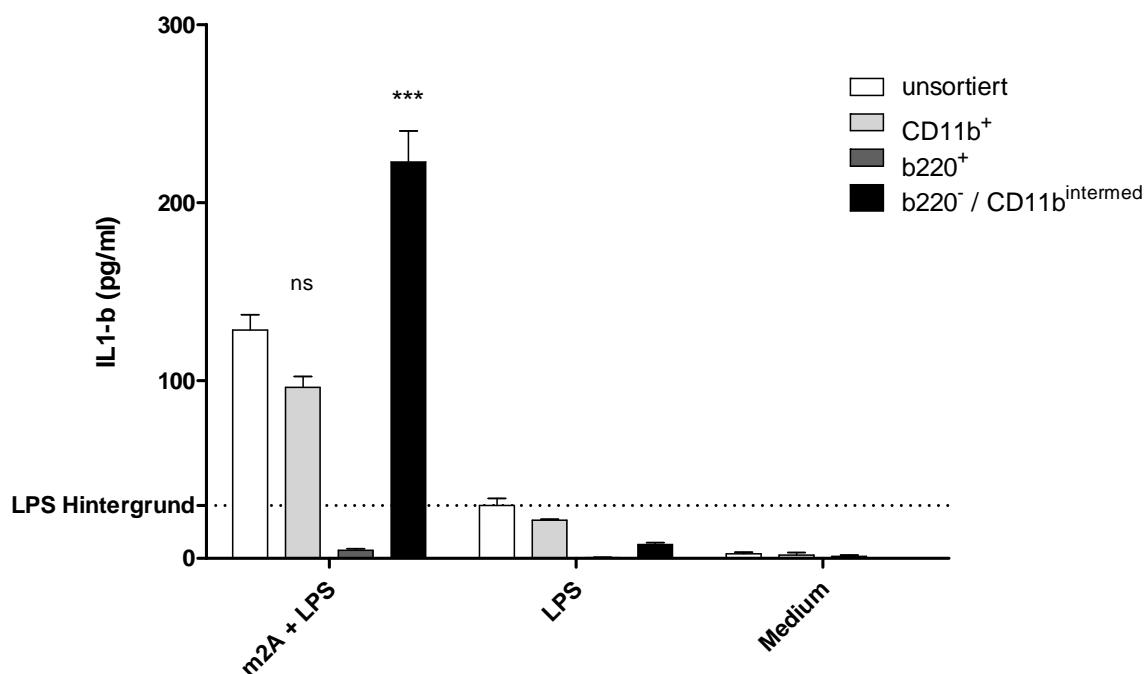
Somit bestätigt dieser erste Versuch sowohl durch eine gesteigerte IL-1 $\beta$ -Sekretion, als auch durch eine vermehrte CD80 Expression, dass eine Stimulation mit m2A zu einer Aktivierung von Knochenmarkzellen führt. Darüber hinaus zeigt sich allerdings auch, dass die gesuchte *responder*-Zellpopulation, welche auf eine Stimulation mit m2A sensibel ist, das Oberflächenmolekül Gr-1 exprimiert und somit Gr-1 positiv sein muss. Dies erkennt man sowohl an der hohen IL-1 $\beta$ -Sekretion in der Gr-1 $^+$  sortierten Gruppe, als auch an der dargestellten FACS-Analyse der unsortierten Knochenmarkzellen. Weiter bestätigt wurde diese Charakterisierung der *responder*-Zellen durch die FACS-Analyse der Gr-1 $^+$  sortierten

Zellen, welche im Vergleich zu den anders sortierten Gruppen den höchsten Anteil an aktivierte Zellen enthielt (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2. m2A stimuliert CD11b-intermediäre Zellen und verstärkt die Expression des Moleküls

Im nächsten Versuch fand zunächst eine Zellsortierung anhand der Oberflächenantigene b220 und CD11b statt. Die Sortierung wurde mittels MACS mit anschließender Depletion durchgeführt. Nach der Zellsortierung wurden folgende Gruppen mit m2A und LPS stimuliert und erneut mittels ELISA und FACS untersucht: Knochenmarkzellen als Kontrollpopulation (KM), b220 positiven Zellen ( $b220^+$ ), CD11b positive Zellen ( $CD11b^+$ ) und doppelt negativ sortierte Zellen.

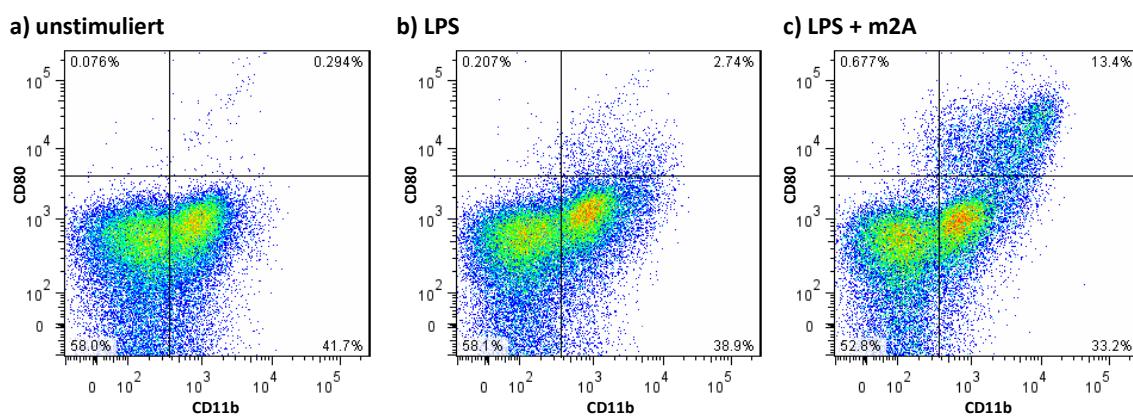
Da sich, wie in **Abschnitt 3.2.5.3** beschrieben, diese letzte Gruppe nicht wie erwartet als CD11b negativ erwies, sondern lediglich eine geringere Anzahl an CD11b Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimiert, soll diese Gruppe im Folgenden weiterhin als  $CD11b^{intermed}$  bezeichnet werden.



**Abb. 9** Interleukin-1 $\beta$  Ausschüttung der verschiedenen Zellpopulationen nach Stimulation mit m2A und LPS  
 $4 \times 10^5$  Knochenmarkzellen pro well wurden mit LPS vorstimuliert und über Nacht mit m2A restimuliert. Am nächsten Morgen erfolgte mittels ELISA eine Bestimmung der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den Überständen. Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich auf die unsortierten Knochenmarkzellen, als Negativkontrolle diente Medium ohne die Zugabe von Stimuli. (m2A = 200  $\mu$ g/ml; LPS = 0,1  $\mu$ g/ml; One-way ANOVA with Tukey's Test)

**Abb. 9** zeigt die IL-1 $\beta$ -Spiegel der Überstände der verschiedenen sortierten Zellgruppen nach einer Stimulation mit m2A und LPS. Für die CD11b $^+$  sortierten Zellen zeigt sich eine visuelle, jedoch nicht signifikante Abnahme der IL-1 $\beta$ -Spiegel. Die höchsten IL-1 $\beta$ -Konzentrationen finden sich in den Überständen der b220 $^-$ /CD11b $^{\text{intermed}}$  sortierten Zellen, wohingegen die b220 $^+$  sortierten Zellen wiederum nicht zur IL-1 $\beta$ -Sekretion angeregt werden können.

Neben der Bestimmung der IL-1 $\beta$ -Spiegel mittels ELISA wurden die unterschiedlich sortierten Gruppen auch diesmal sowohl vor als auch nach der Stimulation einer FACS-Analyse unterzogen. Während sich hierbei für die unsortierten Knochenmarkzellen ein zum vorherigen Versuch analoges Bild ergab, in welchem die *responder*-Zellen neben Gr-1 auch CD11b exprimierten (Daten nicht gezeigt), soll an dieser Stelle die Gruppe mit der stärksten IL-1 $\beta$ -Sekretion dargestellt werden:



**Abb. 10** FACS-Analyse der b220 $^-$ /CD11b $^{\text{intermed}}$  sortierten Zellen hinsichtlich ihrer Aktivierung und Expression von CD11b

a) unstimulierte CD11b $^{\text{intermed}}$  Zellen; b) CD11b $^{\text{intermed}}$  Zellen nach Stimulation mit LPS; c) CD11b $^{\text{intermed}}$  Zellen nach Vorstimulation mit LPS und Restimulation mit m2A;  
Die Sortierung der Zellen erfolgte mittels MACS zunächst nach dem Molekül b220. Die negativ sortierte Fraktion wurde erneut hinsichtlich des Antigens CD11b sortiert. Hier dargestellt ist die doppelt negativ sortierte Zellgruppe, welche abschließend nochmals nach CD11b depletiert wurde (CD11b $^{\text{intermed}}$ ). Am Morgen nach der Stimulation wurden  $10^6$  Zellen/tube angefärbt und hinsichtlich ihres CD11b Expressionsmusters und der Aktivierung in Form der Expression von CD80 untersucht. Färbung: CD11b – PacBlue, CD80 – APC

**Abb. 10** zeigt die Gruppe der b220 $^-$ /CD11b $^{\text{intermed}}$  sortierten Zellen. Dargestellt ist wiederum die Expression des Oberflächenantigens CD11b (x-Achse) und der Aktivierungsgrad der Zellen (CD80, y-Achse). Interessanterweise finden sich in dieser Fraktion trotz der negativen Sortierung und der Depletion nach CD11b immer noch über 40% CD11b positive Zellen. Da diese jedoch im Vergleich zur CD11b $^+$  sortierten Fraktion pro Zelle eine geringere Anzahl an exprimierten Molekülen aufweisen, haben wir diese Zellpopulation als CD11b intermediäre Zellen (CD11b $^{\text{intermed}}$ ) bezeichnet (vgl. **Abschnitt 3.2.5-3**). Im Vergleich mit den anderen Gruppen weist diese CD11b intermediäre Population nach einer Stimulation mit m2A nicht nur die höchsten IL-1 $\beta$ -Spiegel auf, sondern offenbar mit insgesamt 14,1% auch den

höchsten Anteil an CD80 positiven Zellen und scheint somit am ehesten der gesuchten *responder*-Zellpopulation zu entsprechen (vgl. c), obere Hälfte). Als weitere Besonderheit dieser aktivierten Population fällt eine scheinbare Hochregulation der CD11b Expression auf deren Zelloberfläche auf, was in der Grafik auf der x-Achse als eine zunehmende Rechtsverschiebung der einzelnen Messwerte ersichtlich wird.

Zusammengefasst lässt sich anhand unserer Daten demnach sagen, dass eine Stimulation mit m2A zu einer Aktivierung von Gr-1 und CD11b positiven Zellen führt. Dies äußert sich zum einen in einer gesteigerten IL-1 $\beta$ -Sekretion dieser *responder*-Zellen, zum anderen in einer Hochregulation von CD80. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass eine Aktivierung durch m2A vor allem auf eine spezifische CD11b intermediäre Zellpopulation wirkt, welche scheinbar mit einer Hochregulation der CD11b Expression reagiert. Alles in allem kann durch diese Ergebnisse die gesuchte *responder*-Zellpopulation somit bereits relativ präzise beschrieben werden.

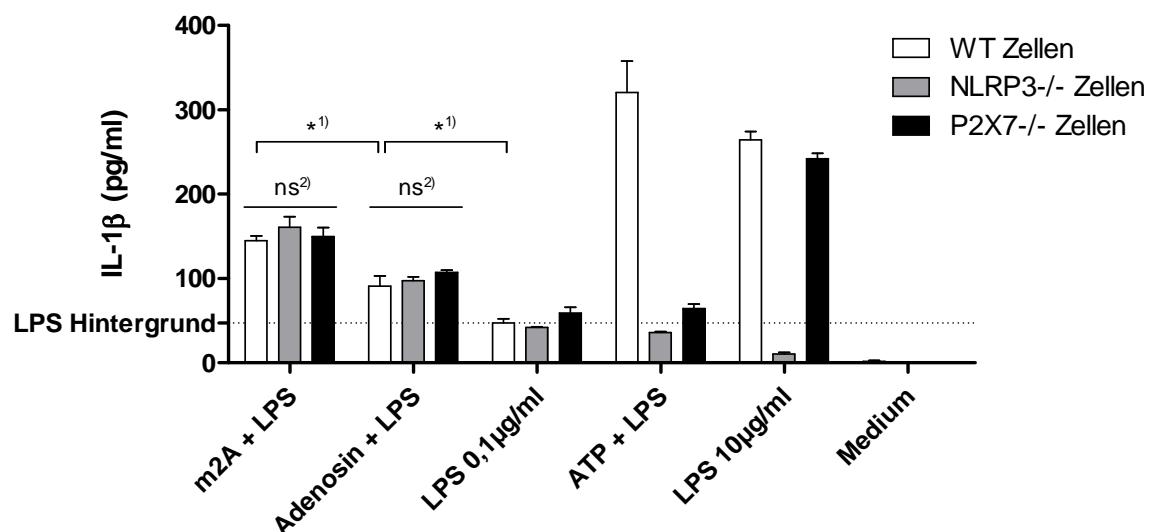
## 4.2. m2A wirkt auf Adenosinrezeptoren und vermittelt eine NLRP3-unabhängige IL-1 $\beta$ -Sekretion

Als weiteren Bestandteil dieser Arbeit, sollte neben der auf m2A reagierenden Zellart auch die nach der Stimulation ablaufende Signalkaskade untersucht werden. Hierzu wurden Stimulationsversuche zum einen auf *knock-out*-Knochenmarkzellen, zum anderen unter Zugabe diverser Inhibitoren durchgeführt.

### 4.2.1. Immunstimulation durch m2A erfolgt unabhängig vom P2X7-Rezeptor oder dem NLRP3-Inflammasom

In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die durch m2A initiierte Prozessierung der IL-1 $\beta$ -Pro-Form hin zum aktiven IL-1 $\beta$  durch Caspase 1 bewerkstelligt wird. Aus diesem Grund sollten zunächst mögliche Aktivierungswege der Caspase 1 untersucht werden. Da die Caspase 1-Aktivierung unter anderem durch das NLRP3-Inflammasom vermittelt wird (Schroder et al., 2010) und dieses wiederum durch die Aktivierung des P2X7/Pannexin – Ionenkanals entstehen kann, sollte in folgendem Experiment dieser Signalweg untersucht werden.

Hierzu wurde das Knochenmark sowohl von WT-Mäusen, als auch von P2X7 $^{-/-}$  und NLRP3 $^{-/-}$  Mäusen entnommen und ein Stimulationsversuch mit m2A durchgeführt.



**Abb. 11** Interleukin-1 $\beta$  nach Stimulation von WT-, NLRP3 $^{-/-}$ - und P2X7 $^{-/-}$ -Knochenmarkzellen  
 $4 \times 10^5$  Knochenmarkzellen/well der verschiedenen KO-Tiere wurden mit LPS, LPS und Adenosin oder LPS und m2A stimuliert und am nächsten Morgen die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen der Überstände mittels ELISA ausgewertet (eff. Konz.: m2A/adenosine = 200  $\mu$ g/ml; ATP = 5 mM; LPS = 0,1  $\mu$ g/ml bzw. 10  $\mu$ g/ml; 1) Students-t-test; 2) One-way ANOVA with Tukey's Test)

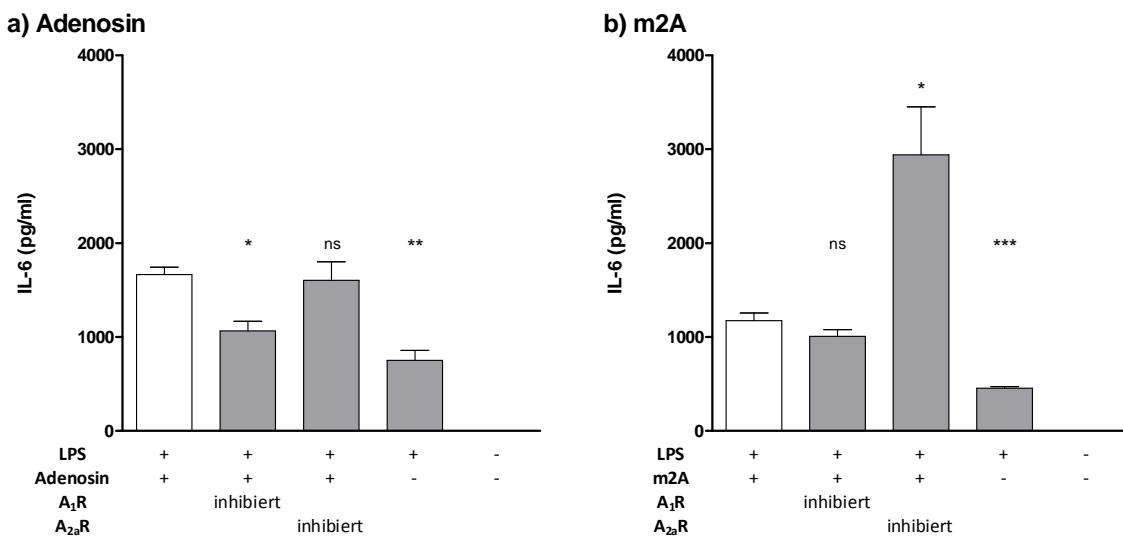
**Abb. 11** zeigt die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen der Überstände nach Stimulation der WT-, NLRP3 $^{-/-}$ - und P2X7 $^{-/-}$ -Knochenmarkzellen. Dabei lässt sich nach einer Stimulation mit m2A kein Unterschied zwischen den verschiedenen Knochenmarkzellen erkennen, was eine Beteiligung des Inflammasoms NLRP3 oder des Ionenkanals P2X7 an der Signalkaskade ausschließt. Dies bedeutet, dass die für eine IL-1 $\beta$ -Prozessierung notwendige Caspaseaktivierung auf einem anderen Weg als durch die Bildung des NLRP3-Inflammasoms erfolgt. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach einer Stimulation mit Adenosin, das in diesem Versuch an Stelle von m6A als Kontrollbedingung gewählt wurde. Auch hier lassen sich zwischen den einzelnen KO-Zellen keine Unterschiede erkennen. Interessanterweise zeigt sich dabei, dass auch Adenosin einen Effekt auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion hat, was zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war. Adenosin scheint zwar im Vergleich zu m2A über ein geringeres stimulatorisches Potential zu verfügen, jedoch bewirkt es eine signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Sekretion im Vergleich zur Kontrollstimulation mit LPS.

Diese neuen Erkenntnisse über das immunstimulatorische Potential von Adenosin, zusammen mit der Tatsache, dass m2A eine Modifikation dieses Moleküls ist, rückten nun die Adenosinrezeptoren als möglichen Vermittler der IL-1 $\beta$ -Sekretion verstärkt in den Fokus unserer Untersuchungen. Nachdem in Vorversuchen unter Zugabe des unspezifischen Adenosinrezeptorantagonisten Coffein eindeutige Veränderungen in der IL-1 $\beta$ -Sekretion sowohl nach einer Stimulation mit m2A, als auch mit Adenosin zu erkennen war, sollte in den nachfolgenden Versuchen besonders auf die einzelnen Subtypen der Adenosinrezeptoren eingegangen werden.

#### 4.2.2. Adenosin und m2A unterscheiden sich im Verhalten an den Rezeptoren A<sub>1</sub> und A<sub>2a</sub>

Die spezifische Funktion der einzelnen Adenosinrezeptoren im Rahmen von Entzündungsreaktionen wurde bisher kontrovers diskutiert. Bisher wurden jedoch dem Rezeptor A<sub>1</sub> (A<sub>1</sub>R) teils pro-inflammatorische und A<sub>2a</sub> (A<sub>2a</sub>R) eher anti-inflammatorische Effekte zugeschrieben (Hasko et al., 2008). Um diese Einschätzung zu überprüfen, sollte zunächst ein Stimulationsversuch zusammen mit spezifischen Inhibitoren für die Adenosinrezeptoren A<sub>1</sub> und A<sub>2a</sub> durchgeführt werden. Zur Inhibition des A<sub>1</sub>R wurde 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), als A<sub>2a</sub>R Inhibitor ZM 241385 verwendet, wobei sich 5  $\mu$ M als die jeweils am besten wirksame Konzentration erwies. Um eine genauere Beurteilung der immunmodulatorischen Wirkung von Adenosin und m2A durch die jeweiligen Adenosinrezeptoren zu erhalten, sollten in diesem Versuch die Überstände zusätzlich zu den

IL-1 $\beta$ -Konzentrationen auch auf die Spiegel des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) untersucht werden.

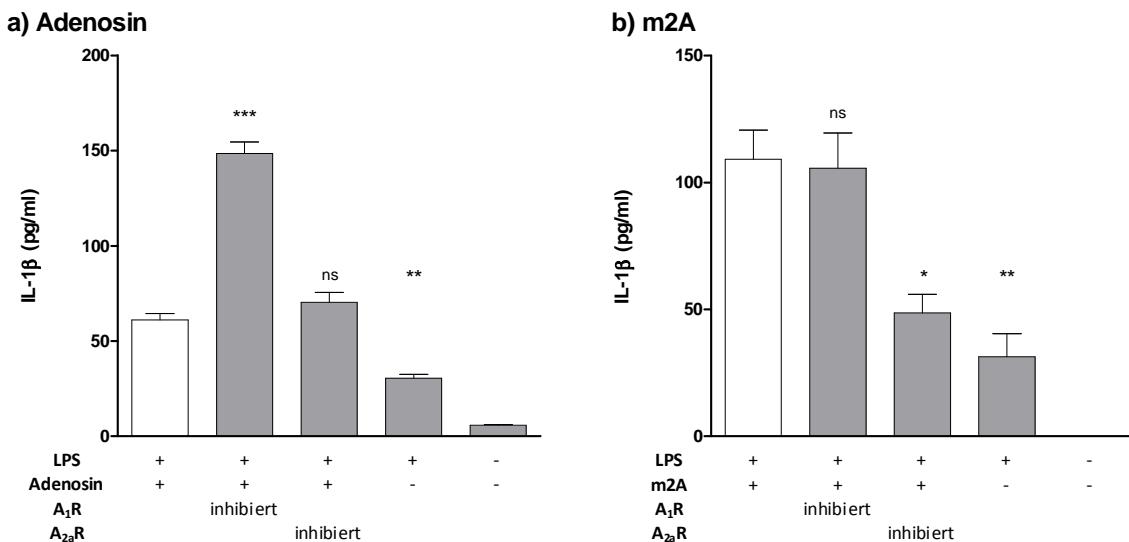


**Abb. 12** Interleukin-6 Spiegel nach Stimulation mit a) Adenosin bzw. b) m2A unter Zugabe spezifischer Adenosinrezeptorinhibitoren

Es wurden für a)  $4 \times 10^5$  Zellen/well und für b)  $3 \times 10^5$  Zellen/well stimuliert. Die Signifikanzniveaus werden im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor angegeben (weiß). (eff. Konz.: Adenosin und m2A = 200  $\mu$ g/ml; LPS = 0,1  $\mu$ g/ml; DPCPX und ZM = 5  $\mu$ M; Student's-t-Test)

**Abb. 12** veranschaulicht die IL-6-Spiegel der Überstände nach der Stimulation mit Adenosin oder m2A. Im Falle einer Stimulation mit Adenosin bemerkt man unter Zugabe des A<sub>1</sub>R Inhibitors im Vergleich zur Kontrolle eine erniedrigte IL-6-Konzentration. Dies bestätigt die Annahme einer proinflammatorischen Wirkung von A<sub>1</sub>R, da unter Wegfall seines proinflammatorischen Stimulus eine verminderte Zytokinausschüttung die logische Konsequenz ist (vgl. **Abb. 12 a**).

Die Stimulation mit m2A hingegen zeigt erhöhte IL-6-Spiegel im Falle einer Inhibition von A<sub>2a</sub>R. Dies spräche für die anti-inflammatoryischen Wirkung von A<sub>2a</sub>R, da unter dessen Blockade die Sekretion pro-inflammatoryischer Zytokine zunimmt (vgl. **Abb. 12 b**).



**Abb. 13** Interleukin-1 $\beta$  Spiegel nach Stimulation mit a) Adenosin bzw. b) m2A unter Zugabe spezifischer Adenosinrezeptorinhibitoren

Es wurden für a)  $4 \times 10^5$  Zellen/well und für b)  $3 \times 10^5$  Zellen/well stimuliert. Die Signifikanzniveaus werden im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor angegeben (weiß). (eff. Konz.: Adenosin und m2A = 200  $\mu$ g/ml; LPS = 0,1  $\mu$ g/ml; DPCPX und ZM = 5  $\mu$ M; Students-t-Test)

Die in **Abb. 13** dargestellten IL-1 $\beta$ -Spiegel ergeben ein im Vergleich zu IL-6 konträres Bild. So zeigt sich bei einer Stimulation mit Adenosin ein stark erhöhter IL-1 $\beta$ -Spiegel unter Inhibition von A<sub>1</sub>R. Analog dazu verhält sich die Antwort auf eine Stimulation mit m2A, bei welcher man unter der Blockade von A<sub>2a</sub>R stark erniedrigte IL-1 $\beta$ -Konzentrationen sieht.

Als Schlussfolgerung dieser Ergebnisse lässt sich demnach die Hypothese aufstellen, dass eine Aktivierung von A<sub>1</sub>R zu einer Verminderung der IL-1 $\beta$ -Sekretion führt, wohingegen eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R eher für eine gesteigerte IL-1 $\beta$ -Ausschüttung verantwortlich gemacht werden kann. Für A<sub>1</sub>R zeigt sich dies anhand der IL-1 $\beta$ -Erhöhung unter Zugabe des spezifischen Rezeptorantagonisten DPCPX im Vergleich zur reinen Adenosinstimulation (vgl. **Abb. 13 a)**). Für A<sub>2a</sub>R offenbart sich der Effekt unter Zugabe des spezifischen Inhibitors ZM 241385, bei welcher die IL-1 $\beta$ -Spiegel im Vergleich zur m2A Stimulation abfallen (vgl. **Abb. 13 b)**).

Vergleicht man weiterhin in beiden Abbildungen die Zytokinspiegel der Kontrollproben ohne Inhibitoren und die Proben mit Inhibitoren, wird ein weiterer Unterschied zwischen Adenosin und m2A deutlich. So präsentieren sich die Grundspiegel der Interleukine nach einer Stimulation mit Adenosin (1. Säule **Abb. 12 a)** und **17 a))** ähnlich hoch, wie die derjenigen Proben, bei welchen der A<sub>2a</sub>R-Inhibitor zugegeben wurde (3. Säule **Abb. 12 a)** und **17 a))**). Im Falle der m2A-Stimulation hingegen zeigt sich, dass der IL-1 $\beta$ - und IL-6-Grundspiegel (1. Säule **Abb. 12 b)** und **17 b))** denjenigen ähnelt, bei welchen der A<sub>1</sub>R-Inhibitor hinzugefügt wurde (2. Säule **Abb. 12 b)** und **17 b))**).

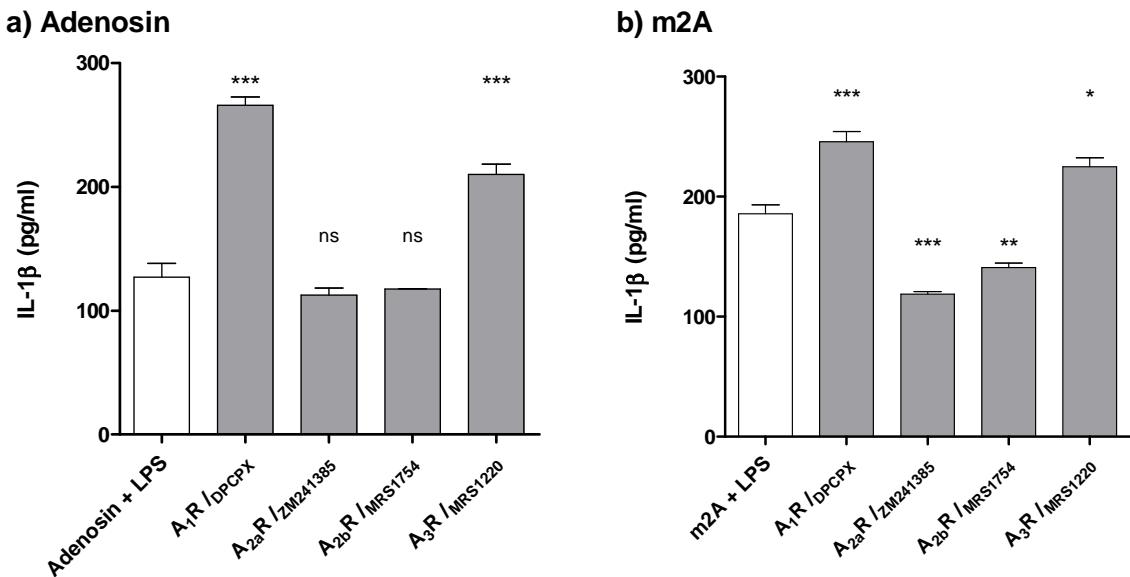
Für die Adenosinstimulation ergeben sich also gleiche IL-Spiegel ohne Inhibitor und mit  $A_{2a}R$ -Inhibitor, weswegen der Schluss nahe liegt, dass Adenosin im Modell ohne Inhibitoren verstärkt mit dem  $A_1$ -Rezeptor interagiert. Diese Hypothese gründet dabei in der Beobachtung, dass die Zugabe eines  $A_{2a}R$ -Inhibitors zum Adenosinstimulus keinen Effekt auf den IL-Spiegel hat und die Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor unverändert bleiben. In dieses Konzept passt auch die Beobachtung, dass sich die IL-Spiegel unter Zugabe eines  $A_1R$ -Inhibitors verändern, da hierbei der bevorzugte Interaktionspartner des Adenosinmoleküls blockiert wäre.

Im Fall von m2A ist der Grundspiegel nach der Stimulation mit m2A ähnlich hoch wie der Spiegel, der mit dem  $A_1R$ -Inhibitor versehenen Probe. Daraus ergibt sich die Annahme, dass m2A wahrscheinlich weniger mit dem  $A_1$ -Rezeptor interagiert, zumal dessen Inhibition keine Veränderung des IL-Spiegels bewirkt. Da aber die Inhibition des  $A_{2a}$ -Rezeptors einen Unterschied der IL-Sekretion im Vergleich zum Grundspiegel bewirkt, liegt die Vermutung nahe, dass m2A im Gegensatz zu Adenosin seine Wirkung vermehrt über den  $A_{2a}$ -Rezeptor entfaltet.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieses Experiments demnach die Hypothese aufstellen, dass  $A_1R$  eine Erhöhung der IL-6- und eine Erniedrigung der IL-1 $\beta$ -Konzentration vermittelt. Indessen bewirkt  $A_{2a}R$  genau gegensätzlich eine Erhöhung des IL-1 $\beta$ - und eine Erniedrigung des IL-6-Spiegels. Weiterhin scheint Adenosin - zumindest in diesem Modell - eher mit dem  $A_1$ -Rezeptor zu interagieren, wohingegen m2A eher mit dem  $A_{2a}$ -Rezeptor kommuniziert.

#### **4.2.3. Adenosin und m2A gleichen sich unter Inhibition der einzelnen Rezeptoren an**

Die Ergebnisse des letzten Versuches bekräftigen die Annahme, dass Adenosin und m2A ihre Wirkung über unterschiedliche Adenosinrezeptortypen entfalten. Dies konnte für die Rezeptoren  $A_1R$  und  $A_{2a}R$  gezeigt werden. Um diese Hypothese zusätzlich zu unterstützen und das unterschiedliche immunmodulatorische Potential beider Substanzen weiter abzuklären, sollten in einem nächsten Stimulationsversuch alle bekannten Adenosinrezeptoren inhibiert werden. Wie im Vorversuch sollte DPCPX zur Inhibition von  $A_1R$  und ZM 241385 für  $A_{2a}R$  verwendet werden. Zur Inhibition von  $A_{2b}R$  wurde MRS 1220 und um  $A_3R$  zu antagonisieren MRS 1754 benutzt. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden die Konzentrationen an IL-1 $\beta$  in den Überständen herangezogen.



**Abb. 14** Vergleich der Interleukin-1 $\beta$  Ausschüttung nach Stimulation mit Adenosin oder m2A unter Zugabe spezifischer Adenosinrezeptorinhibitoren

Es wurden  $4 \times 10^5$  Knochenmarkzellen/well mit LPS vorstimuliert. Die Restimulation erfolgte entweder mittels Adenosin (a)) oder m2A (b)). Zeitgleich mit der Restimulation wurden die jeweiligen Adenosinrezeptorinhibitoren zugefügt (graue Balken). Die angegebenen Signifikanzniveaus beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrollstimulation ohne Zugabe eines Inhibitors (weiße Balken). (eff. Konz.: Adenosin und m2A = 200  $\mu$ g/ml; LPS = 0,1  $\mu$ g/ml; DPCPX und ZM241385/MRS1754 = 5  $\mu$ M; MRS1220 = 10  $\mu$ M; One-way ANOVA with Tukey's Test)

**Abb. 14** visualisiert die Effekte der Inhibition eines spezifischen Adenosinrezeptors unter Stimulation einerseits mit LPS und Adenosin, und andererseits mit LPS und m2A anhand der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen.

Betrachtet man die Stimulation mit Adenosin (a)), so zeigt sich im Falle einer Suppression von  $A_1R$  und  $A_{2a}R$  das aus dem vorhergegangenen Versuch bekannte Muster einer Erhöhung von IL-1 $\beta$  unter Inhibition von  $A_1R$  (DPCPX) und gleichbleibenden IL-1 $\beta$ -Spiegeln bei Zugabe des  $A_{2a}R$  Inhibitors (ZM 241385). Ebenso wie  $A_{2a}R$  zeigt eine Blockade von  $A_{2b}R$  (MRS1754) keinen Unterschied zur Kontrolle. Die Antagonisierung von  $A_3R$  (MRS1220) hingegen bewirkt wiederum einen Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration.

Mit m2A als Stimulus (b)) erkennt man im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg der IL-1 $\beta$ -Konzentration bei Blockade von  $A_1R$ . Erneut deutlich wird der Abfall an IL-1 $\beta$  unter Blockade von  $A_{2a}R$ . Dies gilt ebenso für  $A_{2b}R$ , wohingegen die Inhibition von  $A_3R$  wiederum einen Anstieg der IL-1 $\beta$ -Level bewirkt.

Vergleicht man nun die einzelnen Werte der Adenosinstimulation mit denen der m2A-Stimulation, so zeigt sich auch in diesem Versuch eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Sekretion nach einer Stimulation mit m2A im Vergleich zu Adenosin (weiße Balken;  $p < 0,001$ ). Auffällig beim Vergleich der einzelnen Inhibitor-versehenen Proben ist, dass sich für keinen der vier verschiedenen Inhibitoren ein signifikanter Unterschied zwischen Adenosin und m2A ergibt

und sich somit Adenosin und m2A unter Inhibition der einzelnen Rezeptoren in ihrer Wirkung angleichen (graue Balken).

Zusammengefasst zeigt dieser Versuch also, dass sich die Rezeptoren  $A_1$  und  $A_3$ , ebenso wie  $A_{2a}R$  und  $A_{2b}R$  in ihrem Verhalten nach einer Stimulation mit Adenosin oder m2A ähneln. Dabei scheint analog zum Vorversuch eine Stimulation von  $A_1R$  und  $A_3R$  zu einer verminderten IL-1 $\beta$ -Sekretion zu führen, wohingegen  $A_{2a}R$  und  $A_{2b}R$  diesen Effekt nicht vermitteln. Auch die Hypothese einer unterschiedlichen Wirkung von m2A und Adenosin an den einzelnen Rezeptoren lässt sich an Hand dieser Ergebnisse bekräftigen: Im Falle einer Adenosinstimulation ergeben sich erneut gleich hohe IL1- $\beta$  Werte unter der Inhibition von  $A_{2a}R$  und zusätzlich auch für  $A_{2b}R$ . Da lediglich die Inhibition von  $A_1R$  oder  $A_3R$  Veränderungen in den IL-1 $\beta$ -Werten bewirkt, scheint es erneut als wären diese Rezeptoren der bevorzugte Interaktionspartner von Adenosin. Umgekehrt stellt sich im Falle einer m2A-Stimulation die IL-1 $\beta$ -Antwort eher auf dem Niveau einer  $A_1R$ - und  $A_3R$ -Inhibition ein und ein Effekt ist unter der Inhibition von  $A_{2a}R$  und  $A_{2b}R$  zu sehen, was wiederum dafür spräche, dass m2A ohne den Einfluss von Inhibitoren verstärkt über die Rezeptoren  $A_{2a}R$  und  $A_{2b}R$  wirkt.

Auffällig bei dieser letzten Einschätzung ist, dass -anders als noch im vorherigen Versuch- die IL-1 $\beta$ -Konzentration nach einer Stimulation mit m2A nicht mehr das gleiche hohe Niveau wie unter einer Inhibition von  $A_1R$  erreicht. Als mögliche Erklärung hierfür konnten wir den Verlust der immunologischen Aktivität von m2A durch das mehrmalige Einfrieren und Wiederauftauen ausmachen. Dieser Verdacht konnte durch die Kontrolle der alten m2A- Charge mit einer neu synthetisierten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Obwohl dieser Aktivitätsverlust von m2A auch die Werte der Inhibitor-versenen Proben beeinflussen könnte, erscheint es auf Grund der Ergebnisse dieses und auch des vorherigen Versuches dennoch als wahrscheinlich, dass sich das Verhalten von Immunzellen nach einer Stimulation mit Adenosin oder m2A angleicht, wenn einzelne Rezeptortypen inhibiert werden.

### 4.3. Methyltransferase yfiF vermittelt Immunogenität von Bakterien

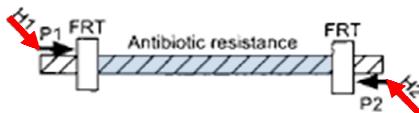
In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass modifizierte Adenosine wie das Molekül m<sub>2</sub>A dazu in der Lage sind Immunzellen zu aktivieren. Die übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit war aber, ob solche Modifikationen in der bakteriellen RNA insgesamt als Initiatoren einer Immunreaktion gesehen werden und somit als neue Klasse von PAMPs gewertet werden müssen. Um diese Hypothese zu ergründen, und damit auch der Frage nach der klinischen Relevanz der neu gewonnenen Erkenntnisse nachzukommen, sollte ein Bakterienmodell entwickelt werden, in welchem die Fähigkeit zur Methylierung von RNA unterbunden wurde. Hierzu musste eine Methode zum *knock-out* verschiedener Methyltransferasen in *E. coli* Bakterien etabliert werden und in mehreren Schritten die einzelnen Gene entfernt werden. Anschließend sollte anhand von Infektionsversuchen mit Wildtyp- und KO-Bakterien untersucht werden, ob ein *knock-out* und der Verlust an RNA-Methylierungen eine Veränderung der Immunogenität der einzelnen Bakterien bewirkt.

#### 4.3.1. Generierung von Methyltransferasen-defizienten *knock-out*-Bakterien

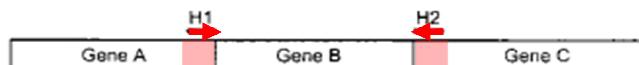
Die Erstellung von KO-Bakterien macht es notwendig, gezielt chromosomal Gene aus dem bakteriellen Genom zu entfernen. In Anlehnung an die Methode nach Datsenko und Wanner (Datsenko et al., 2000) wurden dabei die Bakterien mittels Transformation von Helferplasmiden mit bestimmten Enzymen ausgestattet, welche das gewünschte Gen durch die in einem weiteren Schritt transformierte KO-DNA ersetzen.

Da die Methode mehrere einzelne Arbeitsschritte benötigt um einen erfolgreichen *knock-out* des gewünschten Genes zu erreichen, soll im Folgenden ihr Prinzip genauer dargestellt werden.

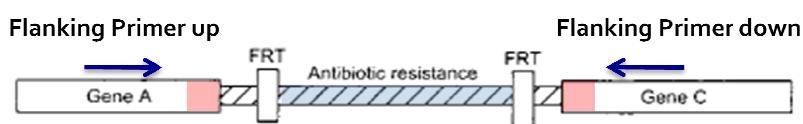
### Schritt 1: PCR Amplifikation von FRT-flankierter Antibiotikaresistenz



### Schritt 2: Transformation in Rekombinase-exprimierenden Stamm



### Schritt 3: Selektion auf Antibiotikaresistenz



### Schritt 4: Eliminierung der Resistenz durch ein FLP exprimierendes Plasmid



**Abb. 15 Entfernung eines chromosomalen Gens** (Abb. modifiziert nach Datsenko und Wanner, 2000)  
 FRT = FLP recognition target; H1/2 = homologe Bindungsdomäne 1/2; P1/2 = Primer upstream/downstream

Um das gewünschte Zielgen durch KO-DNA austauschen zu können, muss zunächst mittels PCR die entsprechende KO-DNA generiert werden. Dies erfolgt mittels PCR nach der unter dem Punkt „Material und Methoden“ beschriebenen Vorgehensweise. Die spezifischen Qualitäten der KO-DNA bestehen in der Vermittlung einer selektiven Antibiotikaresistenz ( $\text{Cm}^r$  oder  $\text{Kan}^r$ ), sowie in einer homologen Bindungsdomäne, welche das zu entfernende Gen flankiert. Diese Bindungsdomäne wird als *FLP recognition target* (FRT) bezeichnet und stellt die Sequenz dar, welche später durch die FLP-Rekombinase erkannt und ausgetauscht werden soll (Abb. 15, Schritt 1).

Da die Bakterien kein Gen für eine eigene Rekombinase besitzen, muss zunächst mittels Elektroporation ein sogenanntes *red* Helperplasmid in die Zellen eingebracht werden. Dabei handelt es sich um das Plasmid pkD46, dessen *red* System die drei Gene  $\gamma$ ,  $\beta$  und *exo* beinhaltet, welche für zwei Rekombinasen und einen Exonukleaseninhibitor kodieren. Durch die Inhibition der zellulären Exonuklease wird die Degradation der nachfolgend transformierten linearen KO-DNA verhindert, wohingegen die Rekombinasen den Austausch dieser gegen das gewünschte Zielgen vermitteln. Eine weitere wichtige durch pkD46

vermittelte Eigenschaft ist die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin, wodurch im Anschluss an die Elektroporation eine Selektion von erfolgreich pkD46-transformierten Bakterien ermöglicht wird. Hierbei, sowie bei allen nachfolgenden Arbeitsschritten bei denen pkD46 erhalten werden soll, muss darauf geachtet werden, dass die Inkubation bei 30°C durchgeführt wird, da das Plasmid pkD46 sich temperatursensitiv repliziert und somit bei höheren Temperaturen während der Replikation verloren ginge.

Da die pkD46-Rekombininasen nur unter Anwesenheit von Arabinose enzymatisch aktiv sind und das Gen entsprechend der homologen Sequenzen gegen die KO-DNA austauschen können, müssen die pkD46 tragenden Bakterien zunächst unter Zugabe von Arabinose aufbereitet werden, bevor mittels einer neuerlichen Elektrotransformation die KO-DNA eingebracht werden kann (Abb. 15, Schritt 2).

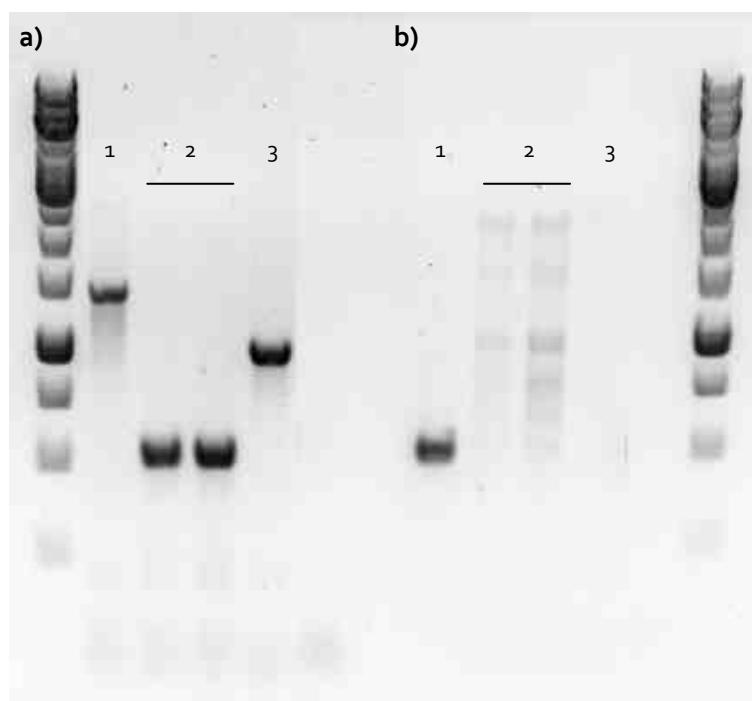
Die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien erfolgt, abhängig von der gewählten KO-DNA, durch das zweimalige Ausplattieren entweder auf Chloramphenicol- oder Kanamycinhaltigen Arabinose-LB-Agar Platten, wobei die Antibiotikakonzentration beim zweiten Ausplattieren verdoppelt wird. Im Anschluss daran werden die Bakterien mittels PCR und Gelelektrophorese auf das Vorhandensein der inserierten, für die Resistenz kodierenden Nukleotidsequenz getestet. Die Wahl der *Flanking* Primer für die PCR richtet sich hierbei jeweils nach dem ausgeknocktem Gen und der Antibiotikaresistenz (Abb. 15, Schritt 3).

Nachweis von Gen	Primer upstream	Primer downstream
yfiF	yfiF up	yfiF down
yfgB	yfgB up	yfgB down
Cm <sup>r</sup>	yfiF up / yfgB up	c1 down
Kan <sup>r</sup>	yfiF up / yfgB up	k1 down

Tab. 4 Übersicht über bei der Kontroll-PCR verwendeten Primer

Um die Entfernung des Gens zu kompletieren und die Bakterien für den *knock-out* eines weiteren Gens vorbereiten zu können, muss abschließend die Antibiotikaresistenz wieder entfernt werden. Dazu bedient man sich eines weiteren Hilfsplasmids (pCP20), welches eine FLP-Rekombinase exprimiert. Diese FLP-Rekombinase erkennt die beiden, die Antibiotikaresistenz flankierenden FRT-Loci und kann diese unter Verlust des dazwischenliegenden Nukleotidstrangs verknüpfen. Die im Genom verbleibende, verkürzte Nukleotidsequenz verliert dadurch jegliche Funktion und wird als Narbensequenz bezeichnet (Abb. 15, Schritt 4).

Um das Plasmid pCP20 transformieren zu können muss jedoch zunächst das bisher in den Zellen vorhandene Plasmid pKD46 entfernt werden, was auf Grund seines temperatursensitiven Replikationsmechanismus durch eine Inkubation bei 37°C erreicht wird. Da das Hilfsplasmid pCP20 zusätzlich zu der FLP-Rekombinase auch für eine Ampicillin- und Chloramphenicolresistenz kodiert und genau wie pKD46 über einen temperatursensitiven Replikationsmechanismus verfügt (Cherepanov et al., 1995), kann nach der Elektroporation erneut eine Selektion der pCP20-postiven Bakterien erfolgen und das Plasmid im Anschluss durch eine Inkubation bei erhöhter Temperatur entfernt werden. Mittels PCR und Gelelektrophorese werden die Abwesenheit der Antibiotikaresistenz und das Vorhandensein der Narbensequenz geprüft. Nach der abschließenden Kontrolle des pCP20-Verlustes durch gleichzeitiges Ausplattieren der getesteten Klone auf Ampicillin-haltigen, sowie Antibiotikafreien Agarplatten, stehen die fertigen KO-Bakterienstämme zur Anlegung von Stammkulturen für Versuche oder den *knock-out* weiterer Gene zur Verfügung.



**Abb. 16 Kontroll-PCR auf Verlust der Antibiotikaresistenz nach Transformation von pCP20**

In diesem Beispiel wurde das Gen *yfiF* durch eine Chloramphenicolresistenz ( $Cm^r$ ) ersetzt.

- a) In der linken Bildhälfte wurden als Primer *yfiF* up und *yfiF* down verwendet. Man sieht die verlängerte Nukleotidsequenz der  $Cm^r$  bei Bakterien vor der Transformation mit pCP20 (1), wohingegen nach erfolgreicher pCP20-Transformation nur eine stark verkürzte Narbensequenz im Bakteriengenom übrig bleibt (2).
- b) In der rechten Bildhälfte wurden dieselben Klone nochmals auf das Vorhandensein einer  $Cm$ -Resistenz getestet. Hierfür wurden die entsprechenden Primer *yfiF* up und *c1* down verwendet. Vor der Transformation mit pCP20 ist eine deutliche Bande der  $Cm^r$  nachweisbar (1). Im Gegensatz dazu lässt sich sowohl nach pCP20-Transformation (2), als auch beim Wildtyp (3) keine Nukleotidsequenz der  $Cm^r$  nachweisen.

In dieser Arbeit war das Ziel des chromosomalen Gen *knock-outs* die Generierung eines Bakterienstammes, welcher eine möglichst vollständig fehlende Methylierungsfähigkeit der RNA aufweist. Dazu sollten Schritt für Schritt die einzelnen für Methyltransferasen codierenden Gene entfernt werden. Als Ausgangsstämme standen hierfür Wildtyp-,  $\Delta$ yfiF- und  $\Delta$ ygdE-*E. coli* zur Verfügung (AG Carell, LMU München). In diesen Ausgangsstämmen wurden nun nacheinander mittels oben beschriebener Methode die Gene yfiF und yfgB entfernt, sodass am Ende nachfolgende Bakterienstämme für Infektionsversuche zur Verfügung standen. Alle *knock-outs* wurden mehrfach mittels PCR und Gelelektrophorese kontrolliert.

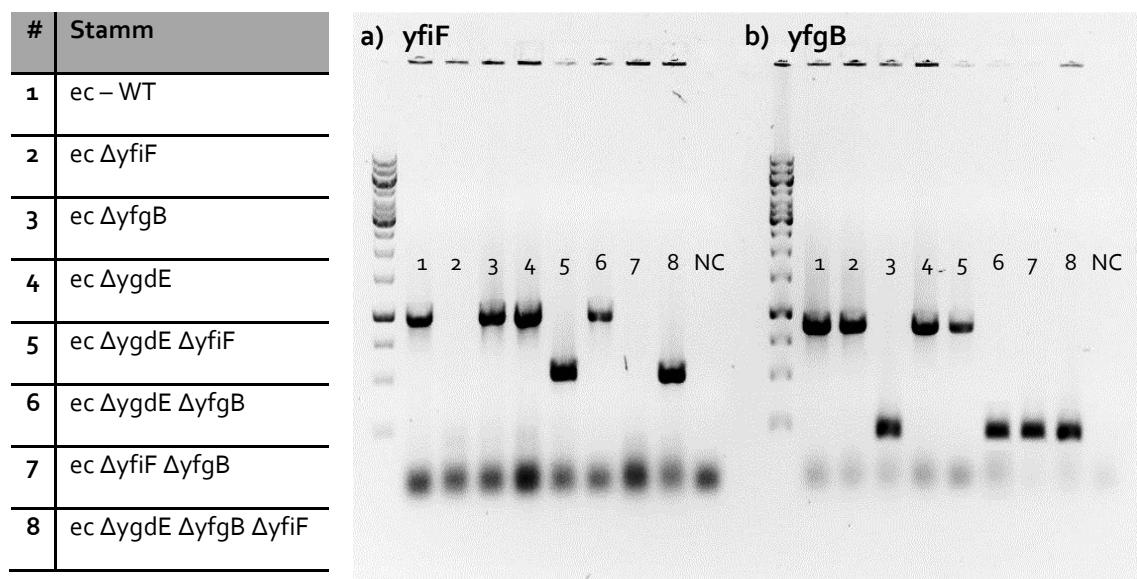


Abb. 17 Übersicht über die generierten *knock-out*-Stämme und abschließende Kontroll-PCR

Primer: a) yfiF up / yfiF down b) yfgB up / ygdE down

a) Die Bakterienstämme (2), (5), (7) und (8) besitzen keine Sequenz für yfiF oder nur noch eine stark verkürzte scar-Sequenz.

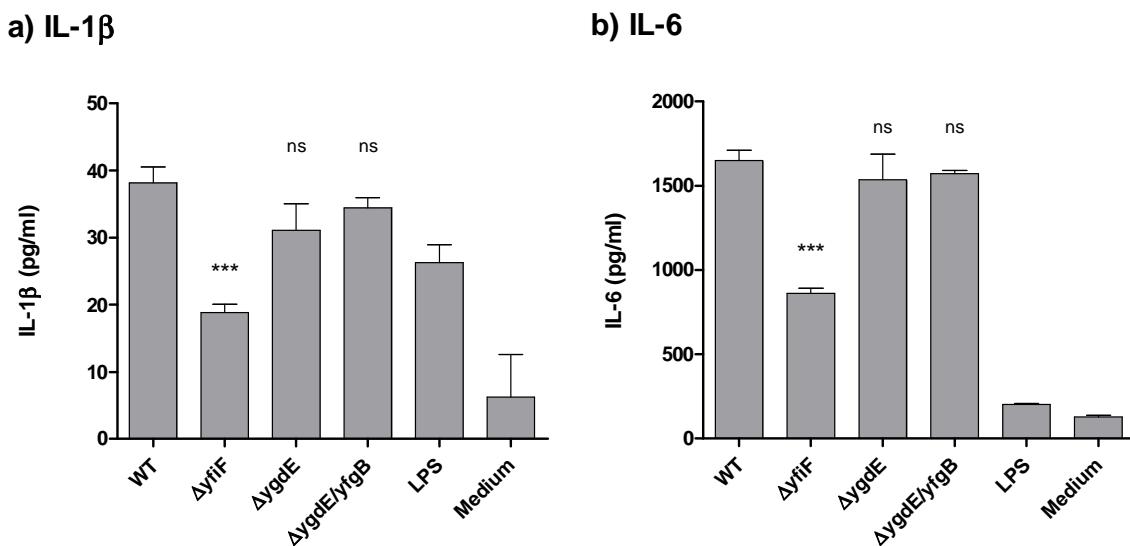
b) Die Bakterienstämme (3), (6), (7) und (8) weisen ein verkürzte scar-Sequenz für yfgB auf.

ec  $\Delta$ ygdE wurde uns freundlicherweise von AG Carell, LMU München, zu Verfügung gestellt und von ihnen auf den gelungenen KO des Gens kontrolliert. Der KO von yfiF der Stämme (2) und (7) basiert ebenso auf der uns von der AG Carell zur Verfügung gestellten ec  $\Delta$ yfiF Ausgangspopulation. Der fehlende Nachweis einer Bande erklärt sich dadurch, dass die entfernte DNA-Sequenz die homologen Sequenzen zu den von uns gewählten Primer enthielt und bestätigt ebenso den erfolgreichen KO des Gens.

#### 4.3.2. Infektion mit *E. coli* $\Delta$ yfiF bewirkt geringere Interleukin-Ausschüttung

Durch die Entwicklung der verschiedenen KO-Bakterienstämme wurde es möglich, vergleichende Infektionsstudien mit diesen durchzuführen. Dabei wurden Knochenmarkzellen mit den unterschiedlichen KO-Stämmen infiziert um anschließend die Interleukinspiegel der Überstände mittels ELISA zu untersuchen. Optimale Infektionsbedingungen wurden bei

einem Verhältnis der Bakterien zu den Zielzellen von 1:1 erreicht (*multiplicity of infection* (MOI) = 1).



**Abb. 18** Interleukin-Konzentrationen nach Infektion mit lebenden *E. coli* Bakterien

a) Interleukin-1 $\beta$ , b) Interleukin-6;  $2 \times 10^5$  Knochenmarkzellen/well wurden mit den unterschiedlichen Bakterienstämmen infiziert. Die IL-Konzentrationen der Überstände wurden am Morgen nach der Infektion mittels ELISA gemessen. Die statistischen Angaben beziehen sich jeweils auf die *E. coli* Wildtyp-Kontrollpopulation. (MOI=1; LPS=10  $\mu$ g/ml; One-way ANOVA with Tukey's Test)

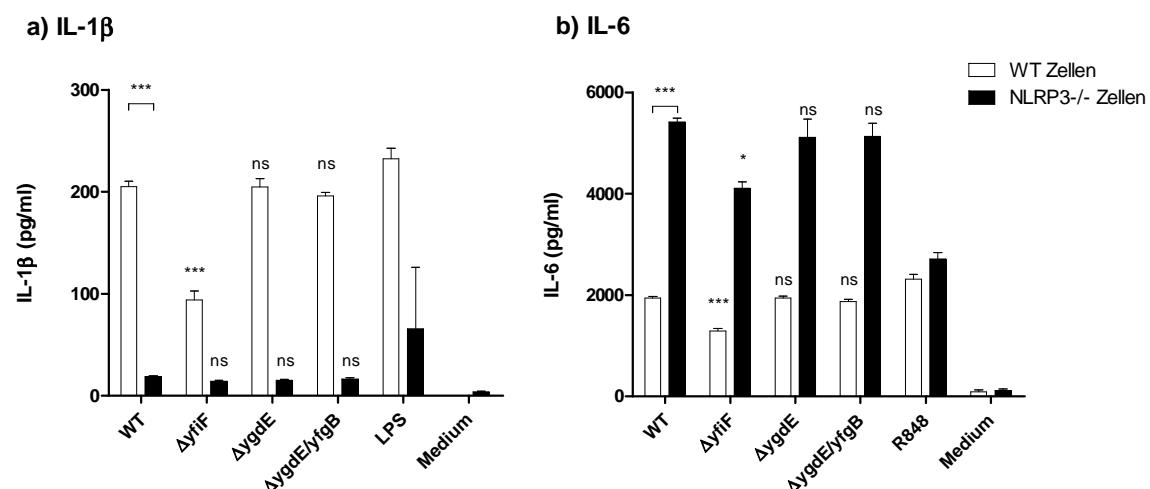
**Abb. 18** zeigt als Ergebnis eines Infektionsversuches mit verschiedenen KO-Bakterien die in den Überständen gemessenen Interleukinspiegel. Im Vergleich zur Negativkontrolle erweisen sie sich alle als signifikant erhöht. Beim Betrachten der verschiedenen Bakterienstämme untereinander lässt sich lediglich nach einer Infektion mit *E. coli*  $\Delta yifF$  eine Veränderung erkennen. Im Vergleich zur Wildtypkontrolle wird hier sowohl für IL-1 $\beta$ , als auch für IL-6 eine signifikante Verminderung der Konzentrationen ersichtlich, wohingegen *E. coli*  $\Delta ygdE$  und *E. coli*  $\Delta ygdE/yfgB$  keine Änderungen der Interleukinspiegel bewirken.

Dieser Versuch zeigt demnach einen ersten Zusammenhang zwischen dem KO des Gens *yifF* und der Zytokinausschüttung von Immunzellen nach einer Infektion. Zwar wird durch dieses Experiment der funktionelle Zusammenhang dessen nicht vollends geklärt, jedoch geben die Ergebnisse des Versuches ein erstes Indiz darauf, dass die Methyltransferase, welche im Gen *yifF* kodiert wird, durch die Methylierung von bakterieller RNA eine gewisse Immunogenität der Bakterien vermitteln könnte. Für diese Hypothese spräche die verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Immunzellen nach einer Infektion mit Bakterien, welchen dieses Gen und somit die Methyltransferase fehlt. Eine weitere Möglichkeit der veränderten Zytokinausschüttung nach einer Infektion mit *E. coli*  $\Delta yifF$  wäre ein durch den KO verändertes Wachstumsverhalten der Bakterien. Eine vergleichende Wachstumsanalyse

mittels mehrzeitiger OD-Messung zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen den WT- oder den verschiedenen KO-Bakterien (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.3. IL-1 $\beta$ -Ausschüttung ist eine NLRP3-abhängige Reaktion auf lebende Bakterien

Um diese Hypothese zu bestätigen und gleichzeitig den Effekt einer Caspasesaktivierung über m2A-unabhängige Wege zu minimieren sollte ein erneuter Infektionsversuch, diesmal nicht nur auf Knochenmarkzellen von Wildtyp-, sondern auch von NLRP3 $^{-/-}$  Mäusen durchlaufen werden. Ferner sollte untersucht werden, ob methylierte RNA ausschließlich eine Infektion mit lebenden, aktiven Bakterien anzeigt, wozu neben einer Infektion mit lebenden Bakterien auch eine Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien erfolgte.

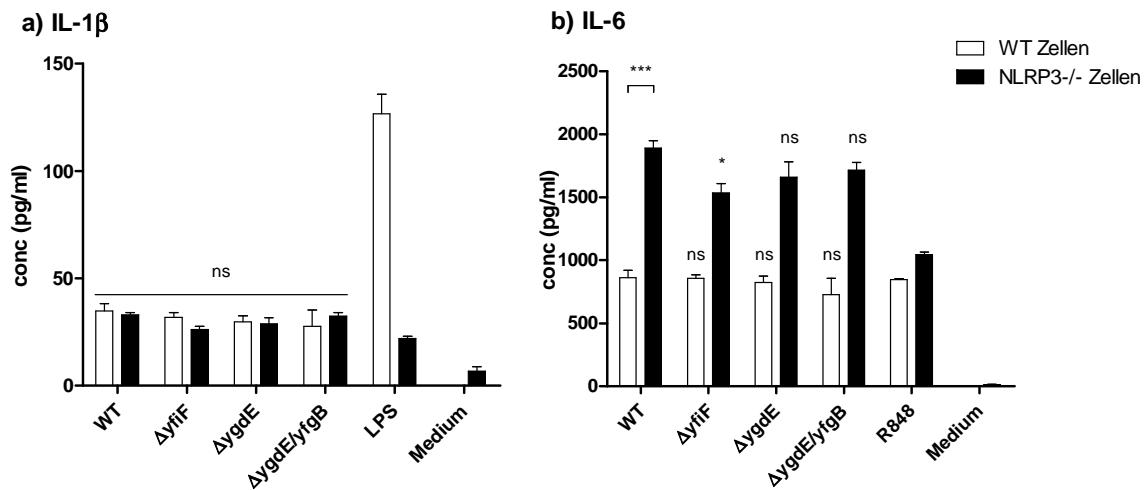


**Abb. 19** Interleukin-Ausschüttung von Wildtyp- und NLRP3 $^{-/-}$ -Knochenmarkzellen nach Infektion mit lebenden *E. coli* Bakterien

a) Interleukin-1 $\beta$ , b) Interleukin-6; Infiziert wurden je  $3 \times 10^5$  Knochenmarkzellen/well, gewonnen entweder aus Wildtyp- (weiß) oder NLRP3 $^{-/-}$ -Mäusen (schwarz). Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf die jeweilige WT-Kontrollgruppe. (MOI=1; LPS=10  $\mu$ g/ml; R848=1  $\mu$ g/ml; One-way ANOVA with Tukey's Test)

**Abb. 19** veranschaulicht das Ergebnis der Infektion mit lebenden Bakterien. Für Knochenmarkzellen von WT-Mäusen (weiß) zeigt sich wie bereits im vorherigen Versuch eine signifikante Abnahme der Konzentrationen von IL-1 $\beta$  und IL-6 nach einer Infektion mit *E. coli* ΔyifF im Vergleich zum WT. Betrachtet man die Werte der aus NLRP3 $^{-/-}$  gewonnenen Zellen (schwarz), so lässt sich lediglich eine generell geringe IL-1 $\beta$ -Antwort auf die Infektion erkennen. Diese ist zwar in jedem Fall signifikant niedriger als nach einer Infektion von WT-Zellen, ein Unterschied zwischen dem WT und *E. coli* ΔyifF bleibt jedoch aus. Für die IL-6-Antwort dieser NLRP3 $^{-/-}$ -Zellen wird zunächst eine starke Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe ersichtlich. Beim Betrachten der verschiedenen Bakterienstämme innerhalb

dieser  $NLRP3^{-/-}$  Population zeigt sich allerdings im Vergleich zur WT-Infektion erneut eine verminderte IL-6-Konzentration nach einer Infektion mit den  $\Delta$ YfiF-Bakterien.



**Abb. 20 Interleukin Konzentrationen nach Infektion mit Hitze-inaktivierten *E. coli* Bakterien**

a) Interleukin-1 $\beta$ , b) Interleukin-6; Infiziert wurden je  $3 \times 10^5$  Knochenmarkzellen/well, gewonnen entweder aus Wildtyp- (weiß) oder  $NLRP3^{-/-}$ -Mäusen (schwarz). Die Anzahl der lebenden Bakterien wurde mittels OD bestimmt. Nach der Inaktivierung bei  $60^{\circ}\text{C}$  wurden sie auf die gewünschte Konzentration verdünnt und den Knochenmarkzellen hinzugegeben. In diesem Versuch wurde ein Verhältnis von Bakterien zu Zellen entsprechend 1:1 gewählt. Die Signifikanzniveaus beziehen sich auf die jeweilige WT-Kontrollgruppe. (LPS=10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; R848=1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; One-way ANOVA with Tukey's Test)

Die Stimulation der Knochenmarkzellen mit Hitze-inaktivierten Bakterien ist in **Abb. 20** gezeigt. Im Fall von IL-1 $\beta$  gilt sowohl für die WT- als auch für die  $NLRP3^{-/-}$ - Zellen, dass die verschiedenen Bakterien untereinander kaum eine Differenz in den IL-1 $\beta$ -Konzentrationen aufweisen. Auffallend hierbei ist, dass sich eine Stimulation von WT- oder  $NLRP3^{-/-}$ - Zellen nicht in der Höhe der IL-1 $\beta$ -Sekretion unterscheiden, sondern auf ähnlich niedrigem Niveau bleiben. Betrachtet man die IL-6-Spiegel, zeigen sich für die WT-Zellen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Bakterienstämmen, wohingegen die  $NLRP3^{-/-}$ - Zellen nicht nur insgesamt höhere IL-6-Level aufweisen, sondern hierbei abermals eine Minderung unter Stimulation mit *E. coli*  $\Delta$ YfiF auffällt.

Vergleicht man nun die IL-1 $\beta$ -Spiegel der WT- Zellpopulationen nach einer Infektion mit lebenden und nach einer Stimulation mit abgetöteten Bakterien (**Abb. 19 a** und **24 a**), weiße Balken), so erkennt man, dass die IL-1 $\beta$ -Sekretion nach der Infektion mit lebenden Bakterien deutlich höher ausfällt als nach der Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien. Dabei zeigt sich auch bei einer direkten Gegenüberstellung der einzelnen Werte in jedem Fall ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ; One-way ANOVA mit Tukey's Test).

Demnach lassen sich aus den Ergebnissen dieses Experiments folgende zwei Rückschlüsse ziehen:

Zum einen ist die IL-1 $\beta$ -Sekretion als Immunreaktion der Knochenmarkzellen auf lebende, und nicht auf abgetötete Bakterien zu werten. Dies lässt sich an den erhöhten IL-1 $\beta$ -Spiegeln nach einer Infektion mit lebenden Bakterien im Vergleich zu denen nach einer Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien erkennen (vgl. **Abb. 19 a)** und **24 a)**). Zum anderen zeigt sich, dass diese IL-1 $\beta$ -Ausschüttung im Gegensatz zu m2A abhängig von NLRP3 und seinem Inflammasom verläuft. Dies zeigt sich anhand der deutlichen Abnahme an IL-1 $\beta$  nach einer Infektion von NLRP3<sup>-/-</sup>-Knochenmarkzellen (vgl. **Abb. 19 a)**).

In dieses Konzept passen auch die IL-1 $\beta$ -Konzentrationen nach einer Stimulation mit abgetöteten Bakterien. Da in dieser Versuchsanordnung die lebenden Bakterien als entscheidender Stimulus für die Immunzellen fehlen, zeigt sich sowohl zwischen den einzelnen Bakterienstämmen, als auch unter Wegfall von NLRP3 keine Veränderung der IL-1 $\beta$ -Werte und diese pendeln sich auf einem im Vergleich zur Lebendinfektion niedrigen Niveau ein (vgl. **Abb. 20 a)**).

Auffällig für die IL-6-Werte hingegen sind die deutlich erhöhten Werte der NLRP3<sup>-/-</sup>-Zellen gegenüber den WT-Zellen. Dieses durchaus interessante Phänomen war uns bisher nicht bekannt, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt (vgl. **Abb. 19** und **24 b)**).

Zusammenfassend ergibt sich also aus diesem Versuch, dass die beobachtete IL1- $\beta$  Ausschüttung eine Reaktion der Knochenmarkzellen auf lebende und nicht auf tote Bakterien darstellt, und diese Reaktion in einer NLRP3-abhängigen Art verläuft.

## 5. Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Erkenntnis, dass m<sub>2</sub>A im Vergleich zu anderen Modifikationen ausschließlich in der RNA von Prokaryoten vorkommt und zu einer IL-1 $\beta$ -Ausschüttung durch Knochenmarkzellen führt. Diese Beobachtung führte zu der Überlegung, dass Adenosinmodifikationen als singuläre Moleküle oder auch als Bestandteil von RNA das Verhalten von Immunzellen beeinflussen könnten. Als Vertreter dieser modifizierten Adenosine diente dabei m<sub>2</sub>A, anhand dessen die Hypothese aufgestellt wurde, dass spezifische methylierte Adenosine dazu befähigt sind, Immunzellen zu aktivieren. An den dargestellten Daten sieht man, dass das Molekül m<sub>2</sub>A in der Lage ist, Gr-1 $^+$ /CD11b $^+$  Immunzellen zu aktivieren und sie zu einer Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  anzuregen. Neben der Abhängigkeit von Caspase-1 zeigt sich für diese IL-1 $\beta$ -Sekretion eine Beteiligung von Adenosinrezeptoren, ein Zusammenhang welcher zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht beschrieben war. Weiterhin erkennt man, dass neben molekularem m<sub>2</sub>A auch unmodifiziertes Adenosin zu einer immunologischen Reaktion führen kann, wenngleich diese gegenüber m<sub>2</sub>A geringer ausfällt. Um dieses Phänomen hingehend seiner klinischen Relevanz prüfen zu können und um zu die Untersuchungen vom einzelnen Molekül m<sub>2</sub>A näher an die tatsächlichen Modifikationen bakterieller RNA bringen zu können, wurden im Rahmen dieser Dissertation *knock-out*-Bakterien hergestellt, welche durch den Verlust von Methyltransferasen einen geringeren Anteil an modifizierten Adenosinen in ihrer RNA enthalten sollten. Anhand von Infektionsversuchen mit den KO-Bakterien zeigt sich, dass eine IL-1 $\beta$ -Ausschüttung als Reaktion auf lebende Bakterien erfolgt und die Menge des sezernierten IL-1 $\beta$  möglicherweise durch den *knock-out* einer der RNA-Methyltransferasen herabgesetzt wird, was jedoch im folgenden noch ausführlich diskutiert werden soll. Zusammen implizieren diese Daten, dass modifizierte Adenosine wie m<sub>2</sub>A ein immunstimulatorisches Potential besitzen und möglicherweise für Immunzellen als neuartiges Erkennungsmuster im Sinne eines PAMP dienen könnten.

### 5.1. m<sub>2</sub>A als immunstimulatorisches Molekül

Die Adenosinmodifikation m<sub>2</sub>A konnte bereits im Jahr 1972 erstmals charakterisiert und aus *E. coli* Bakterien isoliert werden (Saneyoshi et al., 1972). Dennoch finden sich auch in der aktuellen Literatur nur spärlich Beschreibungen über die Funktion des Moleküls. So liest man beispielsweise von Studien über die Ausscheidung von methylierten Purinnukleosiden wie

m<sub>2</sub>A im Urin, welche die Möglichkeit einer Verwendung als Biomarker für Krebserkrankungen untersuchen (Li et al., 2009). Für *E. coli* Bakterien konnte kürzlich gezeigt werden, dass m<sub>2</sub>A neben anderen Modifikationen einen Einfluss auf die Anordnung der Anticodonschleife sowie die Codonerkennung von tRNA nehmen kann (Cantara et al., 2012). Der Frage nach einem Selektionsvorteil der bakterienspezifischen Modifikation m<sub>2</sub>A ging bisher lediglich die Arbeitsgruppe Parker et al. nach, jedoch untersuchten sie dabei die selektive Aktivität von m<sub>2</sub>A gegen *Mycobacterium tuberculosis*, sowie den bakterienspezifischen Metabolismus des Moleküls. Dabei konnten sie zeigen dass m<sub>2</sub>A durch eine *M. tuberculosis* spezifische Adenosinkinase zu großen Teilen zu Methyl-AMP und teils zu Methyl-ATP umgebaut wird, was in diesem Modell zu einer Inhibition der bakteriellen Proteinsynthese führte (Barrow et al., 2003; Parker et al., 2004; Parker et al., 2007). Eine Untersuchung des immunstimulatorischen Effektes auf Immunzellen fand dabei jedoch ebenso wenig wie in anderen Studien statt, so dass diese Fragestellung erstmals im Rahmen dieser Promotionsarbeit adressiert wurde.

## 5.2. m<sub>2</sub>A aktiviert undifferenzierte myeloide Zellen

Zur Abklärung der Frage, welche Zellart sich auf eine Stimulation mit m<sub>2</sub>A reagibel zeigt, wurden Stimulationsversuche nach magnetischer Zellsortierung mittels ELISA und FACS ausgewertet. Innerhalb der Versuchsreihe wurden magnetische Zellsortierungen auf die Oberflächenmarker b<sub>220</sub>, Gr-1 und CD<sub>11b</sub> vorgenommen, bei der anschließenden FACS-Analyse wurden unter anderen die Moleküle b<sub>220</sub>, CD<sub>11b</sub>, CD<sub>80</sub> und Gr-1 angefärbt und hingehend ihrer Expression untersucht.

### 5.2.1. Responder-Zellen exprimieren Gr-1 und eine intermediäre Anzahl an CD<sub>11b</sub>

Das Molekül b<sub>220</sub> ist eine Isoform von CD45 und wird auch als CD45R bezeichnet. Obwohl es auch auf einer Untergruppe von T- und NK-Zellen vorkommt, findet es allgemein meist als pan-B-Zell-Marker Verwendung (Watanabe et al., 1994).

CD<sub>11b</sub> steht für Integrin alpha M und bildet zusammen mit CD<sub>18</sub> ein heterodimeres Integrin, welches unter dem Namen *macrophage-1 antigen* (Mac-1) oder *complement receptor 3* (CR<sub>3</sub>) bekannt ist. Als Integrin spielt CD<sub>11b</sub> bei der Leukozytenadhäsion und -migration eine Rolle, ist aber auch an verschiedenen Entzündungsprozessen wie der Phagozytose, der Chemotaxis oder der Neutrophilenaktivierung beteiligt. Dementsprechend wird CD<sub>11b</sub> auf verschiedenen zur Phagozytose befähigten Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert. Zu ihnen

zählen vor allem Monozyten und Makrophagen, jedoch auch Granulozyten, Dendritische Zellen und NK Zellen (Solovjov et al., 2005).

Als Marker für den zellulären Aktivierungsgrad wurde in den FACS-Färbungen CD80 gewählt. CD80 ist ein Glykoprotein, welches der Ig-Superfamilie angehört und neben CD86 eine entscheidende Rolle an der T-Zellaktivierung nimmt (Peach et al., 1995). CD80 wird sowohl von aktivierte B- und T-Zellen als auch von aktivierte Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und kann demnach als genereller, für den Aktivierungsgrad der Zellen repräsentativer Oberflächenmarker genutzt werden (Van Gool et al., 1996).

Gr-1, auch bekannt als Ly-6G/Ly-6C, ist ein GPI-Ankerprotein, welches transient auf Knochenmarkzellen der monozytären Zelllinie exprimiert wird. Als myeloides Differenzierungsantigen kommt es somit hauptsächlich auf Granulozyten, jedoch auch auf Makrophagen vor. Im Knochenmark korreliert die Gr-1 Expression direkt mit der Granulozytendifferenzierung und -maturierung (Fleming et al., 1993).

Unsere Versuche zeigen deutlich, dass die auf m2A reagiblen Zellen dieses Oberflächenmolekül Gr-1 konsistent exprimieren und es somit ein eindeutiges Charakteristikum der *responder*-Zellen darstellt. Dies erklärt sich dadurch, dass innerhalb der Gr-1<sup>+</sup> sortierten Zellen die höchsten IL-1 $\beta$ -Spiegel und der höchste Anteil an aktivierte Zellen gemessen wurde. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Sortierung nach dem Oberflächenmarker CD11b wider Erwarten zunächst keine erhöhten IL-1 $\beta$ -Werte oder erhöhte Aktivierungsraten. Hier finden sich die höchsten Werte vielmehr in der negativ sortierten Fraktion. Mittels FACS-Analyse lässt sich jedoch erkennen, dass auch in dieser Fraktion CD11b exprimierende Zellen enthalten sind, welche allerdings eine geringere Anzahl an Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren und als CD11b intermediäre Zellen bezeichnet werden. Die geringere Expressionsrate pro Zelle scheint dabei eine mögliche Erklärung dafür zu liefern, warum die durch m2A aktivierte Zellen zwar eindeutig CD11b positiv sind, jedoch vor der Aktivierung nicht von der Zellsortierung erkannt werden. Diese Überlegung wird weiter dadurch bekräftigt, dass es in der FACS-Auswertung so scheint, als ob eine Aktivierung der Zellen zu einer Hochregulation der CD11b Expression führt.

### 5.2.2. *Responder*-Zellen entspringen der myeloiden Zelllinie

Als Ergebnis lässt sich somit festhalten, dass die *responder*-Zellen sowohl Gr-1, als auch CD11b positiv sind, also Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>. Beides sind Moleküle die vor allem auf Zellen der monozytären Zelllinie exprimiert werden, also auf Monozyten, Makrophagen und auch Granulozyten. Beim

Vergleich dieses Ergebnisses mit in der Literatur beschriebenen Expressionsmustern zeigt sich, dass die Kombination von Gr-1 und CD11b vor allem auf Zellen myeloiden Ursprungs zu finden ist, welche noch nicht vollständig ausgereift sind. Einen Überbegriff findet diese heterogene Gruppe aus myeloiden Vorläuferzellen und unreifen myeloiden Zellen (IMCs) beispielsweise in der Bezeichnung als *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) (Gabrilovich et al., 2009). Bei ihnen handelt es sich nicht um eine klar umschriebene Subpopulation an myeloiden Zellen, sondern vielmehr um eine heterogene Population aktiverter IMCs, welche von der vollständigen Differenzierung hin zu reifen Zellen abgehalten wurden (Youn et al., 2008). In Mäusen sind sie spezifisch durch die Ko-Expression der Oberflächenmarker Gr-1 und CD11b charakterisiert (Kusmartsev et al., 2004). Ihre Bezeichnung erhielten die MDSCs ursprünglich auf Grund ihrer immunsuppressiven Wirkung auf T-Zellen im Rahmen von Tumorerkrankungen, jedoch steigt die Zahl an Studien, welche ebenso eine Beteiligung dieser Zellepopulation an der Immunregulation bei bakteriellen oder parasitären Infektionen, bei akuten oder chronischen Entzündungsreaktionen oder bei Sepsis, traumatischem Stress und Transplantationen nachweisen können. So wurde eine Expansion dieser Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellpopulation bereits im Rahmen einer akuten Toxoplasmose (Voisin et al., 2004), einer polymikrobiellen Sepsis (Delano et al., 2007), einer akuten Infektion mit *Listeria monocytogenes* und einer chronischen Infektion mit *Leishmania major* (Sunderkotter et al., 2004), einer *Candida albicans*-Infektion (Mencacci et al., 2002), einer Infektion mit Helminthen (Gomez-Garcia et al., 2005), sowie in Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Haile et al., 2008) beobachtet.

In normalem Mausknochenmark finden sich bereits 20-30% an Zellen mit diesem Phänotyp, wohingegen sie in lymphatischen Organen kaum vorkommen. Unter physiologischen Bedingungen wandern sie zu verschiedenen peripheren Organen und differenzieren dort zu reifen Makrophagen, DCs oder Granulozyten, wohingegen eine Aktivierung mit Differenzierungsarrest und Expansion dieser Zellpopulation lediglich unter pathologischen Bedingungen zu beobachten ist (Gabrilovich et al., 2009).

Obwohl es durch solche Erkenntnisse mittlerweile gesichert scheint, dass die Zellen eine Regulationsfunktion im Rahmen von Entzündungsreaktionen übernehmen, ist ihre exakte Funktion letztlich noch nicht vollständig geklärt. Dennoch sind sie für diese Arbeit auf Grund der Tatsache interessant, dass für diese Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellpopulation in diversen Studien eine IL-1 $\beta$  Sekretion beschrieben wurde. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass diese Zellen im Mausmodell der autoimmun-vermittelten Enzephalomyelitis für die Differenzierung von naiven T-Vorläuferzellen hin zu Th17-Zellen verantwortlich sind und dass dieser Effekt

eindeutig auf die IL-1 $\beta$  Ausschüttung der Gr-1 $^{+}$ /CD11b $^{+}$  Zellen zurückzuführen ist (Yi et al., 2012). Neuste Studien konnten sogar zeigen, dass Chemotherapeutika wie Gemcitabine oder 5-Fluoruracil eine IL-1 $\beta$  Ausschüttung über eine Aktivierung von NLRP3 und Caspase-1 vermitteln (Bruchard et al., 2013).

Interpretiert man nun diese Beobachtungen und die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund, dass IL-1 $\beta$  zwar auch in B-Lymphozyten, NK-Zellen und Epithelzellen, jedoch hauptsächlich in myeloiden Zellen wie Monozyten, Gewebsmakrophagen und DCs exprimiert wird (Contassot et al., 2012; Dinarello, 2009), so scheint es als sehr wahrscheinlich, dass es sich bei der gesuchten *responder*-Zellpopulation um eine ähnliche heterogene Gruppe aus Vorläuferzellen und IMCs handelt wie zuvor beschrieben.

Ferner liefert diese Arbeit Hinweise darauf, dass eine Aktivierung der *responder*-Zellen neben einer Hochregulation an CD80, auch in einer Erhöhung der CD11b Expression münden könnte. Die verstärkte Expression an CD80 ist dabei als Zeichen der generellen Aktivierung der Zellen zu verstehen, wohingegen dies für CD11b nicht gelten dürfte. Vielmehr ist eine Hochregulation von CD11b in der Literatur meist als Zeichen der Reifung und Ausdifferenzierung von myeloiden Vorläuferzellen bewertet. Dabei nutzte man CD11b nicht nur als übergreifenden Reifungsmarker für Zellen der myeloiden Linie (Nakajima et al., 2006), sondern auch als Richtwert für die Ausreifung spezifischer phagozytierender Zelllinien. Neben Neutrophilen (Rizzi et al., 2007) und NK-Zellen (Penafuerte et al., 2009), wurde CD11b hierbei auch als Marker für die phänotypische Differenzierung von myeloiden Vorläufern zu Monozyten und Makrophagen verwendet (Bertagnolo et al., 2011). Im Menschen diente eine CD11b Hochregulation unter anderem auch als Zeichen der DC-Reifung (Platzer et al., 2004). Hieraus ergäbe sich letztlich als mögliche Hypothese, dass eine Hochregulation von CD11b als Reaktion auf eine Aktivierung durch m2A einer Ausreifung und spezifischen Differenzierung der *responder*-Zellen entsprechen könnte.

In summa bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit somit eine Zuordnung der *responder*-Zellen zur myeloiden Zelllinie, was sich vor allem an Hand der FACS-Färbungen und der im ELISA gemessenen IL-1 $\beta$ -Werte der magnetisch sortierten Zellen zeigt. Auch dadurch, dass in der Literatur vor allem myeloide Zellen mit einer IL-1 $\beta$ -Sekretion in Verbindung gebracht werden, wird diese Zuordnung weiter erhärtet. Aus diesen Gründen lässt sich insgesamt als Interpretation der Ergebnisse mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit sagen, dass die *responder*-Zellpopulation vor allem aus undifferenzierten myeloiden Progenitorzellen besteht.

### 5.3. m<sub>2</sub>A wirkt auf verschiedene Adenosinrezeptoren

#### 5.3.1. Aktivierung von Adenosinrezeptoren verändert die Zytokinsekretion von Immunzellen

Neben der Suche nach dem *responder*-Zelltyp sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Rezeptorenklasse untersucht werden, welche an der Erkennung von m<sub>2</sub>A beteiligt ist. Da sich im Vorfeld gezeigt hatte dass die m<sub>2</sub>A-abhängige IL-1 $\beta$  Sekretion durch Caspasen vermittelt wird, wurde zunächst der bekannteste Weg der Caspasenaktivierung untersucht. Beim Stimulationsversuch auf NLRP<sub>3</sub><sup>-/-</sup> und P2X<sub>7</sub><sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen konnte eine Beteiligung des NLRP<sub>3</sub>-Inflammasoms jedoch eindeutig ausgeschlossen werden. Nicht zuletzt auf Grund der Kontrollstimulation mit Adenosin innerhalb dieses Versuches, welche ihrerseits eine im Vergleich zur LPS-Kontrolle erhöhte IL-1 $\beta$  Ausschüttung zeigte, rückten nun die verschiedenen Adenosinrezeptoren in den Mittelpunkt der Untersuchungen.

Neben ersten Versuchen mit dem unspezifischen Adenosinrezeptorantagonisten Coffein wurde hierfür auch eine Inhibition der Caspasen mittels zVAD unternommen. Interessanterweise zeigte sich dabei neben der bereits bekannten Caspasen-Abhängigkeit einer m<sub>2</sub>A-Stimulation, dass die IL-1 $\beta$  Sekretion nach einer Stimulation mit Adenosin ebenso Caspasen-abhängig abläuft - ein Zusammenhang, welcher zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben war. In der Folge veröffentlichte jedoch die Arbeitsgruppe um Chiu eine Studie über die Gedächtnisbildung von Mäusen nach hypoxischem Gehirnschaden, welche zeigte, dass Adenosin über eine Aktivierung von Adenosinrezeptoren zu einer Aktivierung der Caspase-1 führt (Chiu et al., 2012).

Mit der Kenntnis dieses Zusammenhangs wurden nun Stimulationsversuche mit dem A<sub>1</sub>R spezifischen Rezeptorantagonisten DPCPX (Martinson et al., 1987) sowie dem A<sub>2a</sub>R selektiven Inhibitor ZM 241385 (Palmer et al., 1995) durchgeführt. Als Interpretation der Ergebnisse dieses Versuches entstand als erste Hypothese, dass eine Aktivierung von A<sub>1</sub>R zu einer Erniedrigung der IL-1 $\beta$  und Erhöhung der IL-6-Sekretion führt. Eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R hingegen vermag die IL-1 $\beta$  Spiegel zu steigern und das ausgeschüttete IL-6 zu mindern. Durch die Zugabe der spezifischen Antagonisten gegen A<sub>2b</sub>R und A<sub>3</sub>R wurde diese Hypothese um die Aussage erweitert, dass sich A<sub>1</sub>R und A<sub>3</sub>R, ebenso wie A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R hinsichtlich ihrer Zytokinausschüttung gleich verhalten (vgl. Tab. 5).

Rezeptor	IL-1 $\beta$	IL-6
A <sub>1</sub> R	↓	↑
A <sub>2a</sub> R	↑	↓
A <sub>2b</sub> R	↑	
A <sub>3</sub> R	↓	

Tab. 5 Übersicht über die in dieser Arbeit beobachteten Effekte der Rezeptorstimulation auf die Zytokinausschüttung

### 5.3.2. Immunmodulatorische Wirkung der veränderten Zytokinproduktion

Die Einordnung der von uns beobachteten Veränderung in der Zytokinausschüttung und der daraus resultierenden Hypothese gestaltet sich auf Grund der Menge an unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Effekten von Adenosin schwierig. Dabei ist besonders im Rahmen von inflammatorischen Erkrankungen die Studienlage über die Effekte einer Stimulation der verschiedenen Adenosinrezeptorklassen und die damit verbundene Änderung im Zytokinprofil äußerst kontrovers. Zwar schrieb der überwiegende Anteil der Studien Adenosin bisher eine anti-inflammatorische Wirkung zu, jedoch finden sich auch zahlreiche Autoren, welche pro-inflammatorische Effekte für einzelne Rezeptorsubtypen beobachten konnten (Hasko et al., 2008). Heute geht man deswegen vermehrt davon aus, dass die Wirkung von Adenosin nicht als grundsätzlich als pro- oder anti-inflammatorisch zu werten ist, sondern dass Adenosin den Ablauf einer Immunreaktion zu regulieren vermag (Hasko et al., 2004; Karmouty-Quintana et al., 2013) und eine Aktivierung der verschiedenen Adenosinrezeptoren vielmehr verschiedene zelluläre Antwortmöglichkeiten liefert, welche darauf abzielen, die generelle Gewebshomöostase wiederherzustellen (Antonioli et al., 2013).

#### 5.3.2.1. Adenosinrezeptor A<sub>2a</sub>

Am weitesten erforscht und gut beschrieben sind dabei die Erkenntnisse über den Adenosinrezeptor A<sub>2a</sub>. Für ihn konnte sowohl in in-vitro als auch in in-vivo Studien eine anti-inflammatorische Wirkung gezeigt werden. Beispielsweise führt eine direkte Aktivierung von A<sub>2a</sub>R auf naiven T-Zellen zu einer Hemmung in deren Entwicklung zu Th<sub>1</sub>- oder Th<sub>2</sub>-Helperzellen und in ihrer Effektorfunktion (Csoka et al., 2008). Zusätzlich dazu konnte gezeigt werden, dass A<sub>2a</sub>R eine lang anhaltende T-Zell Anergie vermittelt und zur Generierung von regulatorischen T-Zellen beiträgt. Die in derselben Studie gemessene Expression von IL-6 erwies sich dabei unter A<sub>2a</sub>R Aktivierung als stark vermindert (Zarek et al., 2008). In reifen DCs führt eine A<sub>2a</sub>R Aktivierung zu einer Veränderung des Zytokinprofils von einem pro- hin zu einem anti-inflammatorischen mit einer erniedrigten Produktion von IL-6, IL-12 und IFN- $\alpha$ .

(Panther et al., 2001). In Neutrophilen bewirkt Adenosin über A<sub>2a</sub>R eine Herunterregulation der Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche und damit eine verminderte Auswanderung aus dem Gefäßsystem ins entzündete Gewebe (Cronstein et al., 1992). Neben diesen für einzelne Zelltypen beschriebenen anti-inflammatoryischen Effekten, war es jedoch die Arbeitsgruppe um Ohta, welche 2001 anhand einer Studie mit drei verschiedenen Inflammationsmodellen die entzündungshemmende Wirkung von A<sub>2a</sub>R in-vivo belegen konnte (Ohta et al., 2001). Dabei wurden in einem der Modelle A<sub>2a</sub>R-KO-Mäuse mit Endotoxin behandelt, worunter sich im Vergleich zu den WT-Mäusen nicht nur prozentual niedrigere Überlebensraten, sondern auch erhöhte IL-6- und erniedrigte IL-1 $\beta$ -Serumwerte ergaben. Vor allem diese Studie stimmt somit mit den in dieser Arbeit in Bezug auf A<sub>2a</sub>R gewonnenen Ergebnissen überein und bekräftigt die Hypothese, dass eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R erhöhte IL-1 $\beta$ - und erniedrigte IL-6-Werte bewirkt.

Neben diesen etablierten anti-inflammatoryischen Effekten, zeigen jedoch neuere Studien, dass die eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R unter bestimmten Umständen auch zur Aufrechterhaltung von inflammatoryen Prozessen beitragen kann. So scheint A<sub>2a</sub>R zwar im Rahmen von akuten Erkrankungsgeschehen anti-inflammatoryisch zu wirken, bei chronischen Erkrankungen scheinen sich dessen Effekte jedoch eher pro-inflammatoryisch auszuwirken (Karmouty-Quintana et al., 2013). Von besonderer Relevanz für diese Arbeit ist hierbei eine aktuelle Studie von Ouyang et al., welche in-vitro an Makrophagen demonstrieren konnten, dass eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R, nach einer initialen Inflammasomaktivierung durch ATP und LPS zu einer Aufrechterhaltung der Inflammasomantwort und dadurch zu einer gesteigerten IL-1 $\beta$ -Sekretion führt. In den in-vivo Modellen an A<sub>2a</sub>R-KO Mäusen konnten sie ferner zeigen, dass diese Adenosin-gestützte Inflammasomaktivierung im Modell des LPS-induzierten Leberschadens zu signifikanten Unterschieden in Hämmorrhagie und Nekrose der Leberzellen und zu niedrigeren Werten der IL-1 $\beta$ -mRNA, Caspase-1 und von IL-1 $\beta$  im Serum führte. In einem zweiten Modell eines sterilen Leberschadens durch einen toxischen Insult mittels Thioacetamid bestätigte sich die niedrigere Rate an Hämmorrhagien, Nekrose und Fibrose in den Leberzellen der A<sub>2a</sub>R-KO Mäusen und es konnten erneut verminderte IL-1 $\beta$ -mRNA Spiegel in der Leber gemessen werden (Ouyang et al., 2013). Somit kann diese Studie in Bezug auf eine pro- oder anti-inflammatoryische Wirkung des Rezeptors zwar ebenso keine finale Aussage treffen, ordnet sich aber folgerichtig in die neuesten Einschätzungen bezüglich der Adenosinrezeptoren bei chronischen Erkrankungen ein. In Bezug auf die Auswirkung auf die Interleukinausschüttung bestätigt sie allerdings eindeutig die auch von uns erhobene Hypothese, dass eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R zu einer erhöhten IL-1 $\beta$ -Ausschüttung führt.

### 5.3.2.2. Adenosinrezeptor A<sub>1</sub>

Betrachtet man hingegen die für die anderen Adenosinrezeptoren beschriebenen Phänomene, so ist die Studienlage weit weniger eindeutig. So zeigte sich für A<sub>1</sub>R in verschiedenen Inflammationsmodellen mit KO-Mäusen zwar eine anti-inflammatoryische Wirkung, jedoch sind für ihn ebenso einige pro-inflammatoryische Effekte beschrieben. In einem repräsentativen Mausmodell für multiple Sklerose konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass eine A<sub>1</sub>R Aktivierung zu einer geringeren Neuroinflammation und Demyelinisierung führte (Tsutsui et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen an einem Ischämie/Reperfusionsmodell der Mausniere. Dabei zeigten A<sub>1</sub>R-KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen höhere Kreatininspiegel und histologisch dramatischere Nierenschäden (Lee et al., 2004). Interessanterweise wurden in beiden Studien auch die Serumwerte verschiedener Zytokine gemessen, wobei sich bei beiden Studien zeigte, dass - wie in unseren Experimenten - im jeweiligen Inflammationsmodell eine Aktivierung von A<sub>1</sub>R zu einer Erniedrigung der IL-1 $\beta$  Spiegel führte. Im Gegensatz zu diesen Studien gibt es allerdings auch verschiedene A<sub>1</sub>R vermittelte Effekte, denen man eine eher pro-inflammatoryische Wirkung zuspricht. So bewirkt A<sub>1</sub>R unter anderem eine verstärkte Chemotaxis von DCs (Schnurr et al., 2004) und Neutrophilen (Rose et al., 1988), ebenso wie eine verstärkte Adhärenz der Neutrophilen am Endothel (Cronstein et al., 1992). In Bezug auf die Wirkung von A<sub>1</sub>R auf die IL-6-Sekretion findet sich eine Studie der Arbeitsgruppe Straub et al., welche die sympathische Stimulation von Zellen der Milz in Mäusen mit Arthritis untersuchte. Im Rahmen dieser Studie, fanden sie heraus, dass eine Stimulation von A<sub>1</sub>R in diesem Modell zu einer IL-6-Ausschüttung führt (Straub et al., 2011). Im Gegensatz dazu steht jedoch eine ältere Arbeit derselben Arbeitsgruppe, welche in einem anderen Setting in Milzen gesunder Mäuse für A<sub>1</sub>R eine Erniedrigung und für A<sub>2a</sub>R eine Erhöhung der IL-6-Ausschüttung beobachtete (Straub et al., 2002).

### 5.3.2.3. Adenosinrezeptor A<sub>3</sub>

Besonders schwierig ist eine Einordnung des Rezeptors A<sub>3</sub>R. Zwar wurde ihm bereits im Jahr 2000 eine wichtige Rolle, sowohl bei pro- als auch anti-inflammatoryischen Antworten zugeschrieben (Salvatore et al., 2000), jedoch ist seine Funktion bis heute nicht vollends verstanden. A<sub>3</sub>R ist neben A<sub>1</sub>R an der Chemotaxis von Neutrophilen beteiligt (Chen et al., 2006) und spielt eine Rolle bei der Degranulation von Mastzellen (Salvatore et al., 2000). Neue Erkenntnisse über seine Wirkung im Rahmen von Inflammation lieferte 2011 die Forschungsgruppe Lee et al., welche einen neuen selektiven A<sub>3</sub>R Agonisten entwickeln

konnten (Lee et al., 2011). Mit diesem konnten sie *in vitro* an LPS-stimulierten RAW 264.7 Mausmakrophagen zeigen, dass eine Aktivierung von A<sub>3</sub>R zu einer verminderten Expression von pro-inflammatorischen Biomarkern, wie iNOS, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt. Im zusätzlich getesteten *in vivo*-Endotoxin Model beobachteten sie unter A<sub>3</sub>R Stimulation neben einer erhöhten Überlebensrate ebenso erneut eine Suppression von IL-1 $\beta$ .

#### **5.3.2.4. Adenosinrezeptor A<sub>2b</sub>**

Der Rezeptor A<sub>2b</sub>R zählt ebenso wie A<sub>2a</sub>R zu den Hauptadenosinrezeptoren auf DCs des Knochenmarks (Wilson et al., 2009) und Makrophagen (Kreckler et al., 2006). Für ihn gibt es neben *in-vivo* Modellen, welche über eine pro-inflammatorische Wirkung berichten (Kolachala et al., 2008a; Kolachala et al., 2008b), ebenso Studien über seine anti-inflammatorische Wirkung. Beispielsweise verstärkt eine A<sub>2a</sub>R-Blockade die Aktivierung von DCs (Cekic et al., 2012) oder hemmt zusammen mit A<sub>2a</sub>R die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  (Kreckler et al., 2006). Auch in Bezug auf die Zytokinproduktion finden sich kontroverse Daten. Zu den Ergebnissen dieser Arbeit passende Daten liefert dabei eine Studie aus dem Jahr 2006 von der Arbeitsgruppe Yang et al. Sie konnten zeigen, dass die basalen Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 in A<sub>2b</sub>R-KO-Mäusen doppelt so hoch sind wie in WT-Mäusen. Eine zusätzliche Erhöhung dieser Werte zeigte sich für die KO-Mäuse nach einer Stimulation mit dem Endotoxin LPS (Yang et al., 2006). Diese postulierte IL-6-Erniedrigung durch A<sub>2b</sub>R steht jedoch im Kontrast zu Ergebnissen aus anderen Modellen. Im COPD-Model zeigte sich, dass glatte Muskelzellen unter A<sub>2b</sub>R Aktivierung IL-6 sezernieren (Zhong et al., 2004; Zhou et al., 2010). Ferner zeigt sich für A<sub>2b</sub>R eine IL-6-Ausschüttung aus Nierengewebe im Model der chronischen Nierenerkrankung (Dai et al., 2011) und aus Astrozyten in einem Model für Krampfanfälle (Vazquez et al., 2008). Zwar konnten Yang et al. ihre *in-vivo* beobachtete IL-6-Erniedrigung auch in primären Makrophagen der KO-Mäuse bestätigen, allerdings gibt es auch Studien, die diese Wirkung in Makrophagen bezweifeln. So veröffentlichten Ryzhov et al. im Jahr 2008 eine Studie, die *in vivo* und in Makrophagen eine IL-6-Erhöhung durch A<sub>2b</sub>R beschreiben konnte (Ryzhov et al., 2008).

Anhand dieser konträren Auswirkungen zeigt sich ein Hauptproblem bei der Beurteilung der verschiedenen Adenosinrezeptoren hingehend ihres immunologischen Modulationsvermögens und ihrer Zytokinausschüttung: Auf Grund der vielfältigen Verteilung auf den unterschiedlichen Zellen des Organismus, lässt sich nur sehr selten eine einheitliche Wirkung für die einzelnen Subklassen der Adenosinrezeptoren ausmachen. Infolge dessen kann zum einen unsere erste Hypothese durch den Vergleich mit der aktuellen Literatur weder endgültig

bestätigt noch widerlegt werden, zum anderen erscheint es sinnvoll sich zur weiteren Beurteilung der Unterschiede zwischen Adenosin und m2A an den Beobachtungen einer bestimmten Zellart zu orientieren. Da es sich bei den *responder*-Zellen dieser Arbeit um Zellen monozytären Ursprungs handelt und diese Zellen auch mögliche Erklärungen für die zweite Hypothese der Inhibitorenversuche liefern können, soll auf sie nachfolgend im Speziellen eingegangen werden.

### 5.3.3. m2A wirkt verstärkt über die Rezeptoren A<sub>2a</sub> und A<sub>2b</sub>

Die zweite Hypothese, die sich aus den Versuchen mit den Adenosinrezeptorinhibitoren ergibt, besagt dass m2A seine Wirkung eher über A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R entfaltet, wohingegen ein Adenosineffekt eher an A<sub>1</sub>R und A<sub>3</sub>R zu erkennen ist. Ausgehend von unseren *responder*-Zellen, bietet das bisherige Wissen über die Zellen der monozytären Linie verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diese Hypothese:

Neben der Tatsache, dass auf diesen Zellen alle vier Rezeptorsubtypen zu finden sind, wird heute nämlich allgemein angenommen, dass die Oberflächenexpression der Adenosinrezeptoren sowohl durch die Entwicklung, als auch durch die Aktivierung von Makrophagen und DCs beeinflusst wird (Hasko et al., 2012). Diese Unterschiede in den Expressionsmustern während verschiedener Stadien der Entzündung erscheinen wichtig für die Feinabstimmung der Immunantwort durch die Adenosinrezeptoren, mit dem grundsätzlichen Ziel einer Wiederherstellung der Homöostase zu erreichen (Hasko et al., 2012). Umgekehrt konnte aber auch gezeigt werden, dass Adenosinrezeptoren die Differenzierung und Reifung von Zellen des mononukleären Phagozytosesystems beeinflussen. In der Anwesenheit von Adenosin entwickeln sich Monozyten durch eine A<sub>1</sub>R Aktivierung zu multinukleären phagozytierenden Riesenzellen, wohingegen eine A<sub>2</sub>R Stimulation diese Differenzierung verhindert (Merrill et al., 1997). In ähnlicher Weise kann unter gewissen Umständen A<sub>1</sub>R die Bildung von mehrkernigen Osteoklasten aus Monozyten bewirken (Kara et al., 2010). Außerdem gibt es neue Hinweise darauf, dass eine A<sub>2b</sub>R Stimulierung eine nicht-klassische Entwicklung von DCs aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und Monozyten bewirkt (Novitskiy et al., 2008).

Diese verschiedenen, teils sehr dynamischen Zusammenhänge zwischen der Reifung und Entwicklung von monozytären Zellen und der Aktivierung von Adenosinrezeptoren, liefern auch eine erste mögliche Erklärung für unsere Hypothese. Dabei wäre es sowohl denkbar, dass m2A und Adenosin die Expressionsmuster der Adenosinrezeptoren verändern, als auch, dass eine Aktivierung von unterschiedlichen Rezeptoren eine Veränderung in der Entwicklung

und Differenzierung der *responder*-Zellen bewirkt. Einen weiteren Aspekt dieser Überlegungen liefert die Erkenntnis, dass in LPS-stimulierten Makrophagen die Expression der Rezeptorklassen A<sub>1</sub>R und A<sub>3</sub>R herunterreguliert, und die von A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R hochreguliert werden (Murphree et al., 2005). Dies kann nun als Indiz dafür gewertet werden, dass m2A diesen LPS-vermittelten Effekt verstärkt und seinerseits zu einer Hochregulation der Rezeptoren beiträgt. Andererseits lässt sich diese Beobachtung auch dahingehend weiterführen, dass m2A und Adenosin sich möglicherweise in ihrer Bindungsaffinität an A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R unterscheiden. Ausgehend von der Annahme, dass m2A eine höheren Bindungsaffinität zu A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R besitzt, würde nämlich im Fall einer LPS-bedingten Hochregulation von A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R - ebenso wie in dieser Arbeit beobachtet - ein Effekt von m2A gegenüber Adenosin überwiegen. Dass der dynamische Regulierungsprozess, welchem die Adenosinrezeptoren unterliegen, auch durch solch eine veränderte Bindungsaffinität beeinflusst werden kann, verdeutlicht eine Studie am menschlichen Patienten. Dabei zeigt sich, dass im Rahmen einer Sepsis zwar die Expression von A<sub>2a</sub>R auf Granulozyten zunimmt, die Bindungsaffinität dieser Rezeptoren allerdings verringert ist (Kreth et al., 2009).

Anhand dieser bisher genannten Studien ergeben sich im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen demnach folgende Möglichkeiten als Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von m2A und Adenosin auf die jeweiligen Rezeptorklassen: Als erste Möglichkeit könnte m2A den Reifungsprozess und die Maturierung der *responder*-Zellen anders als Adenosin beeinflussen. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass m2A und Adenosin das Expressionsmuster der Rezeptorsubtypen verändern. Eine dritte Variante wäre eine unterschiedliche Bindungsaffinität von m2A und Adenosin an den Rezeptoren.

Eine letzte mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Knochenmarkzellen auf eine Stimulation mit m2A und Adenosin wäre allerdings eine Aktivierung unterschiedlicher *downstream*-Signalkaskaden. Zwar erfolgt die Einteilung der Adenosinrezeptoren anhand der ihnen zugehörigen G-Proteine und der damit verbundenen Erhöhung oder Erniedrigung des intrazellulären cAMP Spiegels, jedoch sind mittlerweile auch andere Signalwege bekannt (Ramakers et al., 2011).

Dennoch erscheint eine unterschiedliche nachgeschaltete Signalkaskade aus verschiedenen Gründen insgesamt eher unwahrscheinlich: So spiegelt sich einerseits die Einteilung der Adenosinrezeptoren anhand der nachgeschalteten G-Proteine auch in unserem letzten Versuch unter Zugabe aller Rezeptorinhibitoren wieder, da sich hier - unabhängig einer Adenosin oder m2A Stimulation - die Rezeptoren A<sub>1</sub>R und A<sub>3</sub>R, ebenso sowie A<sub>2a</sub>R und A<sub>2b</sub>R in ihrer IL-1 $\beta$ -Antwort gleich verhalten. Andererseits war es wiederum die Arbeitsgruppe um

Ouyang et al., welche neben der A<sub>2a</sub>R abhängigen IL-1 $\beta$ -Sekretion auch den dahinterstehenden Signalweg beschreiben konnte (Ouyang et al., 2013). Wie bereits weiter oben geschildert, konnte diese Forschungsgruppe zeigen, dass eine Aktivierung von A<sub>2a</sub>R eine durch ATP und LPS getriggerte Inflammasomaktivierung über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten und die dadurch induzierte IL-1 $\beta$ -Sekretion verstärken kann. Zusätzlich dazu konnten sie belegen, dass dieser Effekt auf einer Aktivierung der Adenylatzyklase und der damit verbundenen Erhöhung von cAMP und gesteigerten Tätigkeit der Proteinkinase A (PKA) beruht, was dem klassischen Aktivierungsweg von A<sub>2a</sub>R über G<sub>s</sub> entspricht. Interessanterweise beschreibt deren Studie jedoch nicht nur eine Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -Ausschüttung von Caspase-1, sondern weiterhin auch von NLRP3 und P2X<sub>7</sub>, was wiederum in deutlichem Gegensatz zu den von uns erhobenen Daten steht.

Abschließend lässt sich also sagen, dass m2A, genauso wie Adenosin, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an den verschiedenen Adenosinrezeptoren wirkt. Die beobachtete IL-1 $\beta$  Sekretion verläuft hierbei Caspasen-abhängig, wodurch die Beteiligung eines Inflammasoms wahrscheinlich oder zumindest möglich erscheint, auch wenn dies - entgegen bisheriger Studien - für das NLRP3-Inflammasom ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin zeigen m2A und Adenosin an den Rezeptoren ein unterschiedliches Verhalten, wofür mehrere Erklärungsmöglichkeiten bestehen. Zwar ließ sich diese Frage im Rahmen dieser Dissertation nicht vollends klären, jedoch ist der Grundstein hierzu gelegt. Alles in allem impliziert diese Arbeit dennoch, dass molekulares m2A, welches physiologisch lediglich als bakterienspezifische RNA-Modifikation zu finden ist, die Immunantwort der Adenosinrezeptoren zu ändern vermag.

#### 5.4. m2A als Erkennungsstruktur für bakterielle Infektionen

Um das immunogene Potential von m2A nicht nur anhand von Versuchen mit dem synthetisch hergestellten Molekül zu untersuchen, sondern die Experimente näher an eine tatsächliche klinische Relevanz heranzuführen, wurden im Rahmen dieser Dissertation auch Infektionsstudien mit *E. coli*-KO-Bakterien durchgeführt. Da die Modifikation m2A bisher nur in bakterieller rRNA und tRNA beschrieben wurde, war das Ziel bei der Erzeugung der KO-Bakterien, die Modifikationsrate in der bakteriellen RNA durch die Elimination von RNA-Methyltransferasen möglichst gering zu halten.

#### 5.4.1. Wirkungsweise der verschiedenen Methyltransferasen

Im Genom von *E. coli* finden sich mehrere Genabschnitte welche für Methyltransferasen kodieren. Für den *knock-out* wurden von uns folgende drei ausgewählt:

Das Gen **ygdE** kodiert für die RNA-Methyltransferase RlmM. Sie ist bisher vor allem für die 2'-O-Methylierung des Nukleotids C<sub>2498</sub> in der bakteriellen 23S rRNA bekannt (Punekar et al., 2012; Purta et al., 2009).

Aus derselben Proteinfamilie stammt die Methyltransferase RlmN, welche durch das Gen **yfgB** verschlüsselt wird. Ebenso wie RlmM wurde RlmN durch eine Methylierung in der 23S rRNA bekannt, in der es die Umwandlung von Adenosin zu m<sub>2</sub>A am Nukleotid A<sub>2503</sub> katalysiert (Toh et al., 2008). Neuste Erkenntnisse besagen jedoch, dass yfgB/RlmN neben der rRNA auch in der Lage ist tRNA zu methylieren und somit als Methyltransferase mit dualer Spezifität gesehen werden muss (Benitez-Paez et al., 2012).

Die Funktion der Gensequenz **yfiF** ist bisher noch nicht vollständig charakterisiert. Zwar kann man durch die vollständige Entschlüsselung des Genoms von *E. coli* vorhersagen, dass es sich bei ihrem Genprodukt um eine RNA-Methyltransferase handeln muss, jedoch ist ihre genaue Methylierungsfunktion bisher noch unbekannt (Jiang et al., 2007; Zhou et al., 2013).

Gen	Produkt	Substrat
yfiF	Uncharacterized tRNA/rRNA methyltransferase YfiF	wahrscheinlich rRNA + tRNA
yfgB (alternat.: rlmN)	Dual-specificity RNA methyltransferase RlmN	rRNA + tRNA
ygdE (alternat.: rlmM)	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase M	rRNA

Tab. 6 Übersicht über die entfernten Gene, ihre Genprodukte und potentielle Ziel-RNA

#### 5.4.2. RNA und deren Modifikationen als Erkennungsstrukturen für Immunrezeptoren

Als erstes Ergebnis der Infektionsversuche zeigten sich verminderte Werte im Falle einer Infektion mit lebenden *E. coli*  $\Delta$ yfiF, wohingegen ein KO von yfgB und ygdE keine Veränderungen der Interleukinwerte bewirkten. Für diese beobachteten Unterschiede kommen primär mehrere Ursachen, wie z.B. ein verändertes Wachstumsverhalten der Bakterien in Betracht, allerdings konnte dieses zumindest in zeitgleichen OD-Messungen der verschiedenen Bakterienstämme in Nährmedium ausgeschlossen werden. Zwar bestünde immer noch die Möglichkeit, dass sich die Bakterien nach einer Infektion intrazellulär unterschiedlich verhalten, jedoch wollen wir für unseren weiteren Überlegungen zunächst

davon ausgehen, dass die Unterschiede in den Interleukinwerten in einem veränderten Methylierungsmuster der RNA begründet liegen könnten.

Passend hierzu finden sich in der Literatur vermehrt Studien, welche neben viraler RNA auch zunehmend bakterielle RNA als spezifische Erkennungsstruktur für Immunrezeptoren und damit als eigene Klasse an PAMPs deklarieren (Abdullah et al., 2012; Eberle et al., 2009; Kanneganti et al., 2006; Sander et al., 2011). Ebenso wie bei der Erkennung von DNA scheinen hier bestimmte Strukturen und Modifikationen als Erkennungsmuster für den bakteriellen Ursprung der RNA zu dienen. Beispielsweise werden die im Vergleich zu Eukaryoten kürzeren poly-A-Enden prokaryotischer RNA von bestimmten TLRs als körperfremde Strukturen erkannt (Koski et al., 2004). Darüber hinaus finden sich bereits erste Studien, die der Qualität und der Menge an Nukleotidmodifikationen eine entscheidende Rolle an der Erkennung von bakterieller RNA zuschreiben (Gehrig et al., 2012; Kariko et al., 2005). Interessanterweise stellen sie aber nicht die Nukleotidmodifikationen der RNA als Erkennungsmerkmal für Immunrezeptoren in den Vordergrund, sondern besagen, dass Modifikationen wie m6A als Bestandteil eukaryotischer RNA die Immunreaktion auf bzw. die Erkennung von RNA schmälern (Kariko et al., 2005). Eine aktuelle Studie konnte dabei sogar exakt die 2'-O-Methylierung G(m)18 als immunsuppressiven Bestandteil der tRNA ausmachen und zeigen, dass diese als natürlich vorkommende Modifikation in naiver RNA eine Erkennung der tRNA durch TLR7 verhindert (Gehrig et al., 2012).

In der Annahme dass RNA auch in unserem Versuchsaufbau die entscheidende Struktur für die Mustererkennung durch Immunrezeptoren darstellen könnte und durch die Erkenntnis, dass bestimmte Modifikationen der RNA deren Immunreaktion zu beeinflussen vermögen, soll an dieser Stelle ein möglicher Rückschluss zu unseren Ergebnissen aus den Stimulationsversuchen mit m2A gezogen werden. Dabei erscheint es zunächst folgerichtig, dass in unseren Infektionsversuchen ein KO von ygdE keine Änderung der Interleukinwerte bewirkt, da für seine Methyltransferase bisher nur eine Methylierung von Cytosin, nicht aber für Adenosin bekannt ist. Im Falle des yfgB-KO würde man dagegen eher einen Effekt erwarten, da für sein Genprodukt die spezifische Methylierung von Adenosin zu m2A sowohl in rRNA, als auch in tRNA beschrieben ist. Da ein Effekt allerdings nur bei einem Wegfall des nicht weiter charakterisierten Genprodukts von yfiF beobachtet wird, kann ohne genauere Charakterisierung des Enzyms oder eine exakte Analyse des Methylierungsmusters der RNA kein eindeutiger Rückschluss auf die Art der Modifikation und somit auf eine Beteiligung von m2A gezogen werden.

#### 5.4.3. IL-1 $\beta$ -Sekretion ist eine Reaktion auf lebende Bakterien

Als weiteres Ergebnis der Infektionsversuche zeigte sich, dass unabhängig der verschiedenen knock-outs eine IL-1 $\beta$ -Sekretion nur in Folge einer Infektion mit lebenden, und nicht mit abgetöteten Bakterien auftritt. Die Arbeitsgruppe um Sander et al. konnte im Jahr 2011 den Nachweis erbringen, dass eine Stimulation von Knochenmarkmakrophagen mit mRNA zu einer IL-1 $\beta$ -Ausschüttung führt (Sander et al., 2011). Als besondere Erkenntnis dieser Studie zeigte sich allerdings, dass diese mRNA als Signalstruktur für eine Infektion mit lebenden Bakterien fungiert, weswegen sie hierfür erstmals den Begriff „vita-PAMP“ in die Immunologie einführten. Ihre Daten bezüglich der Zytokinausschüttung nach Infektion mit lebenden oder hitzeinaktivierten Bakterien gehen dabei nicht nur für IL-1 $\beta$  mit den Ergebnissen dieser Arbeit einher, sondern zeigen auch dass sich die Werte für IL-6 nach Infektion mit lebenden oder toten Bakterien gleich verhalten. Da auch wir in unseren Versuchen mit Hitze-inaktivierten Bakterien stets hohe IL-6-Antworten beobachten konnten, scheint es auch im Rahmen unseres Versuchsaufbaus möglich, dass die beobachteten Effekte auf IL-1 $\beta$  durch RNA vermittelt werden. Dies führt nun wiederum zu der Überlegung, ob der für den yfiF-KO gesehene Effekt tatsächlich in einer geringeren Methylierung der RNA begründet liegen könnte.

#### 5.4.4. Kann eine Erkennung von m2A zu einer NLRP3 unabhängigen Aktivierung von Caspase-1 führen?

Neben der Einordnung von mRNA als vita-PAMP untersuchten Sander et al. auch den zugehörigen Erkennungsrezeptor und die dahinterstehende Signalkaskade (Sander et al., 2011). Wie bereits andere Arbeitsgruppen vor ihnen (Kanneganti et al., 2006) beschrieben auch sie eine NLRP3-Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -Sekretion nach einer Stimulation mit bakterieller RNA oder - wie auch in dieser Arbeit - mit lebenden Bakterien. Weiter bestätigten sie eine Beteiligung des Adaptermoleküls ASC und von Caspase-1.

Die Beteiligung von ASC, zusammen mit dem Typ-1-IFN-Rezeptor, findet sich auch schon in einer früher publizierten Studie der Arbeitsgruppe um Eberle (Eberle et al., 2009). Auch sie untersuchte die RNA-Erkennungsmechanismen und postulierte dabei das Vorhandensein von zytosolischen Rezeptoren ähnlich den DNA-Erkennungsrezeptoren. Zwar bestätigte sie RIG-I und MDA-5 als Rezeptoren für virale RNA, jedoch konnte dieser Zusammenhang nicht für bakterielle RNA angewandt werden. Dazu passend lassen auch die Ergebnisse der Sander-Studie eine Beteiligung von RIG-I als unwahrscheinlich erscheinen (Sander et al., 2011).

Die Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -Sekretion von Caspase-1 hingegen galt lange als gesichert. Neuste Studien bestätigen dies zwar, jedoch decken sie einen zusätzlichen Einfluss von Caspase-11 auf (Kayagaki et al., 2011). Kayagaki unterscheidet dabei zwischen einem klassischen und einem nicht-klassischen Aktivierungsweg, wobei klassische Stimuli wie ATP über NLRP3 und ASC zu einer Aktivierung von Caspase-1 und somit zur Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  führen. Daneben beschreibt er allerdings einen nicht-klassischen Signalweg, welchen er nach Infektionen mit *E. coli*, *C. rodentium* und *V. cholerae* beobachten konnte. Zwar ist die IL-1 $\beta$ -Antwort auch in diesem Fall von NLRP3, ASC und Caspase-1 abhängig, jedoch wird zusätzlich Caspase-11 benötigt. Für dessen Aktivierung wiederum postuliert Kayagaki die Beteiligung eines neuerlichen Inflammasoms, welches bisher noch nicht bekannt ist.

Die Einordnung einer möglichen Beteiligung von m2A und dessen Vorkommen in bakterieller RNA in diesem potentiellen Signalweg gestaltet sich dabei rein hypothetisch. Interessant an unseren Daten ist vor allem, dass zwar für die Infektionsversuche mit lebenden Bakterien eine NLRP3-Abhängigkeit besteht, dies aber für eine reine m2A-Stimulation nicht zuzutreffen scheint. Geht man in den theoretischen Überlegungen davon aus, dass die Modifikation m2A tatsächlich die entscheidende Erkennungsstruktur in der bakteriellen RNA darstellt und die für das Molekül m2A gewonnenen Ergebnisse somit auf das bisher bekannte Wissen über RNA-Erkennung übertragbar wäre, so eröffnet dies einigen Raum für Spekulationen:

Dabei scheint eine grundsätzliche Beteiligung von NLRP3 an der Erkennung von bakterieller RNA zwar wahrscheinlich, allerdings muss dies nicht zwangsläufig auch auf die initiale Erkennung von m2A durch die Adenosinrezeptoren zutreffen. Ginge man nämlich tatsächlich von einem zusätzlichen nicht-klassischen Aktivierungsweg nach Kayagaki aus, so könnte es durchaus möglich sein, dass m2A, die Adenosinrezeptoren und ein zusätzliches Inflammasom in diesem Teil der Signalkaskade eine Rolle spielen, welche zunächst in der von Kayagaki beschriebenen Aktivierung von Caspase-11 mündet. Die daraus resultierende Aktivierung von Caspase-1 würde dann wiederum zur finalen Prozessierung von IL-1 $\beta$  führen und somit eine NLRP3 unabhängige IL-1 $\beta$ -Sekretion nach einer Stimulation mit m2A erklären. In dieses Modell passend ließen sich auch die im Vorfeld für m2A erhobenen Ergebnisse unter Zugabe von Caspaseninhibitoren einordnen, da sich hier zwar eine grundsätzliche Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -Sekretion von Caspase-1 zeigte, durch eine zusätzliche Inhibition weiterer Caspasen die gemessenen IL-1 $\beta$ -Spiegel jedoch weiter abfielen (vgl. Abschnitt 2.9).

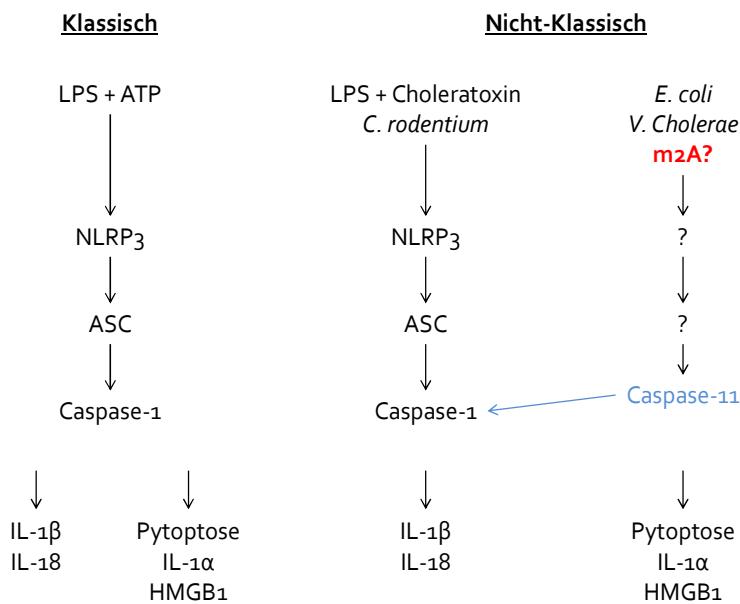


Abb. 21 Mögliche Unterschiede zwischen klassischer und nicht-klassischer Aktivierung nach Kayagaki et al., 2011

Unabhängig von diesen Überlegungen deutet sich allerdings sowohl in der Literatur, als auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit die Beteiligung eines weiteren Inflammasoms an. Dazu passend ist seit 2010 bekannt, dass virale RNA von RIG-I erkannt wird und zur Aktivierung eines Inflammasoms führt (Poeck et al., 2010). Zwar deuteten die oben genannten Studien eher dagegen, jedoch zeigte die Arbeitsgruppe um Abdullah erst kürzlich, dass RIG-I der entscheidende Sensor einer Infektion mit lebenden Listerien ist (Abdullah et al., 2012). Ferner fanden sie heraus, dass Listerien Nukleinsäuren sekretieren und diese im Zytosol in einer RIG-I abhängigen IL-1 $\beta$ -Produktion und Inflammasomaktivierung mündet. Auch wenn es sich bei Listerien um intrazelluläre Bakterien handelt, bekräftigt dies zum einen die Annahme dass grundsätzlich mehrere Inflammasome die Detektion einer bakteriellen Infektion übernehmen können, zum anderen rückt es RIG-I dennoch als möglichen Erkennungsrezeptor für m2A verstärkt in den Fokus der Überlegungen.

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass bakterielle RNA ein klassisches PAMP darstellt, welches eine Bakterieninfektion anzeigt, jedoch bleiben die Mechanismen der Erkennung und der Signalkaskaden noch weitestgehend unverstanden. Vor allem der Einfluss von Modifikationen in der RNA bedarf in diesem Zusammenhang noch weiterer Klärung. In Bezug auf die Detektion von Bakterieninfektionen ordnen sich die Ergebnisse dieser Arbeit dabei in die Reihe der bisherigen Studiendaten ein und bekräftigen eine mögliche Beteiligung von RNA als Erkennungsstruktur und von NLRP3 als beteiligten Rezeptor. Neben weiteren Anregungen über mögliche Signalwege im Rahmen von bakteriellen Infektionen, eröffnet

diese Arbeit allerdings komplett neuartige Perspektiven bezüglich der Rolle von modifizierten Nukleosiden als potenzielle Effektoren an Mustererkennungsrezeptoren. Dies zeigt sich im Speziellen an dem modifizierten Adenosin m2A. Dieses wird ausschließlich in bakterieller RNA gefunden und ist zumindest als synthetisch hergestelltes, singuläres Molekül in der Lage Immunzellen zu aktivieren und zeigt besonders im Vergleich zu eukaryotisch vorkommenden Modifikationen ein erhöhtes immunogenes Potenzial. Auch wenn eine endgültige Übertragung der Beobachtung vom Molekül m2A hin zu der tatsächlich in bakterieller RNA vorkommenden Modifikation im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht abschließend möglich war, so scheint es dennoch eine vielversprechende Überlegung, dass RNA-Modifikationen einen Einfluss auf die inflammatorische Antwort von Immunzellen nehmen könnten und der bakterienspezifischen Modifikation m2A hierbei möglicherweise eine entscheidende Rolle zu Teil wird. Aus diesem Grund könnte die weitere Erforschung von m2A und den Adenosinmodifikationen einen nicht unerheblichen Teil zum besseren Verständnis der Mechanismen unseres Immunsystems beitragen und kann unter Umständen auch neue therapeutische Ansatzpunkte bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen liefern.

## 5.5. Offene Fragen und Ausblick

Obwohl diese Arbeit bereits einen Aufschluss über das immunologische Verhalten von Adenosinmodifikationen liefern konnte, ist deren vollständiger Wirkungsmechanismus noch nicht endgültig geklärt. Dazu bleiben bei den hier beschriebenen Versuchen ein paar Fragen offen oder sind noch nicht adressiert worden.

So lässt sich anhand der Stimulationsversuche mit den spezifischen AR-Inhibitoren zwar eine sehr eindeutige Tendenz in der Wirkung auf die Zytokinausschüttung ausmachen, allerdings werden für eine vollständige Bestätigung dieser weitere Untersuchungen benötigt. Beispielsweise wurde in unserer Versuchsanordnung jeweils nur ein Rezeptortyp blockiert, wodurch die anderen drei Rezeptorklassen ihre Wirkung entfalten konnten. Auch wenn sich dadurch bereits eine recht sichere Aussage treffen lässt, so bedarf es dennoch der Untersuchung des spezifischen Effektes der jeweils einzelnen Rezeptorklassen. In dieser Arbeit sollte dies durch die Kombination von drei spezifischen Inhibitoren erfolgen. Da jedoch die Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurde durch eine Kombination von drei Inhibitoren die für die Zellen erträgliche Höchstmenge an DMSO überschritten und bereits ohne Zugabe von Stimulatoren ein Anstieg der Interleukinwerte beobachtet. Aus diesem Grund sollten

zusätzlich zu den spezifischen AR-Antagonisten noch die entsprechenden Agonisten bestellt, und mit diesen die Stimulationsversuche wiederholt werden.

Darüber hinaus erscheint es auch sinnvoll die beobachteten Effekte einer AR-Blockade anhand von AR-KO-Mäusen zu kontrollieren, da eine pharmakologische Inhibition, vor allem in verhältnismäßig hohen Dosen, auch eine Wirkung auf andere Rezeptoren und Signalwege haben kann. Dies ließe sich durch die Verwendung von KO-Mäusen sicher ausschließen.

Des Weiteren sollte die *downstream*-Signalkaskade hinter den Adenosinrezeptoren untersucht werden. Hierbei zeigen die bisherigen Daten einen Zusammenhang von A<sub>1</sub>R mit A<sub>3</sub>R und von A<sub>2a</sub>R mit A<sub>2b</sub>R. Da dieser Zusammenhang sich in der Einteilung anhand des nachgeschalteten G-Proteins und dessen Wirkung auf den intrazellulären cAMP-Spiegel wiederspiegelt, erscheint eine Analyse eben dieses intrazellulären cAMP-Spiegels als sinnvoll. Ferner finden sich in der Literatur zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von RIG-I an der Detektion von RNA und Bakterien, weswegen zusätzlich zu den Adenosinrezeptoren in den nachfolgenden Versuchen eine mögliche Beteiligung von RIG-I an der Signaltransduktion von m2A untersucht werden sollte. Ein weiterer Rezeptor, der zur Ausbildung eines Inflammasoms befähigt und an der Detektion von Nukleinsäuren beteiligt ist, ist AIM2. Auch wenn für ihn bisher lediglich dsDNA als Ligand beschrieben wurde, so besteht dennoch die Möglichkeit, dass auch er für die Erkennung von m2A oder m2A-haltiger RNA eine Rolle spielt.

Besonders wichtig sollte jedoch eine weitere Ergründung der Zusammenhänge von bakterieller RNA und Adenosinmodifikationen sein. Um auf diesem Feld exakte Aussagen treffen zu können, wird es nötig die RNA aus den KO-Bakterien zu extrahieren und genauer zu analysieren. Durch den Vergleich der RNA aus verschiedenen KO-Bakterien sollte nicht nur ein genauer Rückschluss auf die Qualität und Quantität der RNA-Modifikationen möglich, sondern auch das immunologische Potenzial der jeweiligen RNA besser beurteilbar sein. Da dies wiederum eine exakte Charakterisierung derjenigen Modifikationen ermöglichen könnte, welche als Erkennungsstruktur für PRRs fungieren, liegt in diesem Schritt das Potenzial neue therapeutische Ansatzpunkte zu liefern. So könnten in Zukunft, falls sich die Ergebnisse und Überlegungen dieser Arbeit bestätigen sollten, mit Hilfe dieser neuartigen Erkennungsstrukturen beispielsweise Versuche unternommen werden, die allgemeine Immunreaktion im Rahmen einer bakteriellen Infektion oder Sepsis zum Vorteil des Erkrankten zu modulieren.

## 6. Zusammenfassung

Entzündungsreaktionen sind komplexe Kaskaden, welche initial von unseren Immunzellen ausgelöst werden. Diese Zellen modulieren auch den weiteren Verlauf und regulieren das Ausmaß der Entzündung. Ihre „Werkzeuge“ sind hierbei verschiedene Moleküle und Botenstoffe, welche eine Interaktion der unterschiedlichen Zellen vermitteln. Eines dieser immunmodulatorischen Moleküle ist das Adenosin, welches in zahlreichen Geweben und Kompartimenten unseres Körpers zu finden ist und verschiedenste Effekte vermittelt. So findet sich Adenosin als Bestandteil von Nukleinsäuren auch in menschlicher und bakterieller RNA, wo es als einzelnes Molekül weiter modifiziert werden kann. Eine Möglichkeit dieser Modifikation stellt dabei die Methylierung an verschiedenen C-Atomen des Adenosins dar.

Ausgangspunkt dieser Promotionsarbeit war die Überlegung, ob modifizierte Adenosine, welche ausschließlich in bakterieller RNA vorkommen, im Gegensatz zu human vorkommenden Modifikationen, eine Erkennungsstruktur für Immunzellen darstellen und dadurch Einfluss auf die nachfolgenden Entzündungsreaktionen nehmen können. Da im Vorfeld in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die bakterielle Modifikation 2-Methyl-Adenosin (m2A) Immunzellen zur Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  anregt, sollte speziell dieses Molekül weiter untersucht werden.

In den Stimulationsversuchen mit dem synthetisch hergestellten Molekül m2A konnten wir nach magnetischer Zellsortierung verschiedene Subpopulationen der Immunzellen hinsichtlich ihrer Expression an Oberflächenmarkern und ihrer IL-1 $\beta$ -Sekretion untersuchen. Dabei konnten wir zeigen, dass es sich bei den *responder*-Zellen um Gr-1/CD11b-positive Zellen und somit sehr wahrscheinlich um undifferenzierte myeloide Progenitorzellen handelt, welche durch eine Stimulation mit m2A aktiviert werden.

Die Untersuchung des Signalwegs von m2A zeigte, dass neben m2A auch Adenosin zu einer Caspasen-abhängigen IL-1 $\beta$ -Sekretion führen kann, was zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war. Als mögliches verantwortliches Inflammasom konnten wir NLRP3 und dessen Aktivierung über P2X<sub>7</sub> ausschließen. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit und der Adenosin-vermittelten IL-1 $\beta$ -Sekretion begannen wir die Wirkung von m2A und Adenosin auf die verschiedenen Adenosinrezeptoren zu untersuchen. Anhand von Experimenten mit spezifischen Adenosinrezeptorinhibitoren verdeutlichten wir nicht nur das Wirken von m2A und Adenosin an Adenosinrezeptoren, sondern konnten auch zeigen, dass sich die beiden Moleküle in ihrer Wirkung auf die verschiedenen Rezeptorsubklassen unterscheiden. Der

modulierende Effekt von m2A auf die Entzündungsreaktion ergibt sich dabei aus den Veränderungen in der Zytokinproduktion der Immunzellen.

Im letzten Teil der Arbeit sollte ein System entwickelt werden, welches Rückschlüsse von einem physiologischen Infektionsmodell auf einen eventuellen immunmodulatorischen Effekt von RNA-Methylierungen ermöglicht. Hierzu wurden durch gezielten *knock-out* in mehreren Schritten die Gene verschiedener Methyltransferasen in *E. coli* Bakterien entfernt. In abschließenden Infektionsstudien, bei welchen Immunzellen mit den *knock-out*-Bakterien infiziert wurden, zeigte sich, dass speziell ein *knock-out* der putativen Methyltransferase *yfIF* eine Veränderung in deren Zytokinprofil bewirkt. Ferner beobachteten wir eine entsprechende IL-1 $\beta$ -Sekretion ausschließlich als Antwort auf eine Infektion mit lebenden Bakterien, was zusammen mit der aktuellen Literatur einmal mehr verdeutlicht, dass bakterielle RNA als eine eigenständige Klasse an PAMPs zu werten ist. Zwar war auch die in unserem Infektionsmodell gesehene IL-1 $\beta$ -Antwort NLRP3 abhängig, jedoch trifft dies nicht auf das Molekül m2A zu und muss für eine etwaige Erkennung von m2A innerhalb bakterieller RNA auch nicht zwangsläufig gegeben sein.

Insgesamt verdeutlicht diese Arbeit somit, dass die Adenosinmodifikation m2A einen immunstimulatorischen Effekt auf Immunzellen hat und dass bakterielle RNA ein klassisches PAMP darstellt, welches eine Infektion mit lebenden Bakterien anzeigt. Des Weiteren ergeben sich erste Hinweise darauf, dass Adenosinmodifikationen auch in bakterieller RNA an der Erkennung durch Immunrezeptoren beteiligt sein könnten und dass hierbei die Modifikation m2A möglicherweise als eine der entscheidenden Erkennungsstrukturen fungiert. Durch die Entwicklung der verschiedenen *knock-out*-Bakterien liefert vorliegende Arbeit die Grundlage um diese Fragestellung weiter untersuchen zu können.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Überblick über die wichtigsten von aktivierten Makrophagen sezernierten Zytokine und Chemokine .....	5
<b>Abb. 2</b> Signalkaskade ausgewählter Toll- <i>like</i> -Rezeptoren.....	11
<b>Abb. 3</b> „Two-Hit-Theory“: Prozessierung der aktiven Metabolite IL-1 $\beta$ und IL-18 durch das NLRP3-Inflammasom .....	15
<b>Abb. 4</b> Caspasen-Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -Antwort nach Stimulation mit Adenosinmodifikationen .....	22
<b>Abb. 5</b> Reinheit der verschiedenen Zellpopulationen nach magnetischer Zellsortierung.....	29
<b>Abb. 6</b> Darstellung der CD11b intermediären Zellpopulation.....	33
<b>Abb. 7</b> Interleukin-1 $\beta$ -Ausschüttung der verschiedenen Zellpopulationen nach Stimulation mit LPS und m2A.....	41
<b>Abb. 8</b> FACS-Analyse unsortierter Knochenmarkzellen hinsichtlich ihrer Gr-1 Expression und Aktivierung.....	42
<b>Abb. 9</b> Interleukin-1 $\beta$ Ausschüttung der verschiedenen Zellpopulationen nach Stimulation mit m2A und LPS.....	43
<b>Abb. 10</b> FACS-Analyse der b220 $^-$ /CD11b $^{intermed}$ sortierten Zellen hinsichtlich ihrer Aktivierung und Expression von CD11b.....	44
<b>Abb. 11</b> Interleukin-1 $\beta$ nach Stimulation von WT-, NLRP3 $^{-/-}$ - und P2X7 $^{-/-}$ -Knochenmarkzellen.....	46
<b>Abb. 12</b> Interleukin-6 Spiegel nach Stimulation mit a) Adenosin bzw. b) m2A unter Zugabe spezifischer Adenosinrezeptorinhibitoren .....	48
<b>Abb. 13</b> Interleukin-1 $\beta$ Spiegel nach Stimulation mit a) Adenosin bzw. b) m2A unter Zugabe spezifischer Adenosinrezeptorinhibitoren .....	49
<b>Abb. 14</b> Vergleich der Interleukin-1 $\beta$ Ausschüttung nach Stimulation mit Adenosin oder m2A unter Zugabe spezifischer Adenosinrezeptorinhibitoren .....	51
<b>Abb. 15</b> Entfernung eines chromosomalen Gens (Abb. modifiziert nach Datsenko und Wanner, 2000).....	54
<b>Abb. 16</b> Kontroll-PCR auf Verlust der Antibiotikaresistenz nach Transformation von pCP20.....	56
<b>Abb. 17</b> Übersicht über die generierten <i>knock-out</i> -Stämme und abschließende Kontroll-PCR .....	57

<b>Abb. 18</b> Interleukin-Konzentrationen nach Infektion mit lebenden <i>E. coli</i> Bakterien.....	58
<b>Abb. 19</b> Interleukin-Ausschüttung von Wildtyp- und NLRP3 <sup>-/-</sup> -Knochenmarkzellen nach Infektion mit lebenden <i>E. coli</i> Bakterien .....	59
<b>Abb. 20</b> Interleukin Konzentrationen nach Infektion mit Hitze-inaktivierten <i>E. coli</i> Bakterien.....	60
<b>Abb. 21</b> Mögliche Unterschiede zwischen klassischer und nicht-klassischer Aktivierung nach Kayagaki et al., 2011.....	79

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
AR	Adenosinrezeptoren
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD11b <sup>intermed</sup>	CD11b intermediäre Zellen
Cm	Chloramphenicol
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin
dsRNA	Doppelstrang RNA
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FRT	<i>FLP recognition target</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMC	unreifen myeloiden Zellen
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
Kan	Kanamycin
KO	<i>Knock-out</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m2A	2-Methyladenosin
m6A	N6-Methyladenosin
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MDA-5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MDP	Muramyldipeptid
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</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-1<i>H</i>-purin-8-yl)phenoxy]-acetamide</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>

NK	Natürliche Killer Zellen
NLR	NOD-like-Rezeptor
NLRP	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD600	Optischen Dichte bei 600nm
P2X <sub>7</sub>	P2X Purinozeptor 7
PacBlue	<i>Pacific blue</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PYHIN	<i>Pyrin and HIN domain-containing protein</i>
R848	Resiquimod
RAGE	Rezeptor für <i>advanced glycation end products</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
RLH	<i>RIG-I-like Helikase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Sauerstoffradikale
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	Ribosomale RNA
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	SOB mit <i>Catabolite repression</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR domain containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRAF	TNFR-assoziierter Faktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-<math>\beta</math></i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
WT	Wildtyp
ZM 241385	4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol
zVAD	pan-Caspase - Inhibitor
zYVAD	Caspase-1 – Inhibitor

### 7.3. Literaturverzeichnis

- Abdullah, Z., Schlee, M., Roth, S., Mraheil, M. A., Barchet, W., Bottcher, J., . . . Knolle, P. A. (2012). RIG-I detects infection with live Listeria by sensing secreted bacterial nucleic acids. *EMBO J*, 31(21), 4153-4164
- Agris, P. F., Vendeix, F. A., & Graham, W. D. (2007). tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol*, 366(1), 1-13
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801
- Anderson, K. V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 12(1), 13-19
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Hasko, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*, 13(12), 842-857
- Barrow, E. W., Westbrook, L., Bansal, N., Suling, W. J., Maddry, J. A., Parker, W. B., & Barrow, W. W. (2003). Antimycobacterial activity of 2-methyl-adenosine. *J Antimicrob Chemother*, 52(5), 801-808
- Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*, 9(8), 535-542
- Bauernfeind, F., Bartok, E., Rieger, A., Franchi, L., Nunez, G., & Hornung, V. (2011). Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*, 187(2), 613-617
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., . . . Latz, E. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, 183(2), 787-791
- Benitez-Paez, A., Villarroya, M., & Armengod, M. E. (2012). The Escherichia coli RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy. *RNA*, 18(10), 1783-1795
- Bertagnolo, V., Nika, E., Brugnoli, F., Bonora, M., Grassilli, S., Pinton, P., & Capitani, S. (2011). Vav1 is a crucial molecule in monocytic/macrophagic differentiation of myeloid leukemia-derived cells. *Cell Tissue Res*, 345(1), 163-175
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 81(1), 1-5
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegrán, F., . . . Ghiringhelli, F. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med*, 19(1), 57-64
- Cantara, W. A., Bilbille, Y., Kim, J., Kaiser, R., Leszczynska, G., Malkiewicz, A., & Agris, P. F. (2012). Modifications modulate anticodon loop dynamics and codon recognition of E. coli tRNA(Arg1,2). *J Mol Biol*, 416(4), 579-597
- Cekic, C., Sag, D., Li, Y., Theodorescu, D., Strieter, R. M., & Linden, J. (2012). Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J Immunol*, 188(1), 198-205
- Chan, C. T., Dyavaiah, M., DeMott, M. S., Taghizadeh, K., Dedon, P. C., & Begley, T. J. (2010). A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet*, 6(12), e1001247
- Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., . . . Junger, W. G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, 314(5806), 1792-1795
- Cherepanov, P. P., & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1), 9-14

- Chiu, G. S., Chatterjee, D., Darmody, P. T., Walsh, J. P., Meling, D. D., Johnson, R. W., & Freund, G. G. (2012). Hypoxia/reoxygenation impairs memory formation via adenosine-dependent activation of caspase 1. *J Neurosci*, 32(40), 13945-13955
- Contassot, E., Beer, H. D., & French, L. E. (2012). Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly*, 142, w13590
- Creagh, E. M., & O'Neill, L. A. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*, 27(8), 352-357
- Cronstein, B. N., Levin, R. I., Philips, M., Hirschhorn, R., Abramson, S. B., & Weissmann, G. (1992). Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A<sub>1</sub> receptors and inhibited via adenosine A<sub>2</sub> receptors. *J Immunol*, 148(7), 2201-2206
- Csoka, B., Himer, L., Selmeczy, Z., Vizi, E. S., Pacher, P., Ledent, C., . . . Hasko, G. (2008). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J*, 22(10), 3491-3499
- Dai, Y., Zhang, W., Wen, J., Zhang, Y., Kellems, R. E., & Xia, Y. (2011). A<sub>2B</sub> adenosine receptor-mediated induction of IL-6 promotes CKD. *J Am Soc Nephrol*, 22(5), 890-901
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6640-6645
- de Alba, E. (2009). Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). *J Biol Chem*, 284(47), 32932-32941
- Delano, M. J., Scumpia, P. O., Weinstein, J. S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K. M., . . . Moldawer, L. L. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*, 204(6), 1463-1474
- diMarco, J. P., Sellers, T. D., Lerman, B. B., Greenberg, M. L., Berne, R. M., & Belardinelli, L. (1985). Diagnostic and therapeutic use of adenosine in patients with supraventricular tachyarrhythmias. *J Am Coll Cardiol*, 6(2), 417-425
- Dinarello, C. A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8(4), 253-265
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27, 519-550
- Dinarello, C. A. (2010). IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol*, 40(3), 599-606
- Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., . . . Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201-206
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., & Tschoop, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 320(5876), 674-677
- Drury, A. N., & Szent-Gyorgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 68(3), 213-237
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., . . . Latz, E. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464(7293), 1357-1361
- Eberle, F., Sirin, M., Binder, M., & Dalpke, A. H. (2009). Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. *Eur J Immunol*, 39(9), 2537-2547
- Feldmeyer, L., Werner, S., French, L. E., & Beer, H. D. (2010). Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur J Cell Biol*, 89(9), 638-644
- Fleming, T. J., Fleming, M. L., & Malek, T. R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol*, 151(5), 2399-2408

- Franchi, L., Munoz-Planillo, R., & Nunez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*, 13(4), 325-332
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Linden, J., & Muller, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev*, 63(1), 1-34
- Fredholm, B. B., Chern, Y., Franco, R., & Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A<sub>2A</sub> signaling. *Prog Neurobiol*, 83(5), 263-276
- Fredholm, B. B., Irenius, E., Kull, B., & Schulte, G. (2001). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol*, 61(4), 443-448
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*, 7(12), 1250-1257
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9(3), 162-174
- Gehrig, S., Eberle, M. E., Botschen, F., Rimbach, K., Eberle, F., Eigenbrod, T., . . . Helm, M. (2012). Identification of modifications in microbial, native tRNA that suppress immunostimulatory activity. *J Exp Med*, 209(2), 225-233
- Gomez-Garcia, L., Lopez-Marin, L. M., Saavedra, R., Reyes, J. L., Rodriguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2005). Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol*, 27(10-11), 395-405
- Goubau, D., Rehwinkel, J., & Reis e Sousa, C. (2010). PYHIN proteins: center stage in DNA sensing. *Nat Immunol*, 11(11), 984-986
- Haile, L. A., von Wasielewski, R., Gamrekelashvili, J., Kruger, C., Bachmann, O., Westendorf, A. M., . . . Greten, T. F. (2008). Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*, 135(3), 871-881, 881 e871-875
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580
- Hasko, G., & Cronstein, B. N. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol*, 25(1), 33-39
- Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 7(9), 759-770
- Hasko, G., & Pacher, P. (2012). Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(4), 865-869
- Hasko, G., Pacher, P., Deitch, E. A., & Vizi, E. S. (2007). Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol Ther*, 113(2), 264-275
- He, C. (2010). Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol*, 6(12), 863-865
- He, Y., Franchi, L., & Nunez, G. (2013). TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1 $\beta$  production independently of the purinergic P2X<sub>7</sub> receptor in dendritic cells and in vivo. *J Immunol*, 190(1), 334-339
- Hussen, J., Duvel, A., Koy, M., & Schuberth, H. J. (2012). Inflammasome activation in bovine monocytes by extracellular ATP does not require the purinergic receptor P2X<sub>7</sub>. *Dev Comp Immunol*, 38(2), 312-320
- Imai, Y., Kuba, K., Neely, G. G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., . . . Penninger, J. M. (2008). Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*, 133(2), 235-249
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1, 1-13
- Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBioChem*, 3(4), 274-293

- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., . . . He, C. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 7(12), 885-887
- Jiang, M., Sullivan, S. M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., & Maddock, J. R. (2007). Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques. *J Bacteriol*, 189(9), 3434-3444
- Kahlenberg, J. M., & Dubyak, G. R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X<sub>7</sub> receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(5), C1100-1108
- Kanneganti, T. D., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Whitfield, J., Franchi, L., . . . Nunez, G. (2006). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem*, 281(48), 36560-36568
- Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M., Kim, Y. G., Chen, G., Park, J. H., Franchi, L., . . . Nunez, G. (2007). Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity*, 26(4), 433-443
- Kara, F. M., Chitu, V., Sloane, J., Axelrod, M., Fredholm, B. B., Stanley, E. R., & Cronstein, B. N. (2010). Adenosine A<sub>1</sub> receptors (A<sub>1</sub>Rs) play a critical role in osteoclast formation and function. *FASEB J*, 24(7), 2325-2333
- Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2), 165-175
- Karmouty-Quintana, H., Xia, Y., & Blackburn, M. R. (2013). Adenosine signaling during acute and chronic disease states. *J Mol Med (Berl)*, 91(2), 173-181
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., . . . Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, 205(7), 1601-1610
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., . . . Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101-105
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., . . . Dixit, V. M. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 479(7371), 117-121
- Koizumi, Y., Toma, C., Higa, N., Nohara, T., Nakasone, N., & Suzuki, T. (2012). Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection. *Cell Microbiol*, 14(2), 149-154
- Kolachala, V., Ruble, B., Vijay-Kumar, M., Wang, L., Mwangi, S., Figler, H., . . . Sitaraman, S. (2008a). Blockade of adenosine A<sub>2B</sub> receptors ameliorates murine colitis. *Br J Pharmacol*, 155(1), 127-137
- Kolachala, V. L., Vijay-Kumar, M., Dalmasso, G., Yang, D., Linden, J., Wang, L., . . . Sitaraman, S. V. (2008b). A<sub>2B</sub> adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology*, 135(3), 861-870
- Koski, G. K., Kariko, K., Xu, S., Weissman, D., Cohen, P. A., & Czerniecki, B. J. (2004). 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*, 172(7), 3989-3993

- Kreckler, L. M., Wan, T. C., Ge, Z. D., & Auchampach, J. A. (2006). Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> but not the A<sub>3</sub> adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 317(1), 172-180
- Kreth, S., Kaufmann, I., Ledderose, C., Luchting, B., & Thiel, M. (2009). Reduced ligand affinity leads to an impaired function of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor of human granulocytes in sepsis. *J Cell Mol Med*, 13(5), 985-994
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30(1), 16-34
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., & Gabrilovich, D. I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*, 172(2), 989-999
- Kvarnhammar, A. M., & Cardell, L. O. (2012). Pattern-recognition receptors in human eosinophils. *Immunology*, 136(1), 11-20
- Lee, H. S., Chung, H. J., Lee, H. W., Jeong, L. S., & Lee, S. K. (2011). Suppression of inflammation response by a novel A(3) adenosine receptor agonist thio-Cl-IB-MECA through inhibition of Akt and NF-kappaB signaling. *Immunobiology*, 216(9), 997-1003
- Lee, H. T., Kim, M., Joo, J. D., Gallos, G., Chen, J. F., & Emala, C. W. (2006). A<sub>3</sub> adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(4), R959-969
- Lee, H. T., Xu, H., Nasr, S. H., Schnermann, J., & Emala, C. W. (2004). A<sub>1</sub> adenosine receptor knockout mice exhibit increased renal injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286(2), F298-306
- Li, H. Y., Wang, S. M., Liu, H. M., Bu, S. S., Li, J., Han, D., . . . Wu, G. Y. (2009). Separation and identification of purine nucleosides in the urine of patients with malignant cancer by reverse phase liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 44(5), 641-651
- Loo, Y. M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., . . . Gale, M., Jr. (2008). Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*, 82(1), 335-345
- Machnicka, M. A., Milanowska, K., Osman Oglou, O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., . . . Grosjean, H. (2013). MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D262-267
- Martin, C., Leone, M., Viviand, X., Ayem, M. L., & Guieu, R. (2000). High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med*, 28(9), 3198-3202
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., & Tschoopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 440(7081), 237-241
- Martinson, E. A., Johnson, R. A., & Wells, J. N. (1987). Potent adenosine receptor antagonists that are selective for the A<sub>1</sub> receptor subtype. *Mol Pharmacol*, 31(3), 247-252
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, 991-1045
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397
- Mencacci, A., Montagnoli, C., Bacci, A., Cenci, E., Pitzurra, L., Spreca, A., . . . Romani, L. (2002). CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *J Immunol*, 169(6), 3180-3190
- Merrill, J. T., Shen, C., Schreibman, D., Coffey, D., Zakharenko, O., Fisher, R., . . . Cronstein, B. N. (1997). Adenosine A<sub>1</sub> receptor promotion of multinucleated giant cell formation by

- human monocytes: a mechanism for methotrexate-induced nodulosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 40(7), 1308-1315
- Meylan, E., & Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell*, 22(5), 561-569
- Murphree, L. J., Sullivan, G. W., Marshall, M. A., & Linden, J. (2005). Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J*, 391(Pt 3), 575-580
- Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M., Mahlke, K., Seidler, L., & Haußner-Siller, I. (2009). *Immunologie*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mustafa, S. J., Nadeem, A., Fan, M., Zhong, H., Belardinelli, L., & Zeng, D. (2007). Effect of a specific and selective A(2B) adenosine receptor antagonist on adenosine agonist AMP and allergen-induced airway responsiveness and cellular influx in a mouse model of asthma. *J Pharmacol Exp Ther*, 320(3), 1246-1251
- Nadeem, A., Fan, M., Ansari, H. R., Ledent, C., & Jamal Mustafa, S. (2007). Enhanced airway reactivity and inflammation in A2A adenosine receptor-deficient allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292(6), L1335-1344
- Nakajima, H., Watanabe, N., Shibata, F., Kitamura, T., Ikeda, Y., & Handa, M. (2006). N-terminal region of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon is critical for cell cycle arrest, apoptosis, and functional maturation during myeloid differentiation. *J Biol Chem*, 281(20), 14494-14502
- Novitskiy, S. V., Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Huang, Y., Tikhomirov, O. Y., . . . Dikov, M. M. (2008). Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood*, 112(5), 1822-1831
- Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414(6866), 916-920
- Ouyang, X., Ghani, A., Malik, A., Wilder, T., Colegio, O. R., Flavell, R. A., . . . Mehal, W. Z. (2013). Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A(2)A receptor and the HIF-1alpha pathway. *Nat Commun*, 4, 2909
- Palmer, T. M., Poucher, S. M., Jacobson, K. A., & Stiles, G. L. (1995). 125I-4-(2-[7-amino-2-[2-furyl][1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5] triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol, a high affinity antagonist radioligand selective for the A2a adenosine receptor. *Mol Pharmacol*, 48(6), 970-974
- Panther, E., Idzko, M., Herouy, Y., Rheinen, H., Gebicke-Haerter, P. J., Mrowietz, U., . . . Norgauer, J. (2001). Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J*, 15(11), 1963-1970
- Parker, W. B., Barrow, E. W., Allan, P. W., Shaddix, S. C., Long, M. C., Barrow, W. W., . . . Maddry, J. A. (2004). Metabolism of 2-methyladenosine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 84(5), 327-336
- Parker, W. B., & Long, M. C. (2007). Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development. *Curr Pharm Des*, 13(6), 599-608
- Peach, R. J., Bajorath, J., Naemura, J., Leytze, G., Greene, J., Aruffo, A., & Linsley, P. S. (1995). Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J Biol Chem*, 270(36), 21181-21187
- Penafuerte, C., Bautista-Lopez, N., Boulassel, M. R., Routy, J. P., & Galipeau, J. (2009). The human ortholog of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion protein induces potent ex vivo natural killer cell activation and maturation. *Cancer Res*, 69(23), 9020-9028
- Platzer, B., Jorgl, A., Taschner, S., Hocher, B., & Strobl, H. (2004). RelB regulates human dendritic cell subset development by promoting monocyte intermediates. *Blood*, 104(12), 3655-3663

- Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., . . . Ruland, J. (2010). Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol*, 11(1), 63-69
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., . . . Beutler, B. (1998a). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282(5396), 2085-2088
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M. Y., Van Huffel, C., McNally, O., . . . Beutler, B. (1998b). Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis*, 24(3), 340-355
- Punekar, A. S., Shepherd, T. R., Liljeruhm, J., Forster, A. C., & Selmer, M. (2012). Crystal structure of RlmM, the 2'-O-ribose methyltransferase for C2498 of Escherichia coli 23S rRNA. *Nucleic Acids Res*, 40(20), 10507-10520
- Purta, E., O'Connor, M., Bujnicki, J. M., & Douthwaite, S. (2009). YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA. *Mol Microbiol*, 72(5), 1147-1158
- Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L. L., Louie, S., Cupp, J. E., . . . Dixit, V. M. (2011). Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol*, 186(11), 6553-6561
- Ramakers, B. P., Riksen, N. P., van der Hoeven, J. G., Smits, P., & Pickkers, P. (2011). Modulation of innate immunity by adenosine receptor stimulation. *Shock*, 36(3), 208-215
- Rathinam, V. A., Vanaja, S. K., & Fitzgerald, K. A. (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*, 13(4), 333-332
- Reutershan, J., Cagnina, R. E., Chang, D., Linden, J., & Ley, K. (2007). Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol*, 179(2), 1254-1263
- Rizzi, M., Tschan, M. P., Britschgi, C., Britschgi, A., Hugli, B., Grob, T. J., . . . Tobler, A. (2007). The death-associated protein kinase 2 is up-regulated during normal myeloid differentiation and enhances neutrophil maturation in myeloid leukemic cells. *J Leukoc Biol*, 81(6), 1599-1608
- Rose, F. R., Hirschhorn, R., Weissmann, G., & Cronstein, B. N. (1988). Adenosine promotes neutrophil chemotaxis. *J Exp Med*, 167(3), 1186-1194
- Ryzhov, S., Goldstein, A. E., Biaggioni, I., & Feoktistov, I. (2006). 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*, 70(2), 727-735
- Ryzhov, S., Goldstein, A. E., Matafonov, A., Zeng, D., Biaggioni, I., & Feoktistov, I. (2004). Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A2B-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J Immunol*, 172(12), 7726-7733
- Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Novitskiy, S. V., Blackburn, M. R., Biaggioni, I., & Feoktistov, I. (2008). Effect of A2B adenosine receptor gene ablation on adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines. *J Pharmacol Exp Ther*, 324(2), 694-700
- Salvatore, C. A., Tilley, S. L., Latour, A. M., Fletcher, D. S., Koller, B. H., & Jacobson, M. A. (2000). Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem*, 275(6), 4429-4434
- Sander, L. E., Davis, M. J., Boekschoten, M. V., Amsen, D., Dascher, C. C., Ryffel, B., . . . Blander, J. M. (2011). Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*, 474(7351), 385-389
- Saneyoshi, M., Oashi, Z., Harada, F., & Nishimura, S. (1972). Isolation and characterization of 2-methyladenosine from Escherichia coli tRNA Glu 2, tRNA Asp 1, tRNA His 1 and tRNA Arg. *Biochim Biophys Acta*, 262(1), 1-10

- Schmidt, W., Arnold, H. H., & Kersten, H. (1975). Biosynthetic pathway of ribothymidine in *B. subtilis* and *M. lysodeikticus* involving different coenzymes for transfer RNA and ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 2(7), 1043-1051
- Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G., & Garrido, C. (2007). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*, 81(1), 15-27
- Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Soellner, J., . . . Maraskovsky, E. (2004). Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 103(4), 1391-1397
- Schroder, K., & Tschoop, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832
- Sharma, S., & Fitzgerald, K. A. (2011). Innate immune sensing of DNA. *PLoS Pathog*, 7(4), e1001310
- Shi, Y., Evans, J. E., & Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 425(6957), 516-521
- Soloviov, D. A., Pluskota, E., & Plow, E. F. (2005). Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem*, 280(2), 1336-1345
- Sommer, S., Salditt-Georgieff, M., Bachenheimer, S., Darnell, J. E., Furuichi, Y., Morgan, M., & Shatkin, A. J. (1976). The methylation of adenovirus-specific nuclear and cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res*, 3(3), 749-765
- Sottofattori, E., Anzaldi, M., & Ottonello, L. (2001). HPLC determination of adenosine in human synovial fluid. *J Pharm Biomed Anal*, 24(5-6), 1143-1146
- Stagg, J., & Smyth, M. J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, 29(39), 5346-5358
- Straub, R. H., Pongratz, G., Gunzler, C., Michna, A., Baier, S., Kees, F., . . . Scholmerich, J. (2002). Immunoregulation of IL-6 secretion by endogenous and exogenous adenosine and by exogenous purinergic agonists in splenic tissue slices. *J Neuroimmunol*, 125(1-2), 73-81
- Straub, R. H., Rauch, L., Rauh, L., & Pongratz, G. (2011). Sympathetic inhibition of IL-6, IFN-gamma, and KC/CXCL1 and sympathetic stimulation of TGF-beta in spleen of early arthritic mice. *Brain Behav Immun*, 25(8), 1708-1715
- Sun, C. X., Zhong, H., Mohsenin, A., Morschel, E., Chunn, J. L., Molina, J. G., . . . Blackburn, M. R. (2006). Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J Clin Invest*, 116(8), 2173-2182
- Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M. J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D. A., & Leenen, P. J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*, 172(7), 4410-4417
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820
- Tanaka, T., & Weisblum, B. (1975). Systematic difference in the methylation of ribosomal ribonucleic acid from gram-positive and gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 123(2), 771-774
- Toh, S. M., Xiong, L., Bae, T., & Mankin, A. S. (2008). The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA. *RNA*, 14(1), 98-106
- Toma, C., Higa, N., Koizumi, Y., Nakasone, N., Ogura, Y., McCoy, A. J., . . . Suzuki, T. (2010). Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *J Immunol*, 184(9), 5287-5297
- Travain, M. I., & Wexler, J. P. (1999). Pharmacological stress testing. *Semin Nucl Med*, 29(4), 298-318
- Tsutsui, S., Schnermann, J., Noorbakhsh, F., Henry, S., Yong, V. W., Winston, B. W., . . . Power, C. (2004). A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates

- neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci*, 24(6), 1521-1529
- Tuck, M. T., Wiehl, P. E., & Pan, T. (1999). Inhibition of 6-methyladenine formation decreases the translation efficiency of dihydrofolate reductase transcripts. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(8), 837-851
- Van Gool, S. W., Vandenberghe, P., de Boer, M., & Ceuppens, J. L. (1996). CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev*, 153, 47-83
- Vazquez, J. F., Clement, H. W., Sommer, O., Schulz, E., & van Calker, D. (2008). Local stimulation of the adenosine A<sub>2B</sub> receptors induces an increased release of IL-6 in mouse striatum: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem*, 105(3), 904-909
- Voisin, M. B., Buzoni-Gatel, D., Bout, D., & Velge-Roussel, F. (2004). Both expansion of regulatory GR1+ CD11b+ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis. *Infect Immun*, 72(9), 5487-5492
- Wanner, B. L. (1983). Overlapping and separate controls on the phosphate regulon in *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol*, 166(3), 283-308
- Watanabe, Y., & Akaike, T. (1994). Activation signal induces the expression of B cell-specific CD45R epitope (6B2) on murine T cells. *Scand J Immunol*, 39(5), 419-425
- Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J. K., Werman, B., Krelin, Y., . . . Apte, R. N. (2004). The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2434-2439
- Williams, A. E. (2011). *Immunology: Mucosal and Body Surface Defences*: Wiley.
- Wilson, J. M., Ross, W. G., Agbai, O. N., Frazier, R., Figler, R. A., Rieger, J., . . . Ernst, P. B. (2009). The A<sub>2B</sub> adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J Immunol*, 182(8), 4616-4623
- Yang, D., Zhang, Y., Nguyen, H. G., Koupenova, M., Chauhan, A. K., Makitalo, M., . . . Ravid, K. (2006). The A<sub>2B</sub> adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest*, 116(7), 1913-1923
- Yarian, C., Townsend, H., Czestkowski, W., Sochacka, E., Malkiewicz, A. J., Guenther, R., . . . Agris, P. F. (2002). Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides. *J Biol Chem*, 277(19), 16391-16395
- Yi, H., Guo, C., Yu, X., Zuo, D., & Wang, X. Y. (2012). Mouse CD11b+Gr-1+ myeloid cells can promote Th17 cell differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 189(9), 4295-4304
- Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M., & Gabrilovich, D. I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 181(8), 5791-5802
- Zarek, P. E., Huang, C. T., Lutz, E. R., Kowalski, J., Horton, M. R., Linden, J., . . . Powell, J. D. (2008). A<sub>2A</sub> receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, 111(1), 251-259
- Zeh, H. J., 3rd, & Lotze, M. T. (2005). Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother*, 28(1), 1-9
- Zhong, H., Belardinelli, L., Maa, T., Feoktistov, I., Biaggioni, I., & Zeng, D. (2004). A<sub>2B</sub> adenosine receptors increase cytokine release by bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 30(1), 118-125
- Zhou, J., & Rudd, K. E. (2013). EcoGene 3.0. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D613-624
- Zhou, Y., Murthy, J. N., Zeng, D., Belardinelli, L., & Blackburn, M. R. (2010). Alterations in adenosine metabolism and signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, 5(2), e9224

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, welche mich bisher in jeder Lebenslage uneingeschränkt unterstützt hat. Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Mutter, die mich zu meinem Wohl häufig gefordert, stets jedoch liebevoll gefördert hat.

Als nächstes gilt ein großes Dankeschön meinem Betreuer Dr. Christian Hotz, der im Umgang mit seinen Doktoranden immer die nötige Umsicht und Geduld bewiesen hat und sein immenses fachliches Wissen stets wohlwollend und freundschaftlich mit einem teilte.

Bei meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Dr. Carole Bourquin bedanke ich mich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie für die fortwährende wissenschaftliche, klinische und persönliche Unterstützung, auch über unsere Landesgrenzen hinaus.

Zuletzt bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres für meine Aufnahme in das Promotionsförderprogramm „FöFoLe“ der LMU München und die damit verbundene Aufnahme in seine Abteilung für klinische Pharmakologie, welche mir die Anfertigung dieser Dissertation letztlich ermöglichte.

## **Eidesstattliche Versicherung**

**Jarosch, Alexander Benjamin**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**"Analyse des pro-inflammatorischen Potenzials von modifizierten Adenosin-Nukleosiden"**

selbstständig 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.

München, den 6.11.2014

---