

**Aus dem Institut für Immunologie**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



# **Die immunregulativen Funktionen von adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Jenny Großmann**

aus Dresden

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 30. Januar 2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Stefan Bauer

1.Korreferent: Prof. Dr. Friedemann Weber

*GEWIDMET* **RICHARD GEBHARDT**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Das Immunsystem im Überblick</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Das angeborene Immunsystem	2
<b>1.2.</b>	<b>Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs)</b>	<b>4</b>
1.2.1.	Überblick der PRRs	4
1.2.2.	Toll-like Rezeptoren (TLRs)	6
1.2.3.	Zytosolische PRRs	12
<b>1.3.</b>	<b>Signalgebung in der Typ I Interferon-Antwort</b>	<b>15</b>
<b>1.4.</b>	<b>Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)</b>	<b>19</b>
1.4.1.	Mitglieder der ADAR-Familie	24
<b>1.5.</b>	<b>ADAR1</b>	<b>25</b>
<b>1.6.</b>	<b>ADAR1 in funktionellen biologischen Prozessen</b>	<b>27</b>
<b>1.7.</b>	<b>ADAR1 und Typ I Interferone</b>	<b>29</b>
<b>1.8.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>31</b>
1.8.1.	Einfluss von ADAR1 auf die Typ I Interferon-Induktion	31
1.8.2.	Einfluss von ADAR1 auf die differentielle Zellentwicklung	32
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>34</b>
<b>2.1.</b>	<b>Geräte</b>	<b>34</b>
<b>2.2.</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>35</b>
<b>2.3.</b>	<b>Puffer</b>	<b>37</b>
<b>2.4.</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>38</b>
<b>2.5.</b>	<b>Kits</b>	<b>39</b>
<b>2.6.</b>	<b>Medien und Zusätze (Zellkultur)</b>	<b>39</b>
<b>2.7.</b>	<b>Antikörper</b>	<b>40</b>
<b>2.8.</b>	<b>Stimulanzen/Viren</b>	<b>41</b>

<b>2.9.</b>	<b>Primer</b>	<b>42</b>
<b>2.10.</b>	<b>siRNA</b>	<b>42</b>
<b>2.11.</b>	<b>Mausstämme</b>	<b>42</b>
<b>2.12.</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>43</b>
<b>2.13.</b>	<b>Software</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>45</b>
<b>3.1.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>45</b>
3.1.1.	RNA-Isolation aus primären Zellen	45
3.1.2.	DNase-Verdau	45
3.1.3.	DNA-Extraktion aus Mäuseschwänzen	46
3.1.4.	PCR	47
3.1.5.	Gelelektrophorese von DNA oder RNA	47
3.1.6.	Messung von DNA/RNA-Konzentrationen	47
3.1.7.	Herstellung von siRNA und VACV70mer	48
3.1.8.	Schmelzkurven von siRNA und VACV70mer	48
<b>3.2.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>49</b>
3.2.1.	Herstellung von Ganzzelllysaten	49
3.2.2.	BCA-Assay	49
3.2.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.2.4.	Western Blot	50
3.2.5.	Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay (ELISA)	52
<b>3.3.</b>	<b>Maus-Typisierung und -Präparation</b>	<b>54</b>
3.3.1.	ADAR1 <sup>f7-9</sup> /LysMCre-Maus	54
3.3.2.	ADAR1 <sup>f7-9</sup> /CD11cCre-Maus	56
3.3.3.	Präparation des Knochenmarks	57
<b>3.4.</b>	<b>Arbeit mit primären Zellen</b>	<b>58</b>
3.4.1.	Bestimmung der Zellzahl	58
3.4.2.	Generierung von Makrophagen mittels M-CSF	58
3.4.3.	Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen mittels Flt3L	59
3.4.4.	Generierung von myeloiden dendritischen Zellen mittels GM-CSF	60
3.4.5.	Isolation von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) aus „Buffy coats“	60
3.4.6.	Isolation humaner Monozyten	61
3.4.7.	siRNA-vermittelter ADAR1-Knockdown in humanen Monozyten	62

3.4.8.	Stimulation von primären Zellen	63
3.4.9.	MTT-Test muriner M-CSF-generierter Makrophagen	64
<b>3.5.</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	<b>64</b>
3.5.1.	Oberflächenfärbung für Durchflusszytometrie	65
<b>3.6.</b>	<b>Immunfluoreszenz</b>	<b>66</b>
<b>3.7.</b>	<b>Microarray</b>	<b>67</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>68</b>
<b>4.1.</b>	<b>siRNA-vermittelter ADAR1-Knockdown in humanen Monozyten</b>	<b>68</b>
4.1.1.	Isolation von humanen Monozyten aus PBMCs	68
4.1.2.	Etablierung und Validierung des siRNA-Knockdowns in humanen Monozyten	69
4.1.3.	Typ I Interferon-Freisetzung der Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden	71
<b>4.2.</b>	<b>ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Maus</b>	<b>73</b>
4.2.1.	Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark	73
4.2.2.	Typ I Interferon-Freisetzung der M-CSF-generierten Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden	75
4.2.3.	ADAR1-Induktion in M-CSF-generierten Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden	78
4.2.4.	Microarray-Analyse	79
4.2.5.	Untersuchung der Typ I Interferon-Signalmoleküle	84
4.2.6.	IRF3- und IRF7-Translokation	92
<b>4.3.</b>	<b>ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Maus</b>	<b>95</b>
4.3.1.	Differenzierung verschiedener CD11c-exprimierender Zellpopulationen	96
4.3.2.	Typ I Interferon-Freisetzung der differenzierten Zellen nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden	100
4.3.3.	Phänotypische Charakterisierung der Knochenmarkszellpopulationen	104
4.3.4.	Phänotypische Charakterisierung der peripheren Immunzellpopulationen	105
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
<b>5.1.</b>	<b>Modulatorische Rolle von ADAR1 bei der Typ I Interferon-Induktion</b>	<b>107</b>
5.1.1.	ADAR1 als Typ I Interferon-Suppressor	110
5.1.2.	ADAR1 als Typ I Interferon-Aktivator	116
<b>5.2.</b>	<b>Einfluss von ADAR1 auf die Entwicklung von Immunzellen</b>	<b>123</b>

5.2.1.	Einfluss von ADAR1 auf die Entwicklung <i>in vitro</i> differenzierter Immunzellen	124
5.2.2.	Einfluss von ADAR1 auf die <i>in vivo</i> Entwicklung von Immunzellen	127
<b>5.3.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>130</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> _____	<b>134</b>
<b>6.1.</b>	<b>Summary</b>	<b>136</b>
<b>III.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> _____	<b>138</b>
<b>IV.</b>	<b>Anhang</b> _____	<b>156</b>
<b>V.</b>	<b>Liste der akademischen Lehrer</b> _____	<b>157</b>
<b>VI.</b>	<b>Danksagung</b> _____	<b>158</b>
<b>VII.</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> _____	<b>159</b>

# I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

∞	unendlich
↺	Zentrifugation
~	circa
AGS	Aicardi-Goutières-Syndrom
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
dsRBD	dsRNA-Bindedomäne
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
h	hour (Stunde)
IκB	Inhibitor von kappaB
IFN	Interferon
IKK	IκB Kinasen
IL	Interleukin
IPS	IFN-β promoter stimulator 1
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	IFN-stimulated gene
ISRE	IFN-stimulated responsive elements
Jak	Januskinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	mitogen-activated protein
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MHC	Major histocompatibility complex
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
MDA5	melanoma differentiation-associated gene 5
NF-κB	nuclear factor κ B



PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS <sup>++</sup>	PBS mit Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>
PBS <sup>def</sup>	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>
PKR	dsRNA-activated protein kinase
PRR	pattern-recognition receptor
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering RNA
scRNA	scrambled RNA
STAT	signal transducers and activators of transcription
supp.	supplemetiert
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TIR	Toll/ Interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
SeV	Sendai Virus
VACV	Vaccinia Virus
ZBD	Z-DNA-Bindedomänen

## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1.1</b> Detektion mikrobieller Strukturen durch das angeborene Immunsystem _____	<b>4</b>
<b>Abb. 1.2</b> TLR-Struktur _____	<b>6</b>
<b>Abb. 1.3</b> Übersicht über TRIF-unabhängige und TRIF-abhängige Signalwege _____	<b>12</b>
<b>Abb. 1.4</b> Schematische Darstellung des IRF3 und IRF7-vermittelten biphasischen Mechanismus zur Induktion der IFN $\alpha$ / $\beta$ -Gene _____	<b>19</b>
<b>Abb. 1.5</b> Die Deaminierungsreaktion von Adenosin zu Inosin durch ADARs _____	<b>20</b>
<b>Abb. 1.6</b> ADAR-vermittelte A $\rightarrow$ I-Editierung _____	<b>21</b>
<b>Abb. 1.7</b> Humane ADAR-Familienmitglieder _____	<b>24</b>
<b>Abb. 1.8</b> ADAR1 kommt in zwei Isoformen vor _____	<b>26</b>
<b>Abb. 3.1</b> Generierung der ADAR1 <sup>f7-9</sup> /LysMCre-Maus _____	<b>55</b>
<b>Abb. 3.2</b> Strategie der Genotypisierung des Flox-Status _____	<b>56</b>
<b>Abb. 3.3</b> PCR zur Untersuchung ADAR1-Flox-Status und des LysMcre-Status _____	<b>56</b>
<b>Abb. 3.4</b> PCR zur Untersuchung des CD11cCre-Status _____	<b>57</b>
<b>Abb. 4.1</b> Reinheit der humanen Monozyten _____	<b>69</b>
<b>Abb. 4.2</b> siRNA-vermittelter ADAR1-Knockdown in humanen Monozyten _____	<b>70</b>
<b>Abb. 4.3</b> Zytokin-Freisetzung der siRNA-behandelten Monozyten nach 4 h, 12 h und 20 h _____	<b>72</b>
<b>Abb. 4.4</b> Kontrolle der Makrophagendifferenzierung _____	<b>74</b>
<b>Abb. 4.5</b> Expression von M1- und M2-Markern auf M-CSF-generierten Makrophagen _____	<b>75</b>
<b>Abb. 4.6</b> Zytokin-Freisetzung ADAR1-defizienter Makrophagen nach 4 h und 20 h _____	<b>77</b>
<b>Abb. 4.7</b> MTT-Assay stimulierter Makrophagen nach 20 h _____	<b>78</b>
<b>Abb. 4.8</b> ADAR1-Proteinexpression in M-CSF-generierten Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder Sendai Virus _____	<b>79</b>
<b>Abb. 4.9</b> mRNA-Expression der <i>Typ I IFN</i> -Gene _____	<b>80</b>

<b>Abb. 4.10</b> „Heatmap“ der meist regulierten Gene in ADAR1-defizienten Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder SeV _____	<b>82</b>
<b>Abb. 4.11</b> Sca1-Expression auf ADAR1-defizienten Makrophagen _____	<b>83</b>
<b>Abb. 4.12</b> Expression wichtiger Signalmoleküle der Typ I IFN-Signalkaskade in Makrophagen nach Stimulation mit LPS _____	<b>87</b>
<b>Abb. 4.13</b> Expression wichtiger Signalmoleküle der Typ I IFN-Signalkaskade in Makrophagen nach Infektion mit Sendai Virus _____	<b>89</b>
<b>Abb. 4.14</b> TRIF-Expression in Makrophagen nach Stimulation mit LPS _____	<b>91</b>
<b>Abb. 4.15</b> Translokation von IRF3 und IRF7 in Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder SeV _____	<b>94</b>
<b>Abb. 4.16</b> Kontrolle der Makrophagendifferenzierung _____	<b>97</b>
<b>Abb. 4.17</b> Kontrolle der pDC-Differenzierung _____	<b>98</b>
<b>Abb. 4.18</b> Zell-Ausbeute in mDC-Kulturen _____	<b>99</b>
<b>Abb. 4.19</b> Kontrolle der mDC-Differenzierung _____	<b>100</b>
<b>Abb. 4.20</b> Zytokin-Freisetzung ADAR1-defizienter Makrophagen nach 4 h und 20 h _____	<b>102</b>
<b>Abb. 4.21</b> Zytokin-Freisetzung ADAR1-defizienter pDCs nach 4 h und 20 h _____	<b>103</b>
<b>Abb. 4.22</b> DC-Populationen im Knochenmark _____	<b>104</b>
<b>Abb. 4.23</b> DC-Populationen in der Lunge _____	<b>105</b>
<b>Abb. 6.1</b> ADAR1 als Typ I IFN-Modulator _____	<b>135</b>
<b>Abb. IV.1</b> Sekundärantikörper-Kontrollen für Immunfluoreszenz-Färbungen von IRF3 und IRF7 in Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder SeV _____	<b>156</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem im Überblick

Immunantworten werden durch die Einteilung in ein angeborenes und in ein adaptives Immunsystem kategorisiert. Das adaptive Immunsystem wird weiter in ein humorales und ein zelluläres System unterteilt. Die Mechanismen der humoralen Immunität sind durch Generierung von Antikörpern, die von B-Zellen produziert werden, bei der Beseitigung von Pathogenen im Blut oder in Gewebsflüssigkeiten involviert. Dahingegen sind die zellulären Mechanismen, die durch Killer-T-Zellen vermittelt werden, für die Beseitigung von Tumorzellen und intrazellulären Pathogenen verantwortlich. T- und B-Lymphozyten exprimieren spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCRs) bzw. B-Zell-Rezeptoren (BCRs), die ein breites Spektrum von verschiedenen Antigenen erkennen. TCRs und BCRs werden durch DNA-Rekombination während der Differenzierung zu T- und B-Zellen generiert. Jeder TCR bzw. BCR besteht aus einer variablen und einer konstanten Region. Die variable Region wird durch verschiedene Gensegmente kodiert. Jedes Mitglied dieser Gensegmente wird zufällig mit den anderen Segmenten verbunden, so dass ein Spektrum von Rezeptoren mit hoher Diversität entsteht. Dabei können auch Rezeptoren entstehen, die mit körpereigenen Autoantigenen reagieren. Lymphozyten, die einen selbsterkennenden Rezeptor tragen, werden während der Differenzierung ausgeschlossen. Gelangt ein Pathogen in den Organismus werden T- und B-Lymphozyten aktiviert und die Entwicklung von Killer-T-Zellen sowie die Produktion von Antikörpern wird induziert. Zur selben Zeit werden Gedächtnis-T- und -B-Zellen generiert, die bei einer wiederholten Infektion, innerhalb eines kurzen Zeitraums auf dasselbe Pathogen bzw. Antigen reagieren können.

Eine primäre adaptive Immunantwort setzt ein funktionierendes angeborenes Immunsystem voraus. Auch dem angeborenen Immunsystem stehen humorale (z.B. Komplementfaktoren, Defensine) sowie zelluläre Mechanismen zu Verfügung. Die zellulären Mechanismen werden durch Leukozyten sowie Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt, die kollektiv als Phagozyten bezeichnet werden, da sie Pathogene aufnehmen und abtöten können. Die dendritische Zelle ist dabei darauf spezialisiert Antigenpeptide von Pathogenen an T- und B-Lymphozyten zu präsentieren. Nachdem das Pathogen aufgenommen wurde und verdaut, kleine Peptide über MHC (Major Histocompatibility Complex)-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert werden, migriert die Zelle vom Ort der Infektion zu den regionalen Lymphknoten. Dort präsentiert sie das Antigen naiven Lymphozyten mit den entsprechenden Rezeptoren

und induziert deren klonale Expansion. Für eine effiziente T- bzw. B-Zellreaktion muss eine Antigen-präsentierende dendritische Zelle über weitere angeborene Mechanismen aktiviert werden. Diese Mechanismen werden durch eine Vielfalt an Keimbahn-kodierten Rezeptoren (z.B. TLRs), die zwischen Selbst und Fremd unterscheiden können, vermittelt und führen schließlich zur Induktion kostimulatorischer Moleküle sowie der Freisetzung von Zytokinen.

(Akira; Kumar, Kawai et al. 2011; Murphy 2011)

### **1.1.1. Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Linie in der Abwehr gegen Infektionen. Keimbahn-kodierte Rezeptoren erkennen dabei molekulare Motive. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Initiation einer pro-inflammatorischen Immunantwort und ermöglicht somit die Beseitigung der Infektion (Bryant and Monie 2012). Dabei wird das angeborene Immunsystem als eine evolutionär ältere Strategie zur Erreger-Abwehr betrachtet, die sich vor der Abspaltung eines adaptiven Immunsystems entwickelte und immer noch die dominante Form der Abwehr in Pflanzen, Pilzen, Insekten und primitiven multizellulären Organismen darstellt (Hoffmann, Kafatos et al. 1999; Janeway and Medzhitov 2002).

Die Hauptaufgaben des angeborenen Immunsystems umfassen, als geschichtetes System, in Vertebraten das Errichten von physikalischen und chemischen Barrieren gegenüber infektiösen Agenzien, die Identifikation und Beseitigung von fremden Substanzen, die diese Barrieren überwunden haben, die Rekrutierung weiterer Immunzellen zur Infektionsstelle, die Produktion von bestimmten Mediatoren sowie die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch Antigenpräsentation.

Die physikalische und chemische Barriere wird u.a. durch die Barrierefunktion der Körperepithelien auf Grund ihrer spezialisierten Zell-Zell-Interaktionen (tight junctions) sowie der Sekretion von antimikrobiellen Enzymen und Peptiden (z.B. Defensine) gewährleistet.

Ist diese erste Barriere überwunden stehen angeborene Immunzellen, die sich in den umgebenden Geweben befinden zur Verfügung. Dazu gehören Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen, die das Pathogen über intrazelluläre oder oberflächlich exprimierte PRRs (Pattern-Recognition Receptors) erkennen. Diese Rezeptoren detektieren, direkt oder indirekt, bestimmte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), wie mikrobielle Nukleinsäuren, Lipoproteine und Kohlenhydrate oder sogenannte DAMPs (damage-associated molecular patterns), die von beschädigten Zellen freigesetzt werden. Aktivierte PRRs oligomerisieren und formieren sich zu einem großen multimeren Komplex, der eine Signalkaskade initiiert und die Freisetzung von Faktoren auslöst, die zu vaskulären Veränderungen führen und die Rekrutierung weiterer Immunzellen, wie zirkulierende Monozyten und Neutrophile, fördern.

Histamine, Prostaglandine und Stickstoffoxide wirken auf die vaskuläre glatte Muskulatur, indem sie eine Vasodilatation verursachen, die wiederum den Blutfluss erhöht und damit zirkulierende Leukozyten zum Ort der Infektion bringt. Gleichzeitig wirken inflammatorische Mediatoren, wie Histamine und Leukotriene auf endotheliale Zellen und erhöhen die vaskuläre Permeabilität und erlauben Plasmaproteinen und Leukozyten aus der Zirkulation auszutreten. Zytokine wie TNF (tumor necrosis factor) und IL1 (Interleukin 1) fördern die Leukozyten-Extravasation durch Induzierung einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen auf den endothelialen Zellen.

Aktiviert dendritische Zellen, Makrophagen und Neutrophile beseitigen an der Infektionsstelle fremde Partikel und Zelltrümmern durch Phagozytose und sezernieren dabei Zytokine, die die Lymphozyten-vermittelte adaptive Immunantwort formen, während Antigen-präsentierende Zellen über die Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen die Lymphozyten aktivieren.

Eine wichtige Rolle spielen auch die als Interferone (IFN) bekannten Zytokine, die durch eine virale Infektion induziert werden und daraufhin einen antiviralen Zustand in der infizierten Zelle selbst und in benachbarten Zellen auslösen. Unter anderem aktivieren sie eine bestimmte Klasse von Lymphozyten, die als natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bezeichnet werden und zur angeborenen Immunabwehr von Viren und anderen intrazellulären Pathogenen beitragen. Neben diesem zellulären Mechanismus besitzt das angeborene Immunsystem mit dem Komplementsystem noch eine weitere humorale Komponente. Dieses Verteidigungssystem besteht aus einer großen Anzahl verschiedener Plasmaproteine, die miteinander interagieren, um Pathogene zu lysieren oder zu opsonieren. Eine Opsonierung führt zu einer verbesserten Antigenaufnahme und Phagozytose und löst gleichzeitig eine Serie von inflammatorischen Reaktionen aus (Newton and Dixit 2012).

Insgesamt werden die Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems durch Keimbahn-kodierte Rezeptorsysteme (PRRs) reguliert, die auf allen Zellen gleichermaßen exprimiert sind und somit unverzüglich eine Immunantwort ermöglichen.

Ein großes Interesse der immunologischen Forschung besteht darin, diese regulativen Prozesse als Teil eines hochkomplexen Systems umfassender zu verstehen. Über medizinische Anwendungen können diese Prozesse beeinflusst werden, z.B. durch eine gezielte Aktivierung bei schweren Infektionskrankheiten oder Tumorerkrankungen oder im Sinne einer Immunsuppression bzw. Immunmodulation bei fehlgeleiteten Immunreaktionen, die zu Allergien, Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßung führen können (Murphy 2011).

## 1.2. Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs)

### 1.2.1. Überblick der PRRs

Wie beschrieben, beruht das angeborene Immunsystem auf Keimbahn-kodierten Rezeptorsystemen, die erlauben zwischen infektiösem Fremd und nicht-infektiösem Selbst zu unterscheiden. Abb. 1.1 zeigt einen Überblick dieser Rezeptorsysteme, deren Lokalisation sowie den entsprechenden Liganden, die als Substanzklassen zusammengefasst sind. Bei den Substanzklassen spricht man von sogenannten PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), wie mikrobiellen Nukleinsäuren, Lipoproteinen und Kohlenhydraten oder DAMPs (damage-associated molecular patterns), die von beschädigten Zellen freigesetzt werden. Die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd beruht vermutlich aber nicht nur auf der Beschränkung durch die Erkennung von PAMPs und DAMPs, sondern auch auf der Sequestrierung potentiell immunreaktiver Selbstmoleküle durch Kompartimentalisierung.

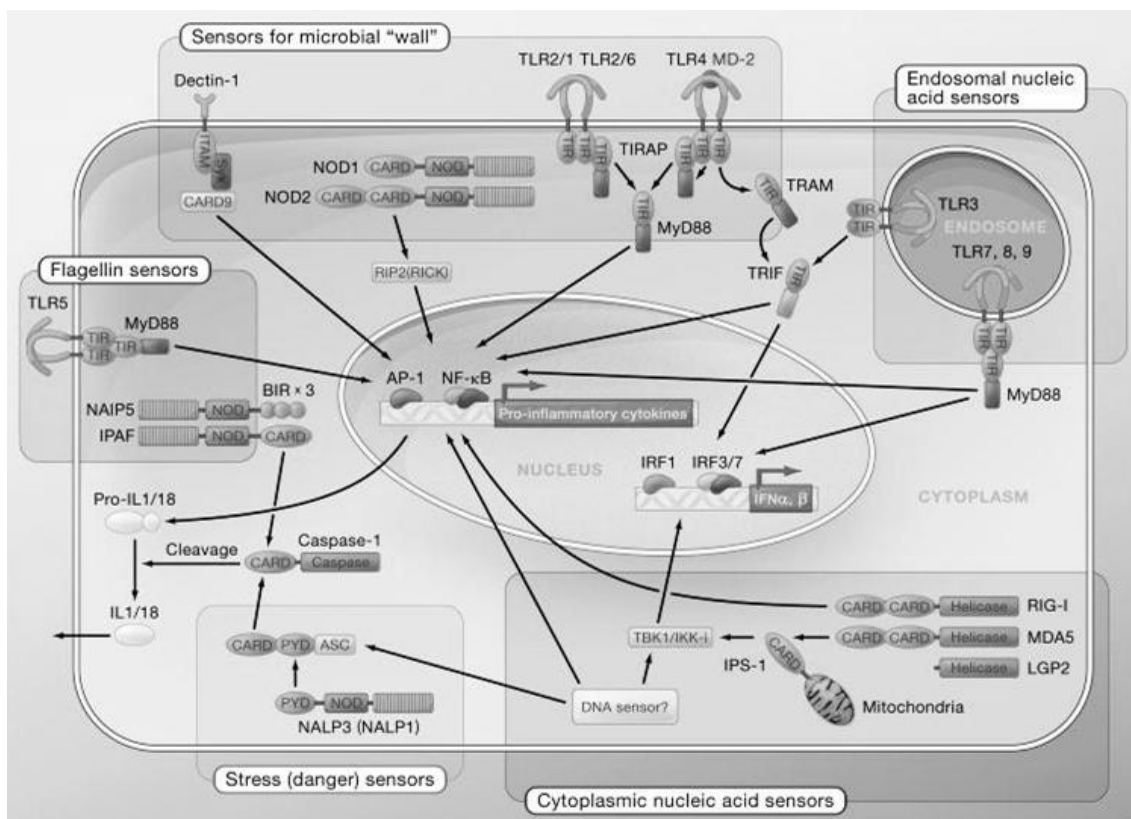


Abb. 1.1 Detektion mikrobieller Strukturen durch das angeborene Immunsystem (Ishii, Koyama et al. 2008)

PRRs können allgemein in fünf verschiedene Klassen unterteilt werden: TLRs (Toll-like receptors), NLRs (nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing receptors), RLRs (retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors), CTLs (C-type lectins) und ALRs (Absent-in-melanoma-like receptors).

Zusammen stellen diese Rezeptorfamilien ein umfangreiches Repertoire an „Abwehrposten“ bereit, die responsiv gegenüber aktivierenden Liganden exogener Natur, wie Pathogenen und Allergenen, sowie gegenüber endogenen Gefahr-Signalen sind.

TLRs sind in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert, wo sie ein breites Spektrum von Lipid- oder Protein-basierten Liganden erkennen können. TLRs kommen aber auch in endosomalen Membranen vor. Dort können sie auf Nukleinsäuren reagieren und stellen damit ein Schlüsselement in der antiviralen Immunantwort dar.

CTLs (z.B. Dectin-1) sind Membran-assoziierte Rezeptoren, die nur auf der Zelloberfläche vorkommen. CTLs erkennen generell Kohlenhydrat-basierte Liganden und sind damit wichtige Sensoren für die Erkennung von fungalen Infektionen.

NLRs, RLRs und ALRs befinden sich im Gegensatz zu den TLRs und CTLs im Zytoplasma. Die bisher charakterisierten NLRs (z.B. NALP3) reagieren auf ein Spektrum von viralen, bakteriellen und wirtseigenen Liganden. RLRs (z.B. RIG-I und MDA5) und ALRs (z.B. AIM2 als DNA-Sensor) erkennen bakterielle und virale RNA bzw. DNA.

Für viele Pathogene werden durch die Gesamtheit dieser Rezeptorsysteme gleichzeitig mehrere verschiedene Rezeptoren und die korrespondierenden Signalwege aktiviert. Die Rezeptoraktivierung führt zur Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort. Diese Antwort ist charakterisiert und kontrolliert durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.

(Hansen, Vojtech et al.; Bryant and Monie 2012)

Die Rezeptorsysteme bedienen sich dabei zur Signalgebung hochkonservierter Proteindomänen, wie LRRs (leucine-rich repeats), CARDs (caspase activation and recruitment domains), PYD (pyrin domains), NACHT-Domänen (domains present in NAIP, CIITA, HET-E and TP1), DD (death domain) sowie TIR-Domänen (Toll/Interleukin 1 receptor) (Zhang, Zmasek et al. 2010).

Neben den hier beschriebenen klassischen, signalgebenden Rezeptorsystemen gibt es auch PRRs, die als phagozytotische Rezeptoren die Aufnahme eines gebundenen Pathogens vermitteln (z.B. Mannose Rezeptor, Scavenger Rezeptor, DEC205). Auch sind chemotaktische PRRs bekannt, wie der fMet-Leu-Phe-Rezeptor, der N-formylierte Peptide von Bakterien erkennt und so Neutrophile und Monozyten zur Infektionsstelle leitet. Sezernierte, in Körperflüssigkeiten lösliche PRRs spielen v.a. eine Rolle bei der Pathogenopsonierung, der Aktivierung des Komplementsystems und in einigen Fällen bei dem Transfer von bestimmten PAMPs zu anderen PRRs. Darüber hinaus finden sich im Zytoplasma Systeme, die auf intrazelluläre Pathogene



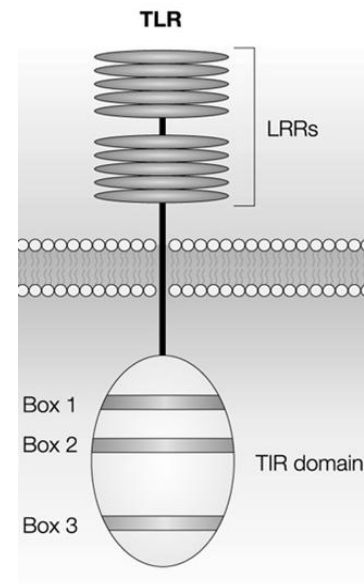
reagieren und deren Replikation blockieren (PKR, OAS) (Janeway and Medzhitov 2002; Murphy 2011).

### 1.2.2. Toll-like Rezeptoren (TLRs)

TLRs (Toll-like receptors) sind die am umfangreichsten untersuchten PRRs (Pattern recognition receptors) und werden als primäre Sensoren für Pathogene betrachtet. Nach der Entdeckung des Toll-Proteins in *Drosophila melanogaster* (Lemaitre, Nicolas et al. 1996) erweiterte sich das Feld der TLR-Immunbiologie rasch. Bisher sind in Vertebraten 13 TLR-Mitglieder bekannt (TLR1-13), wobei davon 10 TLR-Mitglieder im humanen System und 12 im murinen System exprimiert werden. TLR1 bis TLR9 sind in Mensch und Maus konserviert, wobei immer mehr Studien das Vorkommen von bestimmten Polymorphismen in verschiedenen Spezies als auch innerhalb verschiedener Populationen einer Spezies beschreiben (Bryant and Monie 2012; Netea, Wijmenga et al. 2012). TLR10 wird im humanen, aber aufgrund des Vorkommens eines Stopcodons nicht im murinem System exprimiert, während TLR11, 12 und 13 in der Maus aber nicht im Menschen exprimiert werden. Bis vor Kurzem wurde für TLR8 angenommen, dass dieser in der Maus, ähnlich wie

TLR10, inaktiv sei. Einige Berichte konnten aber zeigen, dass der murine TLR8 nicht nur eine Rolle bei der Produktion von Typ I Interferonen (IFN) als Antwort auf virale Pathogene spielt, sondern auch durch Ligation bakterieller RNA aktiviert wird (Cervantes, Weinerman et al. 2012). Die TLR-Familie erkennt verschiedene PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) unterschiedlicher pathogener Herkunft, wie z.B. von Bakterien, Viren, Pilzen oder einzelligen Parasiten. PAMPs sind biochemisch den Substanzklassen der Proteine, Lipide, Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren zuzurechnen (Kumar, Kawai et al. 2011).

TLR10 im Menschen sowie TLR12 und TLR13 in der Maus sind bisher nicht ausreichend charakterisiert und ihre Funktion noch nicht vollständig geklärt (Kawai and Akira 2010). Für TLR12 wurde eine Funktion bei der Abwehr von *Toxoplasma gondii* gezeigt (Koblansky, Jankovic et al. 2013), während TLR13 eine Rolle bei der Erkennung bakterieller RNA spielt (Oldenburg, Kruger et al. 2012).



**Abb. 1.2 TLR-Struktur** (Akira and Takeda 2004). TLRs bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist, einer Transmembrandomäne und einer zyttoplasmatischen, signalgebenden TIR-Domäne.

TLR1, 2, 4, 5, 6 und der murine TLR11 sind primär, aber nicht exklusiv, auf der Zelloberfläche exprimiert und dienen der Erkennung von PAMPs, die von Bakterien, Pilzen und Protozoen stammen. Dagegen liegen TLR3, 7, 8, 9 exklusiv in endosomalen Kompartimenten vor und erkennen primär Nukleinsäuren verschiedener Viren und Bakterien (Kawai and Akira 2010; Kumar, Kawai et al. 2011). Hierbei muss angemerkt werden, dass sich die Sichtweise über die zelluläre Lokalisation der TLRs als immobiles System in jüngerer Vergangenheit immer mehr hin zu einem mobilen und dynamischen Bild dieses Systems verändert, dessen Lokalisation innerhalb der Prozesse von PAMP-Erkennung und Signalgebung dynamisch reguliert wird (Kagan 2012).

TLRs gehören zu den Typ I Membran-Glykoproteinen und bestehen aus einer extrazellulären Domäne mit sogenannten LRRs (leucin rich repeats), die für die PAMP-Erkennung notwendig ist und einer zytoplasmatischen TIR (Toll/Interkeuin-1 receptor)-Domäne, die die weitere Signalgebung vermittelt (Carpenter and O'Neill 2009) (Abb. 1.2).

Die TLRs führen über ihre Signalwege (1.2.2.2) zur Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen. Diese Ereignisse leiten einerseits die Rekrutierung verschiedener Immunzellen ein und initiieren und modulieren andererseits die adaptive Immunantwort. Bei viralen Infektionen führen v.a. die Induktion von Typ I IFN (IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ ) und die IFN-induzierten Proteine zur Etablierung eines antiviralen Status in uninfizierten Zellen.

### **1.2.2.1. Liganden und Expression der TLR-Mitglieder**

TLRs werden auf verschiedenen Immunzellen, wie B-Zellen, dendritischen Zellen (DCs), Monozyten und Makrophagen exprimiert, aber auch auf Nicht-Immunzellen, wie Fibroblasten oder Epithelzellen (Lee and Kim 2007). Die TLR-Mitglieder können bezüglich ihrer primären, zellulären Lokalisation in zwei Subpopulationen unterteilt werden. So erkennen die primär auf der Oberfläche exprimierten TLR1, 2, 4, 5, 6 mikrobielle Komponenten wie Lipide, Lipoproteine und Proteine. TLR3, 7, 8 und TLR9 dagegen sind in intrazellulären Vesikeln wie Endosomen, Lysosomen und dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und erkennen verschiedene mikrobielle Nukleinsäurespezies (Kumar, Kawai et al. 2011).

TLR3 erkennt doppelsträngige (ds) RNA, wie sie z.B. als genomische RNA in dsRNA-Viren vorkommt und als Intermediate, während des Replikationszyklus von einzelsträngigen (ss) RNA-Viren entsteht (Alexopoulou, Holt et al. 2001). Zusätzlich erkennt dieser Rezeptor PolyI:C (polyinosinic polycytidylic acid), das als ein synthetisches dsRNA-Analogon bekannt ist (Field, Tytell et al. 1967). TLR7 wurde zunächst als ein PRR beschrieben, der Imidazoquinolin-Derivate wie Imiquimod oder Resiquimod (R848) und Guanin-Analoga wie Loxoribin erkennen kann. All

diese Derivate haben anti-virale und anti-tumorale Eigenschaften (Hemmi, Kaisho et al. 2002). Anschließend wurden Guanosin- und Uridin-reiche ssRNAs, synthetische Polyuridin ssRNAs und bestimmte siRNAs als weitere Liganden des TLR7 identifiziert (Bauer, Pigisch et al. 2008). TLR8 ist phylogenetisch dem TLR7 am ähnlichsten. Der humane TLR8 erkennt ssRNA und, ebenso wie der TLR7, R848 (Bauer, Pigisch et al. 2008). Für TLR9 charakterisierte man anhand synthetischer Oligodesoxynukleotide mit Phosphothioat-modifiziertem Desoxyribose-Rückgrat zunächst 2`-Desoxyribo-Cytidin-Guanosin (CpG)-DNA-Motive als Liganden, die in Vertebraten in geringerer Anzahl und durch die dort verbreitete DNA-Methylierung so nicht vorliegen (Bauer, Kirschning et al. 2001). Später wurde gezeigt, dass die TLR9-vermittelte DNA-Erkennung von DNA mit Phosphodiester-Rückgrat unabhängig von der Basensequenz induziert wird (Haas, Metzger et al. 2008).

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen PAMPs wird durch Bildung von TLR-Heterodimeren das PAMP-Spektrum erweitert. So vermittelt ein Heterodimer, gebildet aus TLR1 und TLR2, z.B. die Erkennung von bakteriellen Triacyl-Lipopeptiden, während TLR2/TLR6-Heterodimere bakterielle Diacyl-Lipopeptide detektieren (Kumar, Kawai et al. 2011).

In Tab. 1.1 ist das TLR-Expressionsprofil auf verschiedenen Zellpopulationen sowie die entsprechenden, bekannten TLR-Liganden zusammengefasst.

**Tab. 1.1 TLR-Expressionsprofil auf verschiedenen Zellpopulationen mit den entsprechenden bekannten TLR-Liganden** (Lee and Kim 2007; Abdelsadik and Trad 2011; Kumar, Kawai et al. 2011)

TLR	Ligand	Zelltyp*
<b>TLR1/2</b>	Triacyl-Lipopeptide	Mφ, cDCs, Neutrophile, Mastzellen
<b>TLR2</b>	Lipoteichonsäure, Lipopeptide (Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> ) Peptidoglycan, Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Hämagglutinin, Phospholipomannan, Glykosylphosphatidyl-Inositol Mucin, Zymosan	Mφ, cDCs, Neutrophile, Mastzellen
<b>TLR3</b>	Virale dsRNA, PolyI:C, ssRNA Virus, dsRNA Virus, respiratorisches Synzytial Virus, murines Cytomegalovirus	cDCs, murine Mφ, Endo/ Epithelzellen
<b>TLR4</b>	Lipopolysaccharid, Mannan, Glykoinositolphospholipide, Hüll- und Fusions- Proteine vom Mammatumorvirus bzw. respiratorischen syncytial Virus, nach H5N1 avian Influenza Virus Infektion entstehende endogene oxidierte Phospholipide, Pneumolysin von <i>Streptococcus pneumoniae</i> , Placitaxel	Mφ, cDCs, Neutrophile, Mastzellen, Eosinophile, murine B-Zellen
<b>TLR5</b>	bakterielles Flagellin	Monozyten, cDCs, intestinale Epithelzellen
<b>TLR6/2</b>	Diacyl-Lipopeptide von Mykoplasmen (MALP2), Lipoteichonsäure, Zymosan	Monozyten, cDCs, Neutrophile, Mastzellen

<b>TLR7</b>	ssRNA Virus, Purin Analoga (Imidazoquinoline), RNA von B Streptokokken, synthetische PolyU RNA, bestimmte siRNAs	pDCs, Neutrophile, Eosinophile
<b>TLR8 (human)</b>	ssRNA von RNA Viren, Purin Analoga (Imidazoquinoline)	Monozyten, cDCs, Neutrophile, Mastzellen
<b>TLR9</b>	dsDNA Viren, Herpes simplex Virus und murines Cytomegalievirus, CpG-Motive von Bakterien und Viren, Hemozoin vom Malaria Parasit	pDCs, NK Zellen, Eosinophile, Neutrophile, murine B-Zellen
<b>TLR10 (human)</b>	bisher nicht identifiziert	pDCs, B-Zellen
<b>TLR11 (murin)</b>	Uropathogene Bakterien, Profillin-ähnliches Molekül von <i>Toxoplasma gondii</i>	Mφ, Epithelzellen
<b>TLR12 (murin)</b>	<i>Toxoplasma gondii</i>	bisher nicht vollständig untersucht
<b>TLR13 (murin)</b>	Bakterielle RNA	bisher nicht vollständig untersucht

\*mindestens auf mRNA Ebene bestätigt, Mφ: Makrophagen, cDCs: konventionelle dendritische Zellen, pDCs: plasmazytoide dendritische Zellen

### 1.2.2.2. Signalgebung der TLR-Mitglieder

Die TLR-vermittelte Signalgebung wird durch ein enges und komplexes Netzwerk von verschiedenen Signalmolekülen dargestellt. Die in diesem Zusammenhang bekannten Signalwege werden im Folgenden beschrieben und sind zusammenfassend in Abb. 1.3 dargestellt.

Nach Liganden-Bindung, Rezeptor-Dimerisierung und konformationellen Veränderungen wird die TLR-Signalgebung primär durch die Rekrutierung von verschiedenen TIR-Domäne-aufweisenden Adaptermolekülen an die TIR-Domänen der verschiedenen TLRs vermittelt. Zu diesen Adaptermolekülen gehören MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$ ) (TICAM-1), TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Die Rekrutierung der Adaptermoleküle führt zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), IRF3 (interferon regulatory factor 3) und IRF7 sowie MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen, die wiederum die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Typ I IFN induzieren.

Alle TLRs bis auf den TLR3 rekrutieren MyD88 und initiieren damit die MyD88-abhängige Signalgebung, die in Makrophagen und konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen und entsprechend zur Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Zusätzlich zu MyD88 rekrutieren TLR1, 2, 4 und TLR6 ein weiteres Adaptermolekül, namens TIRAP, um die MyD88-abhängige Signalgebung zu vermitteln. TLR3 kann

aufgrund eines fehlenden Prolins im zytoplasmatischen Teil des TLR3, der eine Assoziation mit MyD88 verhindert, ausschließlich über den MyD88-unabhängigen Weg signalisieren (Jiang, Mak et al. 2004).

Neben der MyD88-abhängigen Signalgebung wird durch die Aktivierung von TLR3 und TLR4 das Adaptermolekül TRIF gebunden und führt zu einer TRIF-abhängigen Signalgebung, die durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF3 sowohl zur Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen als auch von Typ I IFN führt. TLR4 rekrutiert TRIF über ein weiteres Adaptermolekül, TRAM. Gleichzeitig löst TLR4 über die Bindung von TIRAP die MyD88-abhängige Signalgebung aus (Kumar, Kawai et al. 2011). TLR4 rekrutiert dabei zunächst TIRAP, das wiederum die Rekrutierung von MYD88 ermöglicht und damit die erste Phase der NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen-Aktivierung initiiert. Für die TRIF-abhängige Signalgebung wird TLR4 zum Endosom transportiert und formt einen Komplex mit TRAM und TRIF. Durch diesen Komplex wird sowohl über IRF3-Aktivierung die Typ I IFN-Antwort induziert als auch über NF- $\kappa$ B und MAP-Kinase-Aktivierung die zweite Induktionsphase der pro-inflammatorischen Zytokine (Kagan, Su et al. 2008).

MyD88 enthält zusätzlich zur TIR-Domäne eine sogenannte death domain (DD), die die Interaktion mit der DD der Serin/Threonin-Kinase IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4) vermittelt. Das „Clustering“ von IRAK4 im Rezeptorkomplex führt wahrscheinlich zur Autophosphorylierung und damit zur Aktivierung der Kinase. Die Kinase-Aktivität von IRAK4 ist notwendig für die Bindung der IRAK4-DD an weitere IRAK-Kinasen (IRAK1 und IRAK2). MyD88 und die IRAKs lagern sich zu einem größeren Komplex zusammen, der unter anderem E2-Ubiquitin-Ligasen und E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme aus der TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor)-Familie enthält. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von Polyubiquitin-Ketten (Newton and Dixit 2012). Der IRAKs/TRAF6 Komplex interagiert mit einem weiteren Komplex, bestehend aus TAK1 (TGF-beta activated kinase 1), TAB1 (TAK binding protein 1) und TAB2. Diese Interaktion löst die Phosphorylierung und Aktivierung von TAK1 aus und führt anschließend zu einer Aktivierung von IKKs (I $\kappa$ B (Inhibitor of  $\kappa$ B)-Kinasen). Ein Inhibitormolekül, das I $\kappa$ B, hält den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im Zytoplasma zurück. Die Phosphorylierung dieses Faktors durch IKKs führt zu dessen Degradierung und der Freisetzung von NF- $\kappa$ B. Die Aktivierung von TAK1, selbst eine MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), resultiert darüber hinaus in der Aktivierung von JNK (c-Jun N-terminal kinase) und anderen MAP-Kinasen. Die Mechanismen der TAK1- und IKK-Aktivierung sind bisher aber noch nicht vollständig aufgeklärt (Qian and Cao 2012; Smale 2012).

TLR3 und TLR4 können nach Bindung ihres korrespondierenden PAMPs durch MyD88-unabhängige Signalgebung neben der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen auch Typ I IFN induzieren. Dabei kommt es zu einer TRIF-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B, MAP-

Kinasen und IRF3. TRIF assoziiert mit TRAF6, TRAF3 und RIP1 (receptor interacting protein-1). TRAF6 und RIP1 führen zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung via TAK1, wohingegen TRAF3 zwei IKK-verwandte Kinasen aktiviert, die als TBK1 (TANK (TRAF family-member-associated NF- $\kappa$ B activator) binding kinase 1) und als IKKi (inducible I $\kappa$ B kinase) bezeichnet werden. Diese beiden Kinasen sind bei der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 involviert, welche dann die Expression von Typ I IFN und IFN-induzierbaren Proteinen steuern.

Über die MyD88-abhängigen und -unabhängigen Signalwege hinaus wurde nach TLR-Stimulation ein Einfluss des PI3K (Phosphoinositol3 kinase)-Signalwegs auf die Induktion einiger Zytokine gezeigt (Newton and Dixit 2012).

Während in Makrophagen und cDCs die MyD88-abhängige Signalgebung die Expression proinflammatorischer Zytokine steuert und zur zusätzlichen Expression von Typ I IFN der MyD88-unabhängige bzw. TRIF-abhängige Signalweg aktiviert wird, vermittelt in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) MyD88 als Adaptormolekül sowohl die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen als auch von Typ I IFN. In pDCs, die als klassische Typ I IFN-Produzenten bekannt sind, führt die Stimulation mit TLR7- und TLR9-Liganden MyD88-abhängig zur Rekrutierung verschiedener Signalproteine, wie IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1 und IKKa, die zur Phosphorylierung von IRF7 und der Transkription von Typ I IFN führt. Aber auch andere Proteine, wie PI3K, mTOR und p70S6K spielen eine entscheidende Rolle bei der IRF7-Aktivierung in pDCs (Newton and Dixit 2012).

Sowohl die MyD88- als auch die TRIF-abhängigen Signalwege werden auf mehreren Ebenen durch ein Netzwerk an regulatorischen Elementen in Stärke und Dauer der Signalgebung entsprechend angepasst (Qian and Cao 2012; Volz, Kaesler et al. 2012).

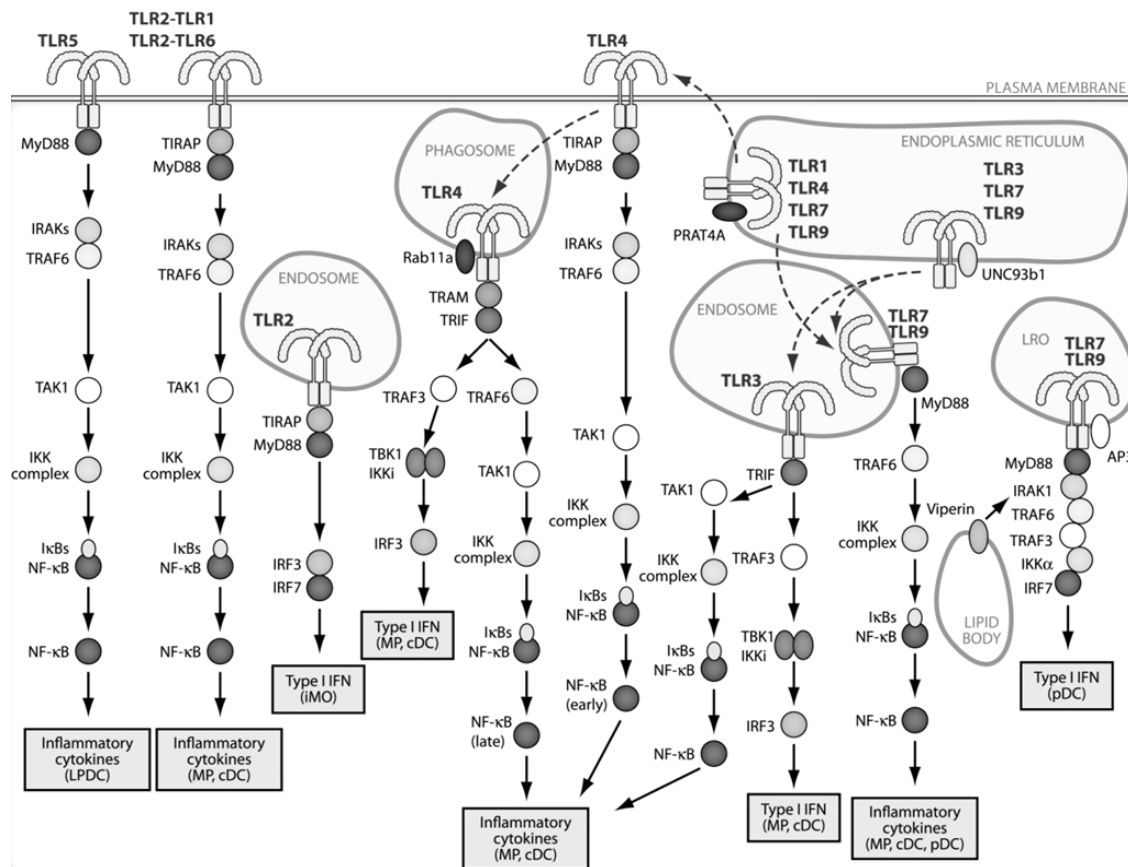


Abb. 1.3 Übersicht über TRIF-unabhängige und TRIF-abhängige Signalwege (Kawai and Akira 2011)

### 1.2.3. Zytosolische PRRs

Neben den membrangebundenen TLRs gibt es auch ein zytosolisches Erkennungssystem für intrazelluläre PAMPs (Kawai and Akira 2009). Zu diesem Erkennungssystem gehören die übergeordneten signalgebenden Familien der NLRs (nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing receptors), RLRs (retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors) und ALRs (Absent-in-melanoma-like receptors) (Hansen, Vojtech et al. 2011). Darüber hinaus finden sich im Zytoplasma Rezeptorsysteme, die intrazelluläre Pathogene erkennen und deren Replikation blockieren (PKR, OAS) (Janeway and Medzhitov 2002; Murphy 2011).

Die RLR-Familie besteht aus drei Mitgliedern: RIG-I (retinoic acid inducible gene I), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) und LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2). Diese Rezeptoren erkennen RNA von RNA-Viren im Zytoplasma infizierter Zellen und induzieren pro-inflammatorische Zytokine und Typ I IFN. Pro-inflammatorische Zytokine initiieren und koordinieren primär verschiedene angeborene Immunmechanismen durch die Rekrutierung von Immunzellen, wie z.B. Makrophagen und DCs. Typ I IFN, zu denen einige strukturell ähnliche IFN $\alpha$ -Proteine sowie ein einziges IFN $\beta$ -Protein gehören, induzieren autokrin

und/oder parakrin die Transkription verschiedener IFN-stimulierter Gene (ISGs) und führen damit zu einem antiviralen Status in diesen Zellen.

Lange glaubte man virale ssRNA mit einem 5`Triphosphat wäre die einzige essentielle Komponente für die Virus-Erkennung durch RIG-I. Es konnte aber gezeigt werden, dass während der enzymatischen Synthese von RNA als Sekundärstruktur eine dsRNA gebildet wird, deren Erkennung unabhängig von einem 5`Tri- oder Monophosphat ist. Auch MDA5 erkennt dsRNA, so auch das dsRNA-Analogon PolyI:C, wenn es in die Zelle transferiert wird. Enzymatisch verkürztes PolyI:C wird dabei präferentiell durch RIG-I als durch MDA5 erkannt. Dies deutet daraufhin, dass RIG-I und MDA5 verschieden lange dsRNAs erkennen. Das dritte Mitglied der RLR-Familie, LGP2, wurde als Negativregulator der RIG-I- und MDA5-vermittelten Signalgebung beschrieben. *In vivo* Studien zeigten aber eine positiv regulatorische Funktion von LGP2, möglicherweise indem LGP2 die Zugänglichkeit der viralen RNA für RIG-I und MDA5 erhöht. Die Erkennung von viraler RNA durch RIG-I und MDA5 zusammen mit LGP2 führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung innerhalb dieser Rezeptoren, die die CARD-Domänen von RIG-I und MDA5 exponieren. Diese CARD-Domänen interagieren über eine weitere CARD-Domäne im Adapterprotein IPS1 (IFN-beta promoter stimulator 1, auch bekannt als MAVS, Cardif und VISA) mit diesem. IPS1 lokalisiert dann zu Mitochondrien, wo über IRF3 durch Induktion von ISGs und Typ I IFN verzögerte Antworten ausgelöst werden. Lokalisiert IPS1 zu Peroxisomen, kommt es über IRF1 durch Induktion von ISGs zu frühen Antworten. Darüber hinaus aktiviert IPS1 nach Rekrutierung an RIG-I und MDA5 die Kinasen TBK1 und IKKi (inducible I $\kappa$ B kinase), welche über TRAF3 die IFN-regulierenden Faktoren IRF3 und IRF7 und die anschließende Transkription der Typ I IFN aktivieren. IPS1 ist aber auch in der Lage NF- $\kappa$ B über die Rekrutierung eines multimeren Komplexes aus TRADD (TNFRSF1A-associated via death domain), FADD (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain), Caspase8 und Caspase10 zu aktivieren. Auch die RLR-Signalgebung wird durch verschiedene Elemente reguliert, so sind für IPS1 Negativ- und für RIG-I Positivregulatoren beschrieben.

NLRs bilden eine Familie von 23 Mitgliedern im Menschen und etwa 34 Mitgliedern in der Maus, die ein breites Spektrum von Liganden erkennen. Diese Rezeptoren bestehen aus verschiedenen Domänen: einer C-terminalen Domäne, bestehend aus einigen LRRs (leucine rich repeats), die bei der Erkennung mikrobieller PAMPs oder endogener Moleküle beteiligt ist; einer N-terminalen Domäne, bestehend aus einer DED (death effector domain), einer PYD (Pyrin domain), einer CARD, BIRs (baculovirus inhibitory repeats) und einer azidischen Domäne, die die Interaktion mit weiteren Signalmolekülen ermöglicht und schließlich einer intermediären Domäne, bestehend aus NACHT-Domänen (domains present in NAIP, CIITA, HET-E and TP1), die für die Liganden-induzierte, ATP-abhängige Oligomerisierung der Rezeptoren und die Bildung eines aktiven Rezeptorkomplexes für die Aktivierung der Signalgebung not-



wendig sind. Die Funktionen einiger dieser Mitglieder sind gut charakterisiert. Dazu gehören NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1) und NOD2. NOD1 und NOD2 erkennen verschiedene strukturelle Motive von Peptidoglykanen, die als Hauptkomponenten in bakteriellen Zellwänden vorkommen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt über die Induktion von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen v.a. zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus kommt es zur Bildung eines Multiprotein-Komplexes, dem Inflammasom. Das Inflammasom induziert die proteolytische Prozessierung verschiedener Caspasen, was in der Prozessierung und Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\beta$  und IL18 resultiert oder aber apoptotische Prozesse induziert. Die Aktivierung anderer NLRs, wie der NALP (NACHT leucine rich repeat and pyrin domain containing)-Unterfamilie, führt hauptsächlich zur Bildung des Inflammasom-Komplexes. Das kürzlich charakterisierte NRLC5 (NLR family, CARD domain containing 5) zeigt innerhalb der NLR-Familie eine neue Funktion auf, indem es antivirale Immunantworten durch die Regulation pro-inflammatorischer Zytokine und Typ I IFN sowie durch die transkriptionelle Regulation von MHCI-Molekülen beeinflusst (Akira 2009; Kumar, Kawai et al. 2011).

Die kürzlich beschriebene Rezeptorfamilie der ALRs, dessen Gründungsmitglied durch AIM2 (absent in melanoma 2) dargestellt wird, beschreibt eine kleine Gen-Familie, die im Menschen aus vier und in der Maus aus sechs Mitgliedern besteht. Alle weisen eine charakteristische IFI200 (interferon inducible)-Domäne auf. Drei der humanen ALR-Mitglieder, MNDA (myeloid cell nuclear differentiation antigen), PYHIN1 (pyrin and HIN domain family member 1) und AIM2 enthalten eine N-terminale PYD gekoppelt an eine IFI200-Domäne, während das vierte Mitglied IFI16 (gamma-interferon-inducible protein 16) hier zwei Tandem IFI200-Domänen aufweist. Nur für AIM2 und IFI16 ist eine Funktion als PRRs direkt impliziert worden. Die PYD von AIM2 kann über ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), einem Inflammasom-Adaptermolekül, die Aktivierung des Inflammasoms induzieren. Die IFI200-Domäne von AIM2 kann aber auch mit bakterieller und viraler dsDNA interagieren und neben der Inflammasom-Aktivierung auch die Typ I IFN-Produktion induzieren (Hansen, Vojtech et al. 2011).

Ein zytoplasmatisches Rezeptorsystem für eine DNA-vermittelte Typ I IFN-Produktion war lange Zeit unbekannt. Die Entdeckung von DAI (DNA-dependent activator of IRFs) als DNA-Sensor war ein erster Hinweis auf solche Rezeptorsysteme. Knockout-Studien zeigten aber, dass es andere Systeme dieser Art geben muss. Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt das Enzym cGAS (cyclicly guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase) als essentiellen DNA-Sensor, der zur Bildung des „second messenger“ Moleküls cGAMP führt und damit eine Typ I IFN-Antwort einleitet (Sun, Wu et al. 2013; Wu, Sun et al. 2013).

Zu den Rezeptorsystemen die intrazelluläre Pathogene erkennen und deren Replikation blockieren, gehören die PKR (double stranded RNA-dependent protein kinase) und die OAS (2'-5'-oligoadenylate synthetase). Die PKR und die OAS sind wichtige Enzymsysteme bei der IFN-induzierten, antiviralen Immunantwort und hemmen die Translation viraler Proteine. Die IFN-induzierte Proteinkinase PKR inaktiviert durch Phosphorylierung den für die zelluläre Proteinsynthese erforderlichen Initiationsfaktor eIF-2 $\alpha$ . Die PKR ist nur in virusinfizierten Zellen aktiv, da sie für ihre Funktionsfähigkeit auf die Aktivierung durch virale dsRNA angewiesen ist. Die OAS hingegen katalysiert die Veresterung von bis zu fünf Adenosin-Triphosphaten (ATP) zu 2'-5'-gebundenen Oligoadenylaten. Diese binden an eine im Zytoplasma latent vorkommende Ribonuklease, die RNase L, die virale und zelluläre RNA abbaut. Auch die katalytische Aktivität der OAS muss zunächst durch virale dsRNA aktiviert werden (Janeway and Medzhitov 2002).

### 1.3. Signalgebung in der Typ I Interferon-Antwort

Typ I Interferone (IFN) wurden erstmals vor über 50 Jahren als Faktoren beschrieben, die das Phänomen der viralen Interferenz vermitteln, bei der durch Infektion mit einem Virus die Resistenz gegenüber einem anderen Virus induziert werden kann (Isaacs and Lindenmann 1957). Die Typ I IFN gehören zu den Klasse II  $\alpha$  helikalen Zytokinen und bilden eine Multigen-Familie, bestehend aus IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\omega$ , und  $\delta$  (Hertzog 2012). IFN $\alpha$ , das durch eine Reihe verschiedener, teilweise homologer Gene repräsentiert wird, und IFN $\beta$ , das auf ein einziges Gen zurückzuführen ist, gehören dabei zu den am besten charakterisierten und meist verbreiteten IFN. Andere IFN-Subtypen sind weniger gut charakterisiert, Gewebe-spezifischer und kommen nicht in allen Spezies vor. Alle Typ I IFN-Subtypen besetzen einen ubiquitär exprimierten, heterodimeren Rezeptor, der aus zwei Ketten, IFNAR1 und IFNAR2, besteht. Dieser vermittelt die Signalgebung über zwei Kinasen der Janus-Familie, Tyk2 (tyrosine kinase 2) und Jak1 (Janus kinase 1), wodurch STAT 1 (signal transducer and activator of transcription protein 1) zu Rezeptor gebundenem STAT2 rekrutiert wird. Durch die Bildung des STAT1-STAT2 heterodimeren Komplexes kommt es zur Dissoziation dieses Komplexes und zur Translokation in den Nukleus. Im Nukleus assoziiert das STAT1-STAT2-Heterodimer mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, IRF9 (interferon regulatory factor 9). Dieser Komplex wird dann als ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) bezeichnet. ISGF3 bindet an bestimmte Sequenzelemente, den sogenannten ISRE (IFN-stimulated response elements) und aktiviert die Transkription IFN-induzierbarer Gene (ISGs, IFN-stimulated genes). Die IFNAR-vermittelte Signalgebung kann auch zur Aktivierung und nukleären Translokation eines STAT1-Homodimers führen. STAT1-Homodimere binden IFN $\gamma$ -aktivierte Elemente im Promotorbereich IFN $\gamma$ -induzierter Gene (Decker, Muller et al. 2005).

Zur Induktion der Typ I IFN sind fünf IRFs (IRF1, 3, 5, 7 und 8) als Positivregulatoren beschrieben worden, wobei IRF3 und IRF7 essentielle Schlüsselregulatoren darstellen (Tamura, Yanai et al. 2008). IRF3 ist konstitutiv exprimiert und verbleibt in latenter Form im Zytosol. Nach Stimulation wird IRF3 an Serin und Threonin phosphoryliert, woraufhin es zur Dimerisierung und schließlich zur nukleären Translokation kommt. Auf Grundlage der Kristallstruktur von IRF3 sind verschiedene Modelle zur IRF3-Aktivierung und -Dimerisierung beschrieben worden. Unabhängig vom genauen Mechanismus kann IRF3 Homodimere oder auch Heterodimere mit IRF7 bilden. Das dimerisierte IRF3 gelangt in den Nukleus und formt dort einen Komplex mit den Koaktivatoren CBP (CREB (cAMP response element-binding protein)-binding protein) und/oder p300. Dieser Komplex bindet an die Ziel-DNA-Sequenzen der *Typ I IFN*-Gene und einiger Chemokine (z.B. CXCL10) und induziert deren Transkription. Im Gegensatz zu IRF3 wird IRF7 nur in geringen Mengen exprimiert und in den meisten Zellen durch Typ I IFN-vermittelte Signalgebung über die beschriebene INFA-IRF3-Achse stark induziert. Ähnlich wie IRF3, verbleibt IRF7 zunächst im Zytosol und wird bei viraler Infektion an Serin im C-terminalen Bereich phosphoryliert. Dimerisiertes IRF7 kann sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer mit IRF3 vorliegen, wobei die verschiedenen Dimere differentiell verschiedene Mitglieder der *Typ I IFN*-Genfamilie induzieren. IRF3 ist wirksamer in der Aktivierung des *IFN $\beta$* -Gens gegenüber den *IFN $\alpha$* -Genen, wohingegen IRF7 effizient sowohl die Transkription der *IFN $\alpha$* -Gene als auch des *IFN $\beta$* -Gens steuert. Dabei stellt die kurze Halbwertszeit (0.5-1h) von IRF7 einen wichtigen Regulationsprozess zur Limitierung der Typ I IFN-Induktion dar (Honda, Takaoka et al. 2006).

Die IRF3- und IRF7-Aktivierung und damit die Typ I IFN-Induktion wird von mehreren Rezeptorsystemen gesteuert, wobei nahezu alle Zelltypen Typ I IFN produzieren können. In den meisten Zelltypen ist der vorherrschende Signalweg zur Typ I IFN-Induktion durch Aktivierung zytosolischer Rezeptoren beschrieben, die virale oder andere xenogene sowie autologe Nukleinsäuren, wie dsRNA erkennen. Dabei sind vor allem RIG-I (retinoic acid inducible gene I) und MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5), als zytoplasmatische Rezeptoren, verantwortlich für Typ I IFN-Induktion. Diese Rezeptoren vermitteln, wie beschrieben (1.2.3), die Signalgebung über IPS1 und die Kinasen TBK1 und IKKi, was zur Aktivierung von IRF3 und Transkription der Typ I IFN führt. Für den zytosolischen DNA-Sensor DAI (DNA-dependent activator of IRFs) wurde ebenfalls ein TBK1- und IRF3-vermittelter Mechanismus zur Typ I IFN-Induktion gezeigt (Kawai and Akira 2010). Jedoch ist DAI nicht alleine für die Erkennung zytosolischer DNA verantwortlich. Mittlerweile wurden weitere Moleküle beschrieben die überwiegend STING (Stimulator of interferon genes)-abhängig über TBK1 und IFR3 die Typ I IFN-Antwort induzieren (Cavlar, Ablasser et al. 2012). In diesem Zusammenhang wurde kürzlich das Enzym cGAS als essentieller DNA-Sensor beschrieben, welcher zur Bildung des „second

messenger“-Moleküls cGAMP führt und über die STING-TBK1-IRF3-Achse eine Typ I IFN-Antwort einleitet (Sun, Wu et al. 2013; Wu, Sun et al. 2013).

IRF3 und IRF7 spielen essentielle, aber unterschiedliche Rollen in der Typ I IFN-Induktion, wobei sie gemeinsam die transkriptionelle Effizienz und Diversität der *IFN $\alpha$ / $\beta$* -Gene in der antiviralen Antwort gewährleisten. Dabei operieren sie in einer positiven Rückkopplungsschleife, die sich in zwei Phasen einteilen lässt. In der frühen Phase, wird konstitutiv exprimiertes IRF3 aktiviert und führt zur Induktion von IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ . Die Expression von IFN $\alpha$  ist in der frühen, IRF3-vermittelten Phase auf die Induktion von humanem IFN $\alpha$ 1 bzw. murinem IFN $\alpha$ 4 limitiert. Das initial produzierte IFN $\beta$  induziert die IRF7-Expression durch die Aktivierung des ISGF3-Komplexes. In der späten Phase kooperieren IRF3 und IRF7 miteinander, um die *IFN $\alpha$ / $\beta$* -Geninduktion zu amplifizieren und ein normales Induktionsprofil aller IFN $\alpha$ -Subtypen zu gewährleisten (Servant, Tenover et al. 2002). Der IFN $\beta$ -Promotor ist dabei bezüglich seiner regulatorischen Domänen sehr gut untersucht. Er weist vier positiv regulatorische Domänen auf (PRDI-V), die durch überlappende Transkriptionsfaktor-Komplexe besetzt werden. IRF3 (in der frühen Phase) und IRF7 (in der späten Phase) binden an PRDI und III. Ein weiterer Komplex, der ATF2 (activating transcription factor 2)/cJun-Komplex, auch als AP1 (activator protein 1) bezeichnet, bindet an PRDIV. PRDII wird schließlich vom p50/RelA NF- $\kappa$ B-Komplex gebunden. Zusammen vermitteln sie als großer multimerer Komplex, auch als Enhanceosome bezeichnet, die IFN $\beta$ -Induktion (Levy, Marie et al. 2011).

In einigen Zelltypen (z.B. Makrophagen und DCs) wird die Typ I IFN-Antwort nach Ligation der Transmembran-Rezeptoren TLR3 und TLR4 durch dsRNA bzw. LPS induziert. TLR3 und TLR4 vermitteln die Signalgebung über das Adaptermolekül TRIF, welches über TRAF3 mit TBK1 assoziiert und zur Aktivierung von IRF3 führt (Kawai and Akira 2010). Dabei ist die Typ I IFN-Induktion bei TLR3-Ligation sowohl IRF3- als auch IRF7-abhängig - bei TLR4-Ligation aber hauptsächlich IRF3-abhängig (Tamura, Yanai et al. 2008).

TLR4 ist der einzige Rezeptor, der durch Erkennung von nicht-Nukleinsäure-Liganden, wie LPS, neben bestimmten Chemokinen (z.B. CXCL10) auch Typ I IFN (IFN $\beta$ , aber nicht IFN $\alpha$ ) induziert. Die vorrangige Induktion des *IFN $\beta$* -Gens gegenüber den *IFN $\alpha$* -Genen ist dadurch begründet, dass aktiviertes TBK1 nach TLR4-Ligation hauptsächlich die Phosphorylierung von Serin in IRF3, eher als in IRF7, vermittelt. Die IFN $\beta$ -Induktion und die Induktion bestimmter Chemokine durch TLR4-Ligation ist somit ausschließlich über IRF3-Homodimere gesteuert. Bisher ist der Mechanismus noch nicht bekannt, der zu dieser präferentiellen Aktivierung von IRF3 führt (Honda, Takaoka et al. 2006).

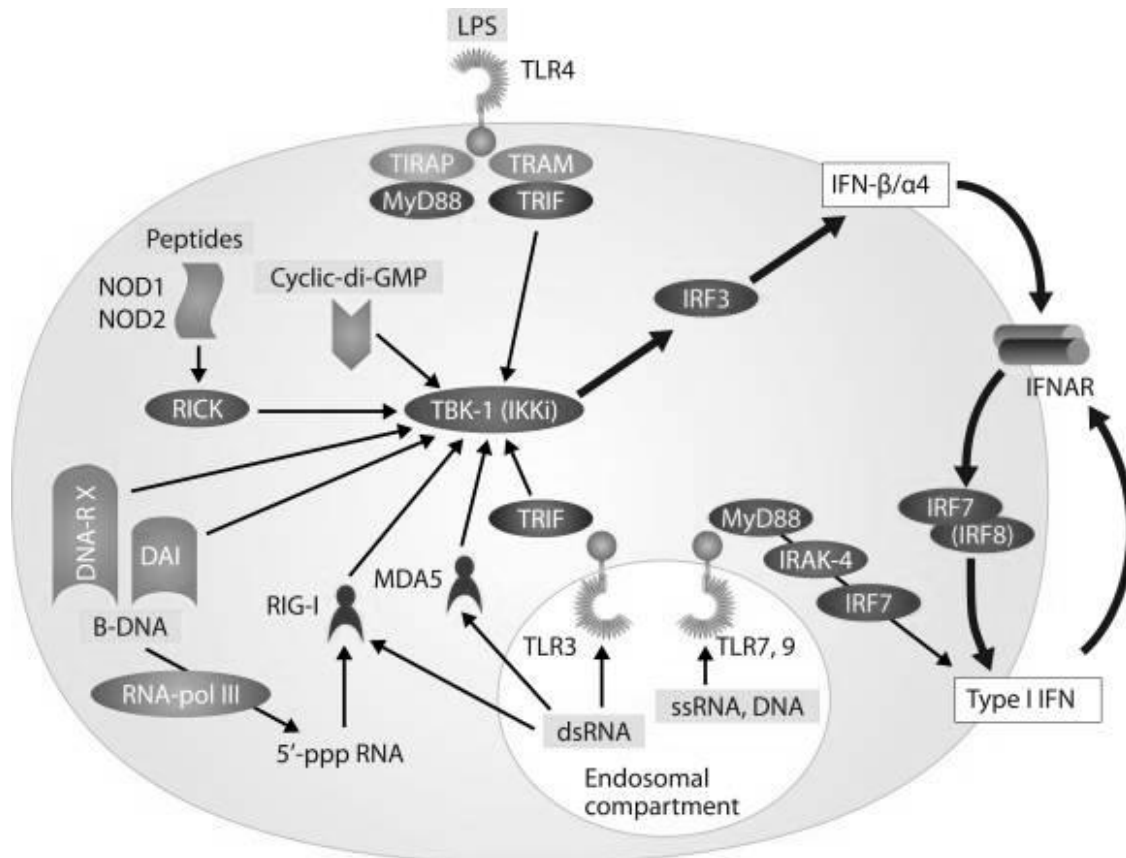
Ein neuartiger Mechanismus zur Typ I IFN-Induktion durch zytoplasmatische Liganden wurde durch die Ligation der NOD1- und NOD2-Rezeptoren beschrieben. NOD-Rezeptoren erkennen Bestandteile bakterieller Zellwände. NODs vermitteln eine Signalkaskade über die Kinase RIP2

(receptor interacting protein 2, auch RICK genannt) und aktivieren NF- $\kappa$ B zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren, die dann zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine führen. Wie gezeigt wurde, kann RIP2 aber auch mit TRAF3 und IPS1 interagieren und somit die Aktivierung von TBK1 und IKKi, die Phosphorylierung von IRF5 oder IRF7 sowie die Transkription des *IFN $\beta$* -Gens induzieren (Pandey, Yang et al. 2009; Watanabe, Asano et al. 2010).

Obwohl die meisten Zelltypen in der Lage sind Typ I IFN zu produzieren, stellen pDCs einen auf die Typ I IFN-Produktion spezialisierten Zelltyp dar. Sie exprimieren präferentiell die endosomalen Rezeptoren TLR7 und TLR9, die durch ssRNA- bzw. DNA-Viren aktiviert werden und die Signaltransduktion über das Adapterprotein MyD88 vermitteln (Colonna, Trinchieri et al. 2004). Diese Rezeptoren sind nur in pDCs effiziente Typ I IFN-Induktoren und führen IRF7-abhängig zur Typ I IFN-Produktion (Tamura, Yanai et al. 2008). In pDCs ist IRF7 (und IRF8) konstitutiv exprimiert, wobei der MyD88-IRF7-Komplex bei TLR-Ligation einer zeitlich-räumlichen Regulation unterliegt. Diese wird durch die endosomale Retention der Liganden dargestellt, wodurch eine robuste Plattform für die Interaktion von MyD88 und IRF7 geboten wird (Honda, Takaoka et al. 2006).

Die am besten beschriebene Wirkung von Typ I IFN ist die Induktion eines antiviralen Status zur Restriktion und Beseitigung einer viralen Infektion. Typ I IFN sind aber auch mit vielen anderen pathologischen Prozessen assoziiert, die bisher weniger gut beschrieben sind.

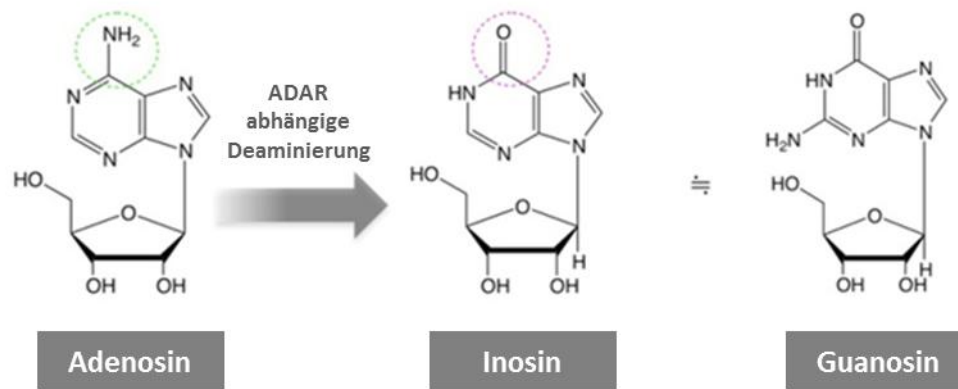
So werden auch oft während einer bakteriellen Infektion Typ I IFN produziert. Jedoch sind die Effekte komplex und begünstigen nicht immer die Immunantwort des Wirtes auf die Infektion, während sie in manchen Fällen aber auch, ähnlich wie bei viralen Infektionen, eine Rolle bei der Resistenz gegenüber der bakteriellen Infektion spielen. Typ I IFN zeigen darüber hinaus komplexe und oft gegensätzliche Effekte bei der Kontrolle der Suszeptibilität und Letalität in verschiedenen Sepsis- oder Endotoxin-Schock-Modellen. Häufig wird eine Typ I IFN-Signatur mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen viralen oder anderen Infektionen und autoimmunologischen Prozessen ist schon seit Langem bekannt, aber die genauen Mechanismen und die mögliche Rolle von Typ I IFN in der Pathogenese bleiben schwierig zu bestimmen. Schließlich machen einige der biologischen Funktionen der Typ I IFN, einschließlich ihrer Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität sowie ihre anti-angiogenetischen und pro-apoptotischen Effekte, sie zu einem naheliegenden Kandidaten für eine anti-Krebs-Therapie (Trinchieri 2010).



**Abb. 1.4 Schematische Darstellung des IRF3 und IRF7-vermittelten biphasischen Mechanismus zur Induktion der *IFN $\alpha$ / $\beta$ -Gene*** (Trinchieri 2010). Die Typ I IFN-Produktion kann durch die Erkennung von unterschiedlichen PAMPs über verschiedene PRRs induziert werden. Die Ligandierung der entsprechenden PRRs führt zur Aktivierung von IRF3 und in der frühen Phase zur Induktion von IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 4. Die Produktion der Typ I IFN wird durch eine positive Rückkopplungsschleife amplifiziert, wobei das initial produzierte IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 4 die Transkription von IRF7 (in pDCs auch IRF8) induzieren. IRF7 gemeinsam mit IRF3 gewährleisten in der späten Phase das volle Expressionsprofil der Typ I IFN sowie deren Amplifikation. In pDCs ist IRF7 (und IRF8) konstitutiv exprimiert und vermittelt MyD88-abhängig effizient die Typ I IFN-Produktion.

#### 1.4. Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)

ADAR-Enzyme katalysieren die hydrolytische Deaminierungsreaktion am C6-Atom von Adenosin zu Inosin in partiell doppelsträngiger RNA (dsRNA) und werden daher als „RNA-abhängige Adenosin-Deaminasen“ bezeichnet. Dieser Prozess ist unter dem Begriff A→I-RNA-Editierung bekannt und stellt in höheren Eukaryonten die häufigste Form der RNA-Editierung dar (neben anderen wie z.B. C→U-Editierung) (Bass 2002). RNA-Editierungen führen zu posttranskriptionalen Modifikationen, die von der genomischen Sequenz abweichende RNAs generieren.

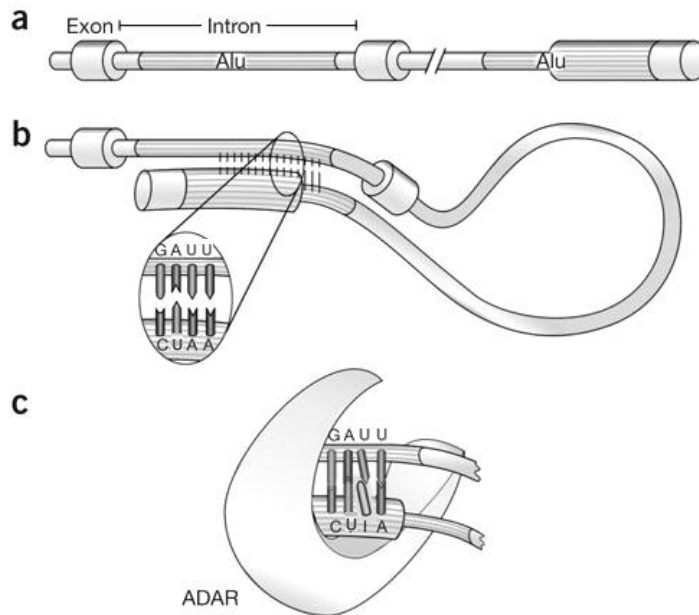


**Abb. 1.5 Die Deaminierungsreaktion von Adenosin zu Inosin durch ADARs** (Akiyama 2013). Inosin wird durch die Translationsmaschinerie als Guanosin gelesen. Dies kann in kodierenden Bereichen einen Aminosäure-Austausch hervorrufen.

Erstmals wurden ADARs in *Xenopus laevis*-Eiern (Krallenfrosch) im Zusammenhang mit ihrer dsRNA-aufwindenden Aktivität beschrieben (Bass and Weintraub 1987; Rebagliati and Melton 1987). Ein Prozess, der später durch die Umwandlung der stabilen A:U-Basenpaare in die deutlich weniger stabilen I:U-Basenpaare erklärt werden konnte (Bass and Weintraub 1988; Wagner, Smith et al. 1989). Eine stabile Basenpaarung geht Inosin mit Cytosin anstatt mit Uracil ein.

Sowohl intermolekulare als auch intramolekulare dsRNA-Bereiche von mindestens 20 bp (zwei Umdrehungen der dsRNA Helix) können als Substrate für ADAR dienen (Nishikura, Yoo et al. 1991). Dabei reicht die Spezifität von hoch selektiv zu nicht-selektiv, abhängig von der Duplex-Struktur der RNA (Samuel 2011). Nicht selektiv werden viele Adenosine einer langen, komplett basengepaarten dsRNA (über 100 bp) editiert, wobei kurze dsRNAs (~20-30 bp) oder lange, partiell doppelsträngige RNA-Moleküle, die durch Basenfehlpaarungen und Schleifen aufgelockert sind, selektiv editiert werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Sekundärstruktur in den ADAR-Substraten die Selektivität der Editierungsposition bestimmt (Lehmann and Bass 1999). Aber auch die Tertiärstruktur scheint eine entscheidende Rolle zu spielen (Enstero, Daniel et al. 2009). Durch genomweite „Screening“-Strategien konnte gezeigt werden, dass lange, partiell doppelsträngige RNAs, die sich durch Rückfaltung („foldback“) invertierter Wiederholungseinheiten bilden, von der A→I-Editierung am häufigsten betroffen sind. Die invertierten Wiederholungseinheiten werden dabei durch die Alu-Motive der Introns und die LINEs (long interspersed elements) der UTRs (untranslated region) in der pre-mRNA gebildet (Athanasidis, Rich et al. 2004; Blow, Futreal et al. 2004; Kim, Kim et al. 2004; Levanon, Eisenberg et al. 2004). Außerdem werden einige Positionen in einer Sequenz vorzugsweise nur von bestimmten Mitgliedern der ADAR-Familie editiert (Cho, Yang et al. 2003; Stefl, Xu et al. 2006).

*In vitro* Studien zeigen, dass die Homodimerisierung der ADAR-Proteine für deren Enzymaktivität notwendig ist (Cho, Yang et al. 2003; Stefl, Xu et al. 2006). Die Bedeutung dieser Dimerbildung konnte auch *in vivo* bestätigt werden (Chilibeck, Wu et al. 2006). Ob die Homodimerisierung RNA-abhängig stattfindet ist noch nicht endgültig klar. *In vitro* Studien mit ADAR-Mutanten, denen die Fähigkeit fehlt dsRNA zu binden, zeigten aber RNA-unabhängig die Bildung von ADAR-Dimeren. Somit ist zu vermuten, dass die Dimerkomplexe sich durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Monomeren bilden (Valente and Nishikura 2007).



**Abb. 1.6 ADAR-vermittelte A→I-Editierung** (Levanon, Eisenberg et al. 2004). **(a)** Pre-mRNA transkribiert von entsprechender DNA-Sequenz mit zwei Alu-Wiederholungseinheiten in gegensätzlicher Orientierung, wobei eine mit einem Exonbereich überlappt. **(b)** Die zwei invertierten Alu-Wiederholungseinheiten formen eine partiell doppelsträngige RNA-Struktur. **(c)** Die Enzyme der ADAR-Familie editieren manche Adenosine in der dsRNA-Struktur zu Inosinen.

Die bisherigen Daten assoziieren eine ADAR-Aktivität mit verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Funktionalität einiger Rezeptoren innerhalb des zentralen Nervensystems (Higuchi, Single et al. 1993; Burns, Chu et al. 1997), der Tumorentwicklung (Beghini, Ripamonti et al. 2000; Takahashi, Yoshimoto et al. 2006; Paz, Levanon et al. 2007; Jiang, Crews et al. 2013), der RNA-Interferenz (RNAi) (Scadden and Smith 2001; Yang, Wang et al. 2005; Blow, Grocock et al. 2006; Yang, Chendrimada et al. 2006; Kawahara, Zinshteyn et al. 2007; Ota, Sakurai et al. 2013), der Apoptose sowie mit Mechanismen der angeborenen Immunität (Hartner, Walkley et al. 2009; George, Gan et al. 2011; Samuel 2011). Außerdem wurde vermutet, dass die A→I-Editierung eine Rolle bei der somatischen Hypermutation in B-Zellen spielt (Steele 2009).

Findet die Editierung in Protein-kodierenden Bereichen (Exons) statt, so kann es zur Codon-Veränderung kommen, da die Translationsmaschinerie das Inosin als Guanosin übersetzt. Dies kann den Austausch der eigentlich kodierten Aminosäure bewirken mit möglicher Auswirkung auf die Protein-Funktion. Bisher wurde nur eine limitierte Anzahl von Gentranskripten identifiziert, die innerhalb der kodierenden Sequenzen der A→I-Editierung unterliegen (Nishikura 2010). Neuere Studien decken mit Hilfe fortschrittlicher Sequenzierungsmethoden aber im-



mer mehr Editierungspositionen in Exonbereichen auf (Li, Levanon et al. 2009; Bahn, Lee et al. 2011; Eggington, Greene et al. 2011). Zu den gut untersuchten mRNA-Transkripten, die Funktions-verändernde Editierungspositionen in Protein-kodierenden Bereichen aufweisen, gehören in Säugetieren die eines Glutamat-Rezeptors (GluR) (Higuchi, Single et al. 1993), eines Serotonin-Rezeptors (5-HT<sub>2c</sub>R) (Burns, Chu et al. 1997), eines Kalium-Kanals (Kv1.1) (Hoopengardner, Bhalla et al. 2003) und eines  $\gamma$ -Aminosäurebutter-Rezeptors (GABA<sub>A</sub>) (Rula, Lagrange et al. 2008) sowie eines Natrium-Kanals in *Drosophila melanogaster* (Reenan, Hanrahan et al. 2000). Zusätzlich zu den zellulären Gentranskripten werden auch RNA-Moleküle von bestimmten Viren, wie dem Hepatitis delta Virus, editiert (Polson, Bass et al. 1996). Bedeutendstes Beispiel ist die ADAR2-vermittelte Editierung der Glutamat-Rezeptor-Untereinheit GluR2. Die Editierung bewirkt eine Veränderung der Aminosäuresequenz von Glutamin nach Arginin. Sie macht den Rezeptor undurchlässig für Calcium-Ionen und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Nervenleitfähigkeit im zentralen Nervensystem (Higuchi, Single et al. 1993).

Dennoch ist die Editierung innerhalb kodierender Bereiche ein seltenes Ereignis. Viel häufiger ist die A→I-Editierung in nicht-kodierenden Bereichen. Verschiedene „Screenings“ deckten im humanen Transkriptom mit über 15.000 Positionen in circa 2.000 Gentranskripten ein immenses Repertoire an Editierungspositionen auf (Athanasiadis, Rich et al. 2004; Kim, Kim et al. 2004; Levanon, Eisenberg et al. 2004; Blow, Grocock et al. 2006; Li, Levanon et al. 2009; Bahn, Lee et al. 2011; Eggington, Greene et al. 2011). Wie oben beschrieben, bestehen diese Bereiche vorzugsweise aus invertierten Wiederholungseinheiten. Auch Editierungsereignisse innerhalb dieser Sequenzen können Gen-regulative Folgen haben. Beispielsweise interpretiert die Spleiß-Maschinerie Inosin ebenfalls als Guanosin, was zur Generierung oder auch zur Deletion von Donor- und Akzeptorstellen führen kann (Solomon, Oren et al. 2013). Weiterhin kann durch die Editierung von UTRs die Stabilität, die Degradation, der Kernexport und die Translationseffizienz der mRNA beeinflusst werden. Ebenso gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang von A→I-Editierungsereignissen mit dem „Heterochromatin Silencing“ (Nishikura 2006; Nishikura 2010). Die Editierung innerhalb immunstimulatorischer RNA zeigte sich zudem als inhibitorisch gegenüber dem immunstimulatorischem Potential der RNA (Vitali and Scadden 2010). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die A→I-Editierung auch den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) reguliert. So verhindern die entstehenden I:U-Fehlpaarungen in Doppelstrangbereichen die Generierung von siRNA (short interfering RNA) durch Dicer, einem Schlüsselmolekül der siRNA- und miRNA (micro-RNA)-Prozessierungsmaschinerie, und reduzieren damit die RNAi (Scadden and Smith 2001). Auch miRNA-Vorläufermoleküle unterliegen einer Regulation durch ADAR-Editierungen (Blow, Futreal et al. 2004; Luciano, Mirsky et al. 2004; Yang, Chendrimada et al. 2006; Das and Carmichael 2007). Zusätzlich wurde gezeigt, dass ADAR-Enzyme Editierungs-unabhängige Effekte auf den miRNA/siRNA-Reaktionsweg

haben. Auch katalytisch inaktive ADAR-Proteine können die RNA-Prozessierung modulieren; z.B. unterbindet eine zytoplasmatisch vorliegende ADAR1-Isoform die „Silencing“-Aktivität zytosolischer siRNAs durch deren Bindung (Yang, Wang et al. 2005). Eine kürzlich erschienene Studie brachte weitere wichtige Einblicke in den Editierungs-unabhängigen Mechanismus der miRNA-Prozessierung, indem sie zeigen konnte, dass durch die Bildung eines Heterodimers aus ADAR1 und einem Dicer-Molekül zum einen die Effizienz der Prozessierungsrate erhöht und zum anderen erst die Bildung des RNA-induzierenden „Silencing“-Komplex ermöglicht wird (Ota, Sakurai et al. 2013). Dies deutet an, dass ADAR-Proteine auch über ihre Deaminase-Aktivität hinaus biologische Funktionen ausüben können.

Neben den regulierenden Eigenschaften durch die ADAR-vermittelte Aktivität, wird auch die ADAR-Aktivität selbst reguliert. Es hat sich gezeigt, dass das Maß der RNA-Editierung nicht immer mit den ADAR-Expressionsspiegeln korreliert (Tan, Huang et al. 2009). Dies legt die Präsenz posttranskriptionaler oder posttranslationaler regulatorischer Mechanismen nahe (Orlandi, Barbon et al. 2012). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die subzelluläre Verteilung der ADAR-Proteine und ihre Interaktion mit Inhibitor- und Aktivator-Molekülen deren Aktivität beeinflusst (Lei, Liu et al. 1998; Doe, Relkovic et al. 2009). Dennoch sind die Mechanismen durch die die ADAR-Aktivität reguliert wird noch weitgehend unklar. Phosphorylierungsereignisse scheinen dabei eine Rolle zu spielen, indem durch diese die Interaktion der ADAR-Proteine mit anderen intrazellulären Partnern moduliert und somit die subzelluläre Lokalisation und Stabilität der ADAR-Proteine bestimmt wird (Marcucci, Brindle et al. 2011). Da die Phosphorylierungspositionen in der Nähe der RNA-Bindedomänen lokalisiert wurden, ist es möglich, dass die Phosphorylierung auch die ADAR-Substrat-Erkennung beeinflusst. Neben der Phosphorylierung wurde auch eine SUMOylierung der ADAR-Proteine beschrieben, die möglicherweise eine Rolle bei der Sequestrierung des inaktiven ADAR-Proteins im Nukleolus spielt (Desterro, Keegan et al. 2005). Ein weiterer Regulationsmechanismus liegt in der schon beschriebenen Dimer-Bildung der ADAR-Proteine. Es ist bekannt, dass für die Bildung der katalytischen ADAR-Domäne zwei Deaminase-Domänen desselben ADAR-Familienmitglieds benötigt werden um vollständig aktiv zu sein. Somit ist denkbar, dass die Kombination verschiedener ADAR-Mitglieder an der aktiven Domäne die Reduktion und/oder Modulation der ADAR-Effizienz bewirken kann (Gallo, Keegan et al. 2003; Cenci, Barzotti et al. 2008). Ein besonderer Regulationsmechanismus wird durch die Selbsteditierung des ADAR2-Moleküls beschrieben, durch die das alternative Spleißen einer bestimmten Sequenzkassette reguliert wird und die Expressionsspiegel funktionaler ADAR2-Proteine durch die Abnahme der Translationseffizienz reduziert werden (Tan, Huang et al. 2009).

### 1.4.1. Mitglieder der ADAR-Familie

Alle Mitglieder der ADAR-Familie weisen eine konservierte Struktur auf. ADAR-Proteine selbst finden sich nur in multizellulären Organismen, angefangen bei den Seeanemonen bis hin zum Menschen, kommen aber nicht in Hefen und Pflanzen vor. Phylogenetische sowie biochemische Betrachtungen unterstützen die Hypothese, dass ADARs möglicherweise aus der bakteriellen ADAT-Proteinfamilie, die durch eine Reihe von tRNA-Adenosin-Deaminasen gebildet wird, hervorgegangen sind. Somit lässt sich eine Konservierung der A→I-RNA-Editierung zwischen Prokaryoten und Eukaryoten annehmen (Jin, Zhang et al. 2009).

In Wirbeltieren wurden drei konservierte ADAR-Familienmitglieder identifiziert: ADAR1 (Kim, Garner et al. 1994; Kim, Wang et al. 1994; O'Connell, Krause et al. 1995), ADAR2 (Melcher, Maas et al. 1996; Gerber, O'Connell et al. 1997; Lai, Chen et al. 1997) und ADAR3 (Melcher, Maas et al. 1996; Chen, Cho et al. 2000). Die Mitglieder der ADAR-Familie weisen alle eine gemeinsame modulare Domänenstruktur auf (Abb. 1.7). Am C-terminalen Ende tragen sie eine Deaminase-Domäne. Ein ebenfalls C-terminal gelegenes Kernlokalisierungssignal führt zur Lokalisation der Enzyme im Zellkern. Des Weiteren besitzen sie zwei oder drei Wiederholungsmotive einer dsRNA-Bindedomäne (dsRBD) (Orlandi, Barbon et al. 2012). N-terminal befinden sich bei ADAR1 zusätzlich Z-DNA-Bindedomäne/n (ZBD) ( $Z\alpha$  und  $Z\beta$ ) (Herbert, Alfken et al. 1997) sowie eine Kernexportsequenz, die aber nur in der induzierbaren ADAR1-Isoform zu deren vornehmlich zytoplasmatischen Lokalisation führt (Poulsen, Nilsson et al. 2001). ADAR3 und eine spezielle ADAR2-Isoform (ADAR2R) weisen hier eine Arginin-reiche Sequenz auf. Eine Bindung der Arginin-reichen Region an ssRNA wurde angedeutet, aber die biologische Signifikanz dieser Interaktion ist nicht bekannt (Chen, Cho et al. 2000).



**Abb. 1.7 Humane ADAR-Familienmitglieder** (Akiyama 2013). Alle Mitglieder weisen eine konservierte modulare Domänenstruktur mit einer C-terminalen katalytischen Deaminase-Domäne und zwei bis drei dsRNA-Bindedomänen (dsRBDs) auf. ADAR1, welches in zwei Isoformen gebildet wird, besitzt zusätzlich ein bis zwei N-terminale Z-DNA-Bindedomänen (ZBDs). ADAR3 weist eine N-terminale Arginin-reiche Domäne (R) auf, die kürzlich auch in ADAR2 nachgewiesen werden konnte.

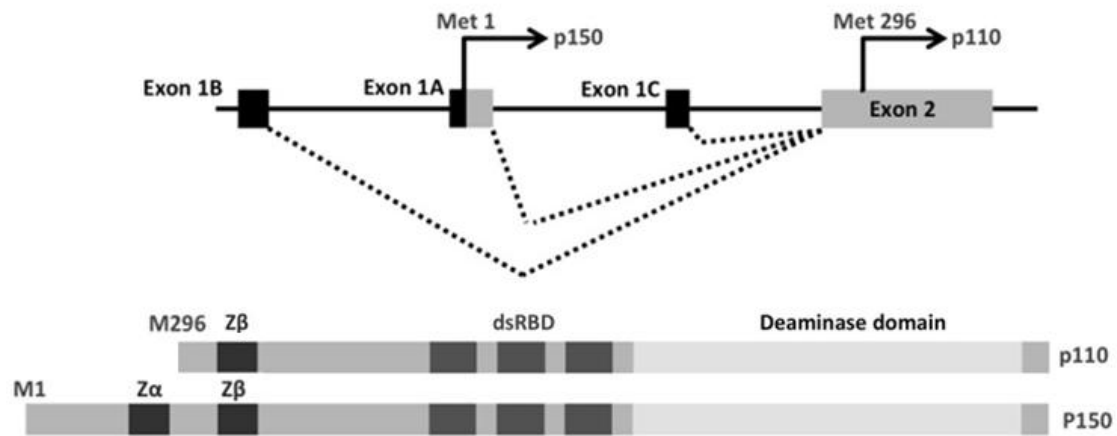
Während die ADAR1-Expression sowohl von konstitutiven als auch von einem IFN-induzierbaren Promotor getrieben wird (Patterson and Samuel 1995), wird die ADAR2-Expression durch den Transkriptionsaktivator CREB (*cAMP response element-binding protein*) induziert (Peng, Zhong et al. 2006). Der Regulationsmechanismus für ADAR3 ist bisher noch unbekannt.

ADAR1 und ADAR2 werden in vielen Geweben exprimiert, ihre enzymatischen Substrate, die zu einer Veränderung in der Aminosäure-Sequenz führen, wurden aber hauptsächlich, wenn auch nicht exklusiv, im Nervensystem identifiziert. Im Gegensatz dazu konnte für ADAR3 keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Auch ist die Expression von ADAR3 nur für das Gehirn beschrieben.

Darüber hinaus wurde eine entwicklungs-abhängige Expression der ADAR-Transkripte beobachtet. So wird ADAR1 im Vergleich zu fetalen Geweben verstärkt in adulten Geweben exprimiert. Im Gegensatz dazu werden geringere oder zumindest gleiche Expressionsmengen an ADAR2 und ADAR3 in adulten gegenüber fetalen Geweben detektiert (Shtrichman, Germanguz et al. 2012). Dabei korreliert die ADAR-mRNA-Expression nicht immer mit der Häufigkeit der beobachteten Editierungsereignisse (Tan, Huang et al. 2009; Wahlstedt, Daniel et al. 2009). Dies legt die Existenz zusätzlicher, oben beschriebener, posttranskriptionaler oder auch translationaler Regulationsmechanismen nahe.

## **1.5. ADAR1**

ADAR1 kommt in zwei Isoformen vor (Patterson and Samuel 1995). Die Expression der langen, 150kD-Form von ADAR1 (ADAR1p150) wird durch einen IFN-induzierbaren Promotor reguliert. Diese Form trägt eine zusätzliche, zweite Z-DNA-Bindedomäne (ZBD) und ein Kernexportsignal am N-Terminus. Zwei weitere Promotoren bewirken die konstitutive Transkription der kurzen, 110kD-Form (ADAR1p110), welche durch alternatives Spleißen N-terminal um 295 AS verkürzt ist. Ihr fehlt daher das Kernexportsignal und eine ZBD (Patterson and Samuel 1995; George and Samuel 1999; George and Samuel 1999).



**Abb. 1.8 ADAR1 kommt in zwei Isoformen vor** (Akiyama 2013). Exon1A, Exon1B und Exon1C werden an derselben Stelle an Exon2 gespleißt. Exon1A enthält ein Methionin (Met)-Initiationscodon für die ADAR1p150-Isoform (1226 AS) und folgt dem IFN-induzierbaren Promotor. Exon1B und Exon1C enthalten kein AUG-Initiationscodon. Diese Exons folgen konstitutiven Promotoren. Das zweite AUG an Position AS 296 in Exon2 initiiert die Translation der konstitutiv exprimierten ADAR1p110-Isoform.

Die relative Expression der drei spezifischen ADAR1-Promotortranskripte ist dabei gewebe-spezifisch. So wird im menschlichen Gehirn eine konstitutiv hohe Expression von einem der konstitutiven Promotoren gesteuert, während die IFN-induzierbare ADAR1p150-Isoform, präferentiell in anderen Geweben, wie Leber, Lunge, Caecum, Herz, Milz, Peyer Patches und Niere exprimiert wird (Shtrichman, Heithoff et al. 2002; George, Wagner et al. 2005).

Zusätzlich zu den beschriebenen Isoformen wurden auch verschiedene Spleißvarianten beschrieben, die die Distanz zwischen den verschiedenen funktionellen Domänen verkürzen. Es wird angenommen, dass diese Verkürzung die Interaktion von ADAR1 mit dsRNA-Substraten beeinflusst und damit zur Spezifität innerhalb des Editierungsprozesses beiträgt (Liu, George et al. 1997; George, Wagner et al. 2005).

ADAR1p150 wird aufgrund seines Kernexportsignals hauptsächlich im Zytoplasma detektiert, wohingegen ADAR1p110 vornehmlich im Nukleoplasma und Nukleolus lokalisiert ist (Poulsen, Nilsson et al. 2001; Desterro, Keegan et al. 2003). ADAR1p110 kann aber auch ins Zytoplasma translozieren, wobei die Bindung von Exportin-5 an die dsRBD den Export bewirkt (Fritz, Strehlow et al. 2009). Die Funktion der ADAR1p110-Translokation ins Zytoplasma wird dabei im nukleären Export bestimmter dsRNAs, vor allem möglicherweise editierter pre-miRNAs, vermutet (Kim 2005).

Die Bedeutung der Z-DNA-Bindedomänen ist bisher noch nicht vollständig verstanden, aber einige interessante Aspekte, die eine spezielle Funktion für ADAR1 innerhalb der ADAR-Familie andeuten, wurden bereits aufgedeckt. Entgegen der Benennung und der hochkonservierten Struktur ist nur die in der induzierten ADAR1p150-Isoform vorkommende Z $\alpha$ -Domäne

in der Lage die linksgängige Z-DNA-Form zu binden (Athanasiadis, Placido et al. 2005). Diese Bindung findet dabei Sequenz-unspezifisch statt (Ha, Choi et al. 2009). Da sich Z-DNA-Konformationen transient abwärts einer aktiven Polymerase bilden, besteht eine mögliche Funktion der Z-DNA-Bindung darin, ADAR1 an Stellen aktiver Transkription zu positionieren. Dadurch wird die Editierung bestimmter dsRNA-Substrate noch vor dem Spleißen der Transkripte ermöglicht (Barraud and Allain 2011). Neben der Z-DNA-Bindung wurden für die Z $\alpha$ -Domäne auch Z-RNA-Bindungseigenschaften beschrieben (Brown, Lowenhaupt et al. 2000). Die Bindung von Z-RNA, eine Formation die häufig von alternierenden Purin-Pyrimidin-RNA-Sequenzen gebildet wird, scheint dabei zur Sequenzspezifität beizutragen (Koeris, Funke et al. 2005).

Neben der IFN-induzierten Expression der ADAR1p150-Form, für die eine JAK1 und STAT2-abhängige, aber STAT1-unabhängige Regulation beschrieben wurde (George, Das et al. 2008), wird die ADAR1-Expression noch durch weitere Faktoren reguliert. Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, spielt dabei die Dimerisierung der ADAR-Proteine sowie posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung und SUMOylierung, eine Rolle. Darüber hinaus wurde für ADAR1 eine Regulation durch die miRNA-1 nachgewiesen, die eine entscheidende Rolle der Entwicklung des Herzens spielt (Lim, Lau et al. 2005).

## **1.6. ADAR1 in funktionellen biologischen Prozessen**

Für die ADAR-abhängige A $\rightarrow$ I-Editierung wurden umfassende Effekte bezüglich der Veränderung in Protein-kodierenden Bereichen und der damit möglicherweise veränderten Proteinfunktion bezüglich des mRNA-Spleißens und der -Stabilität und nicht zuletzt der RNAi beschrieben (1.4). Den dafür verantwortlichen enzymatisch aktiven ADAR-Proteinen, ADAR1 und ADAR2, wurden diesbezüglich aufgrund der Erkenntnisse aus den jeweiligen Knockout-Modellen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben (Higuchi, Maas et al. 2000; Hartner, Walkley et al. 2009). Immer mehr Daten assoziieren ADAR1 dabei mit wichtigen Funktionen, die nicht nur wie für ADAR2 beschrieben auf neuronale Gewebe beschränkt sind, sondern die in einem weitaus breiteren Feld Bedeutung finden. Eingeschlossen sind dabei Themengebiete des Zellüberlebens, der Stammelldifferenzierung, der Embryonalentwicklung sowie pathologischer Prozesse, wie Virus-Infektionen, Tumorentwicklung, Autoimmunerkrankungen und einer Hautpigmentierungsstörung (Nishikura 2010). Der folgende Abschnitt soll dazu eine Übersicht geben.

In neuronalen Geweben editiert ADAR1 zusammen mit ADAR2 den Serotonin-Rezeptor 5HT<sub>2c</sub>R und ist damit verantwortlich für dessen Funktionalität. Fehlende Editierung dieses Rezeptors ist unter anderem mit depressiven Vorgängen assoziiert worden (Mombereau, Kawahara et al.

2009). Darüber hinaus zeigt ADAR1 eine Aktivität auf eine wichtige Editierungsposition in der Glutamat-Rezeptor-Untereinheit GluR2, die für dessen Funktion wichtig ist (Liu and Samuel 1999).

Zudem wurden den miRNAs in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung als RNA-Editierungssubstrate zugesprochen - alleine im menschlichen Gehirn werden annähernd 16 % der pri-miRNAs editiert. Durch die Verwendung von ADAR1- bzw. ADAR2-spezifischen Knock-out-Modellen konnte für manche Editierungspositionen innerhalb der pri-miRNAs spezifisch eine ADAR1- bzw. ADAR2-Abhängigkeit nachgewiesen werden (Kawahara, Megraw et al. 2008). Die Editierung einer miRNA kann zur Veränderung der Zielsequenz führen oder aber auch die Prozessierung der miRNA selbst beeinflussen. Darüber hinaus brachte eine kürzlich erschienene Studie weitere wichtige Einblicke in einen Editierungs-unabhängigen Mechanismus der miRNA-Prozessierung. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Bildung eines Heterodimers aus ADAR1 und einem Dicer-Molekül, einem Schlüsselmolekül der miRNA-Prozessierungsmaschinerie, zum einen die Effizienz der Prozessierungsrate erhöht und zum anderen erst die Bildung des RNA-induzierenden „Silencing“-Komplex ermöglicht wird (Ota, Sakurai et al. 2013).

Die bisher bedeutendste Funktion von ADAR1 im Zellüberleben und Embryonenentwicklung wurde in einem Knockout-Mausmodell gezeigt. ADAR1-defiziente Embryonen überleben nur bis zu Embryonaltag 11.5-12. Massiver Zelltod in Abwesenheit von ADAR1 machte eine essentielle Funktion dieses Enzyms beim Zellüberleben einiger Zelltypen deutlich. Dabei waren vor allem hämatopoetische Stammzellen (HSCs) sowie Hepatozyten betroffen, während andere Zellen, wie Gehirn, Herz, Lunge, Blutgefäße, Niere und Plazenta keine Auffälligkeiten zeigten (Hartner, Schmittwolf et al. 2004; Wang, Miyakoda et al. 2004; Hartner, Walkley et al. 2009). Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass ADAR1 nicht nur für die embryonale, sondern auch für die adulte Hämatopoese wichtig ist (XuFeng, Boyer et al. 2009), wohingegen keine substantiellen Effekte auf die Differenzierung von myeloiden und B-Zell Linien im Knochenmark festgestellt werden konnten (Iizasa and Nishikura 2009). Näher beleuchtet wurde zuvor auch schon die Notwendigkeit von ADAR1 bei der embryonalen Erythropoese (Wang, Khillan et al. 2000). Dass ADAR1 wesentlich am Zellüberleben beteiligt ist, wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die ADAR1-Aktivität auch im Zusammenhang mit malignen Zellveränderungen steht (Jiang, Crews et al. 2012; Steinman, Yang et al. 2012; Chen, Li et al. 2013; Shimokawa, Rahman et al. 2013).

Im Kontext des beobachteten Zelltods durch die ADAR1-Defizienz und v.a. im Kontext viraler Infektionen wurde ein Einfluss von ADAR1 auf den PKR-Signalweg beschrieben. Eine Aktivierung der PKR führt über die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2- $\alpha$  und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowohl zum Abbruch der Proteintranslation als auch zum Einleiten

der Apoptose (Gil and Esteban 2000). ADAR1 ist in der Lage einen Proteinkomplex mit der PKR zu bilden und inhibiert dabei die katalytische Funktion der PKR. Der Einfluss dieser PKR-Inhibition durch ADAR1 im Kontext viraler Infektionen wurde umfassend beschrieben (Pfaller, Li et al. 2011). Ein Einfluss auf den beobachteten ADAR1-abhängigen Zelltod ist jedoch umstritten (Wang 2011).

Im Kontext viraler Infektionen wurden über den Einfluss der ADAR1-abhängigen Inhibition der PKR-Aktivität hinaus nicht nur anti-virale sondern auch pro-virale Effekte beschrieben, abhängig von der jeweiligen Virus-Wirt-Kombination (Samuel 2011).

Darüber hinaus wurden weitere über Protein-Protein-Interaktion gebildete ADAR1-Proteinkomplexe nachgewiesen. Dazu gehören: NF90-Proteine (nuclear factor 90), für die eine stimulatorische Wirkung auf die Transkription und Translation beobachtet wurde (Nie, Ding et al. 2005); P54<sup>nrb</sup>, ein nukleäres Protein, das spezifisch Inosin-haltige RNAs bindet (Zhang and Carmichael 2001); InRNP (large nuclear ribonucleoprotein), das wichtig für die pre-mRNA-Prozessierung ist (Raitskin, Cho et al. 2001) und hUpf1 (humanes UP Framshift 1), das als Teil des mRNA-Überwachungssystems die korrekte Proteintranslation kontrolliert (Agrat, Raitskin et al. 2008). Diese Komplexe tragen potentielle ADAR1-Effekte in ein breiteres Feld von biologischen Prozessen, die die Regulation der Gentranskription, posttranskriptionale Prozesse und RNA-Degradationsmechanismen einschließen.

Mutationen im ADAR1-Gen sind im Menschen mit einer Hautpigmentierungsstörung, der sogenannten Dyschromatosis hereditaria symmetrica (DSH) (Akiyama 2013), sowie mit der Autoimmunerkrankung, Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS) (Rice, Kasher et al. 2013) assoziiert. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings noch unverstanden.

Weiterhin zeigten Untersuchungen des genannten Knockout-Mausmodells sowie der im Menschen vorkommenden AGS eine Assoziation der ADAR1-Defizienz oder -Mutation mit einer erhöhten Typ I IFN-Signatur, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

## **1.7. ADAR1 und Typ I Interferone**

Schon die strukturellen Besonderheiten in der Domänen-Organisation von ADAR1 zeigen eine Beteiligung dieses Proteins an IFN-assoziierten Prozessen: So existiert ADAR1 in zwei Isoformen, von denen die eine erst durch IFN induziert wird (1.5). In welcher Art und Weise sich aber eine ADAR1-Aktivität in einer potentiellen Rückkopplungsschleife auswirkt, war lange unbekannt.

Einige Studien legten eine enge Assoziation zwischen ADAR1 und einer umfassenden Regulation der Typ I IFN nahe und wiesen dabei ADAR1 eine Funktion als Typ I IFN-Suppressor zu. Microarray-Analysen in hämatopoetischen Stammzellen ADAR1-defizienter Embryonen



zeigten einen dramatischen Anstieg der Genexpression einiger IFN-regulierter Gene. Auch die Typ I IFN-Spiegel in den extrazellulären Flüssigkeiten der ADAR1-defizienten Embryonen waren erhöht (Hartner, Walkley et al. 2009). In dieser Studie konnte aber nicht geklärt werden, ob die Hochregulierung der IFN-stimulierten Gene eine Konsequenz der erhöhten Typ I IFN-Spiegel war oder ob die ADAR1-Defizienz die Signaltransduktion zur Induktion IFN-stimulierten Gene verstärkte. Auch konnte bisher nicht geklärt werden, ob die beobachteten Effekte direkte Ergebnisse der ADAR1-Defizienz darstellen oder ob sie durch sekundäre Antworten ausgelöst werden.

Kürzlich assoziierte eine Studie Mutationen im humanen *ADAR1*-Gen mit dem Aicardi-Goutieres-Syndrom (AGS), einer schweren Autoimmunerkrankung, die ebenso wie in dem ADAR1-defizienten Knockout-Mausmodell durch eine erhöhte Typ I IFN-Signatur charakterisiert ist. Es ist bekannt, dass bei der Etablierung dieses Krankheitsbildes ein zellintrinsischer Mechanismus durch IFN-stimulierende Nukleinsäuren zur Initiation der Autoimmunreaktion führt. Es wird spekuliert, dass ADAR1 in diesem Kontext eine Rolle in der Limitierung einer zytoplasmatischen Akkumulation von dsRNAs spielt, die von genomischen repetitiven Elementen generiert werden (Rice, Kasher et al. 2013).

In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Inosin-haltige I:U-dsRNAs effizient den IFN-Signalweg inhibieren (Vitali and Scadden 2010). Somit wird in diesem Zusammenhang eine Funktion von ADAR1 als Produzent solcher inhibitorischer, Inosin-haltiger dsRNAs diskutiert, deren Abwesenheit dann zu der beschriebenen erhöhten Typ I IFN-Signatur führen könnte (Wang 2011).

Immer mehr Hinweise in den letzten Jahren zeigen zudem eine Rolle für ADAR1 in der Modulation der Interferon-Antwort als Gegenspieler der dsRNA-aktivierten Proteinkinase R (PKR) auf und bringen damit ADAR1 in Zusammenhang mit der für viele Viren beobachteten proviralen Funktion von ADAR1. Bekannt ist die PKR, selbst ein IFN-induzierbares Protein, als Regulator der Proteintranslation in Virus-infizierten Zellen, indem sie durch Phosphorylierung des Proteinsynthese-Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  diese beeinflusst (Samuel 1993). Darüber hinaus positionieren immer mehr Studien die PKR als einen positiven Effektor für die Typ I IFN-Produktion. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung der PKR mit einer erhöhten Aktivierung von IRF3, einem Schlüsselmolekül der Typ I IFN-Produktion, korreliert und zu einer PKR-abhängigen erhöhten IFN $\beta$ -Expression führt (McAllister and Samuel 2009; McAllister, Toth et al. 2010). ADAR1 supprimiert dabei sowohl die Aktivierung der PKR als auch die von IRF3 und damit die PKR-abhängige IFN $\beta$ -Produktion. Der Mechanismus durch den ADAR1 diese Inhibierung vermittelt ist noch nicht vollständig geklärt, aber vorstellbar sind Prozesse der Destabilisierung von dsRNA-Strukturen, die Kompetition oder Sequestration von

dsRNA, oder auch die Bildung inaktiver ADAR1/PKR-Heterodimer-Komplexe (Pfaller, Li et al. 2011).

Ein weiteres Kapitel in der ADAR1-Wirkung innerhalb der Typ I IFN wird durch den Einfluss von ADAR1 auf die miRNA-Biogenese eröffnet. Wie schon beschrieben, kann die ADAR1-Aktivität Editierungs-abhängig oder auch -unabhängig die miRNA-Prozessierung modulieren (1.6). Es sind eine Reihe von miRNAs bekannt, die IFN-Signalwege regulieren (Sedger 2013). Es ist vorstellbar, dass eine ADAR1-abhängige Veränderung dieser Prozessierung die Veränderung der IFN-Antwort maßgeblich beeinflusst.

## **1.8. Zielsetzung der Arbeit**

### **1.8.1. Einfluss von ADAR1 auf die Typ I Interferon-Induktion**

Die besondere Domänenstruktur sowie die IFN-Induzierbarkeit von ADAR1 lassen eine Funktion über die Editierung bekannter, neuronal-spezifischer Substrate hinaus annehmen.

Und in der Tat wurde ein Zusammenhang von ADAR1 mit Typ I IFN-Signalwegen bisher durch einige Studien sowohl im humanen als auch im murinen System beschrieben (1.7). Die Substrate bzw. die zugrundeliegenden Mechanismen dieser ADAR1-abhängigen Typ I IFN-Modulation sind jedoch weitgehend unverstanden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll daher die ADAR1-abhängige Beteiligung an der Typ I IFN-Antwort in verschiedenen Immunzellen ADAR1-defizienter Modelle untersucht und mögliche zelltypspezifische Effekte charakterisiert werden, auch im Hinblick auf die verschiedenen Signalwege, die zu einer Typ I IFN-Antwort führen können. Gerade das Vorkommen der verlängerten, IFN-induzierten ADAR1p150-Isoform macht die Beteiligung dieser Isoform an zytoplastisch ablaufenden, IRF-abhängigen Signalwegen denkbar. Da die Struktur von ADAR1p150 aber keine bekannte signalweiterleitende-Domäne besitzt wäre es vorstellbar, dass ADAR1 durch Protein-Protein-Interaktionen mit beteiligten Signalmolekülen interagiert und so dessen Aktivität moduliert, wie es schon für Dicer oder die PKR beschrieben wurde (1.6). Aber auch eine Editierungs-abhängige Aktivität der ADAR1-Proteine könnte für potentiell modulatorische Effekte verantwortlich sein, indem die Editierung bestimmter Signalmoleküle oder auch regulierender miRNAs zu Veränderungen der Typ I IFN-Antwort führt. Die eigene IFN-Induzierbarkeit kann dabei als Rückkopplungs-Mechanismus verstanden werden.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung werden zum einen siRNA-vermittelt ADAR1-defiziente humane Monozyten sowie verschiedenen ADAR1-defiziente Immunzellen aus zwei unterschiedlichen Mausstämmen im Vergleich zu den entsprechenden ADAR1-kompetenten Zellen untersucht. In beiden Mausstämmen basiert die Induzierung des ADAR1-Knockouts auf dem

Cre/loxP-Rekombinationssystem. Im ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Mausstamm weisen ausschließlich myeloide Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine ADAR1-Defizienz auf, wohingegen im ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Mausstamm eine ADAR1-Defizienz in dendritische Zellen (DCs), natürlichen Killerzellen, Granulozyten, Monozyten sowie Makrophagen etabliert wird. Aus dem Knochenmark der verschiedenen Mausstämmen sollen *in vitro* zum einen Makrophagen und zum anderen dendritische Zellen generiert und zusammen mit den humanen ADAR1-defizienten Monozyten in anschließenden Stimulationsexperimenten auf ihr Typ I IFN-Aktivierungspotential durch verschiedene PRR-Liganden analysiert werden. Die eingesetzten PRR-Liganden sollen dabei die verschiedenen Signalwege abdecken, die zu einer Typ I IFN-Antwort führen können. Durch Unterschiede in der Zytokinexpression von ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen wird die Funktion von ADAR1 in der Typ I IFN-Antwort verifiziert. Die Verwendung der beiden Mauslinien bietet darüber hinaus die Möglichkeit auf der Grundlage unterschiedlicher Zellsysteme (Makrophagen oder dendritische Zellen) für ADAR1 eine zelltypspezifische Rolle zu untersuchen. Die potentiellen ADAR1-abhängigen Veränderungen werden anschließend auf mögliche Veränderungen in der Signalgebung hin untersucht, um die zugrundeliegenden Mechanismen näher zu charakterisieren.

### **1.8.2. Einfluss von ADAR1 auf die differentielle Zellentwicklung**

Für ADAR1 wurde eine essentielle Funktion beim Überleben einiger Zelltypen beschrieben (1.6). Die bei ADAR1-Defizienz zugrundeliegenden ADAR1-abhängigen Mechanismen für das beobachtete massive Zellsterben konnten bisher noch nicht aufgedeckt werden. Es wurde vermutet, dass die in den betroffenen Zellen erhöhte Typ I IFN-Signatur möglicherweise apoptotische Prozesse in Gang setzt. Seit Kurzem ist bekannt, dass ADAR1 essentiell an der Prozessierung funktioneller miRNAs beteiligt ist (1.6). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass das Fehlen der üblicherweise im Embryonalstadium auftretenden erhöhten miRNA-Prozessierung zur Dysregulation vieler Gene führt, die normalerweise während dieses Stadiums reprimiert werden und damit eine normale Entwicklung des Embryos verhindern.

Da sich die Daten bisher aber überwiegend auf das Überleben von embryonalen, sowie adulten hämatopoetischen Stammzellen beziehen, soll im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht werden, inwieweit ADAR1 für die Differenzierung von Immunzellen notwendig ist. Als Grundlage zur Bearbeitung dieser Fragestellung eignen sich die beschriebenen, konditionell ADAR1-defizienten Mausmodelle, da hämatopoetische Stammzellen in diesen Maussystemen noch nicht von der ADAR1-Defizienz betroffen sind und sich somit normal entwickeln können. Erst die Differenzierung zu den entsprechenden Zellen löst auf Grundlage des Cre/loxP-Rekombinationssystem die ADAR1-Defizienz aus. Wie oben beschrieben werden aus dem

Knochenmark der ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre- bzw. ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Mäuse zum einen Makrophagen und zum anderen dendritische Zellen *in vitro* generiert und deren Differenzierung charakterisiert und verifiziert.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

Gerät	Modell	Firma/Firmensitz
Agarose-Gelelektrophoresekammer	-	OWL, Weilheim
Analysewaage	„R160P-D1“	Sartorius GmbH, Göttingen
Blot-Modul	„Xcell II Mini Cell“ (EI9001)	Novex, San Diego, USA
Durchflusszytometer	„FACS Calibur“	Becton Dickinson, Basel
Elutriationszentrifuge	„J2-21M/E“	Beckman, Brea, USA
Blot-Imager System	„ChemIDoc XRS“	Biorad, Hercules, USA
Gel-Imager System	-	Fröbel Labor Technik, Lindau
Inkubator	„HERA cell 240“	Heraeus, Hanau
Konfokales Laserscan-Mikroskop	„TCS SP5“	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer	-	Heidolph, Schwabach
Mikroplattenwaschgerät	„Skan Washer 400“	Molecular Devices, Ismaning
Mikroskop (Durchlicht)	„Wilovert“	WTW, Weilheim
Nucleofector	„II Device“	Lonza, Basel, CH
pH Meter	„pH523“	WTW, Weilheim
Pipetten	„Reference“	Eppendorf
Pipettierhilfe	„pipetus“	Hirschmann, Eberstadt
Plattenphotometer	„Emax“	Molecular Devices, Ismaning
	FLUOstar Omega	BMG Labtech, Ortenberg
Präparierbesteck	-	Fine Science Tools, Heidelberg
Präzisionswaage	„P100“	Mettler Toledo, Gießen
RT-PCR-Cycler	„Mini Opticon“	Biorad, Hercules, USA
Schwenkplatte	„Duomax 1030“	Heidolph, Schwabach

SDS-Gelelektrophoresekammer	„Perfect Blue Twin S“	Peqlab, Erlangen
Spannungsquelle	„Standard PowerPack P25“	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer	„NanoDrop-1000“	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilbank	„BIOHIT“	Heraeus, Hanau
	„LaminAir HB 2448“	Heraeus, Hanau
Thermocycler	„Master cycler gradient“	Eppendorf, Hamburg
	„Elite“	Helena, Sunderland, UK
	„iCycler“	Biorad, Hercules, USA
Thermo-Schüttler	„TS-100“	Peqlab, Erlangen
Tischzentrifuge	„Biofuge fresco“	Heraeus, Hanau
	„GMC-060“	LMS, Brigachtal
	„Biofuge stratos“	Heraeus, Hanau
Vortexer	„REAX 2000“	Heidolph
Wasserbad	„LAUDA M20“	LAUDA, Lauda-Königshofen
Zählkammer	„Neubauer“	W.Schreck, Hofheim
Zentrifuge	„Rotanta /RP“	Hettich, Tuttlingen
	„Multifuge 1 L-R“	Heraeus, Hanau

## 2.2. Chemikalien

Chemikalien	Firma/Firmensitz
Agarose „UltraPure™“	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumchlorid reinst. (NH <sub>4</sub> Cl)	Roth, Karlsruhe
Bicine	Fuorochem, Hadfield, UK
Bis Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroformisoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth, Karlsruhe

<b>Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Di-Natrium-EDTA</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Essigsäure (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Ethanol</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Ethidiumbromid</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Paraformaldehyd</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Glyzerol</b>	Roth, Karlsruhe
<b>HEPES</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Isopropanol</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Magermilchpulver</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Methanol</b>	Roth, Karlsruhe
<b>MOPS</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Natriumacetat</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Natriumazid</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Natriumfluorid (NaF)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Natriumvanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Salzsäure (HCl)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Saponin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Tris-Base</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Tris-HCl</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Trypanblau</b>	Serva, Heidelberg
<b>Tween20</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Wasserstoffperoxid 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Zitronensäure (C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)</b>	Roth, Karlsruhe

## 2.3. Puffer

Puffer	Rezept
<b>6x Probenpuffer (Lämmli, für SDS PAGE)</b>	12% SDS, 12.5% 2-Mercaptoethanol, 60% Glycerol, 0.375 mM TrisBase, pH 6.8 mit HCl einstellen, gesättigte Bromphenolblaulösung zugeben
<b>10x PBS-Puffer</b>	2.7 mM KCl, 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM EDTA, 6.5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.4
<b>50x TAE-Puffer</b>	40 mM Tris, 0.1% Essigsäure, 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O
<b>10x TBS-Puffer</b>	152 mM TrisHCl, 48 mM TrisBase, 1500 mM NaCl, pH 7.6
<b>Blockpuffer (ELISA)</b>	1% BSA, 0.05% Tween20 in 1x PBS
<b>Blockpuffer (Western Blot)</b>	Milchpulver (MP): 5% MP, 0.1% Tween20 in 1x TBS  Bovines Serum Album (BSA): 5% BSA, 0.1% Tween20 in 1x TBS
<b>EDTA-Lösung</b>	0.5 M Di-Natrium EDTA, pH 8.0 → autoklavieren
<b>Elutriations-Puffer</b>	0.1% AB Serum, 0.01% EDTA in 1xPBS
<b>FACS-Puffer</b>	2% FCS, 0.01% Na-Azid, 2 mM EDTA in PBS <sup>def</sup>
<b>Lauf-Puffer (SDS PAGE)</b>	50 mM MOPS, 50 mM TrisBase, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH7.7
<b>Liposomen-Puffer</b>	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% in DEPC; pH 7.4 → 3h rühren, 2x autoklavieren
<b>Lysepuffer (Mäuseschwänze)</b>	10 mM TrisHCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS in H <sub>2</sub> O u.p.
<b>Rote-Blut-Zell-Lyse-Puffer</b>	150 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0.1 mM EDTA → autoklavieren
<b>Saponin-Puffer</b>	1% BSA, 0.5% Saponin in 1x PBS <sup>def</sup>
<b>Substratpuffer (ELISA)</b>	38 mM C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> , 66 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 5.0
<b>Transferpuffer (Western Blot)</b>	25 mM Bicine, 25 mM BisTris, 1 mM EDTA, pH 7.2
<b>Waschpuffer (ELISA)</b>	0.05% Tween20 in 1X PBS
<b>Waschpuffer (Western Blot)</b>	0.1% Tween20 in 1xTBS



## 2.4. Reagenzien

Enzym/Reagenz	Firma/Firmensitz
6x Loading Dye (für Agarosegele)	Thermo Scientific, Waltham, USA
DAPI	Roche, Mannheim
DNase	Roche, Mannheim
DOTAP Transfection Reagent	Roche, Mannheim
ECL Reagent	Merck, Darmstadt
Flt3L, murin, Überstand von stabil Flt3L exprimierender CHO Zelllinie	Eigenproduktion
Gene Ruler DNA ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
GM-CSF, human, rekombinant	PeptoTech, Rocky Hill, USA
GM-CSF, murin, rekombinant	PeptoTech, Rocky Hill, USA
GM-CSF, murin, Überstand von stabil GM-CSF exprimierender X6310 Zelllinie	Eigenproduktion
IFN $\alpha$ , murin, rekombinant	Hycult Biotech, Uden, NE
IFN $\alpha$ , human, rekombinant	PeptoTech, Rocky Hill, USA
IFN $\beta$ , murin, rekombinant	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
IL6, human, rekombinant	ImmunoTools, Friesoythe
IL6, murin, rekombinant	R&D Biosystems, Wiesbaden
M-CSF, murin, rekombinant	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Lipofectamine™2000 Reagent	Life technologies, Carlsbad, USA
MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol	Roth, Karlsruhe
OPD (Phenylenediaminedihydrochloride)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinaseinhibitorcocktail	Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Proteinmarker (prestained)	Thermo Scientific, Waltham, USA
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptavidin-Peroxidase	Roche, Mannheim
Stripping-Puffer (Western Blot)	Thermo Scientific, Waltham, USA
SYBR Gold	Life technologies, Carlsbad, USA
TO-PRO-3 Iodid	Life technologies, Carlsbad, USA
Trizol „Tri Reagent“	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim

## 2.5. Kits

Kit	Firma/Firmensitz
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Human Monocyte Nucleofector Kit	Lonza, Basel, CH
Human Interferon Beta ELISA Kit	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
Murine IP10 ELISA Kit	PeptoTech, Rocky Hill, USA
PeqlabGOLD RNA Isolation Kit	Peqlab, Erlangen
Taq PCR Master Mix Kit	Quiagen, Hilden

## 2.6. Medien und Zusätze (Zellkultur)

Medium/Zusatz	Firma/Firmensitz
2-Mercaptoethanol	Life technologies, Carlsbad, USA
AB-Serum	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco`s PBS <sup>def</sup> (1x)	PAA, Cölbe
Fetales calf serum (FCS)	Life technologies, Carlsbad, USA
L-Glutamine 200 mM (100x)	PAA, Cölbe
OptiMEM	Life technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Ultra Pure Wasser	Biochrom AG, Berlin

Medium supplementiert (Kultur)	Zusammensetzung
OptiMEM supp. pDC (murine Flt3L Kultur/ pDCs)	100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1% FCS, 0.1% 2-Mercaptoethanol
RPMI supp. Mono (humane Monozyten)	2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1x Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2% AB Serum
RPMI supp. mDC (murine GM-CSF Kultur/ mDCs)	2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0.5% 2-Mercaptoethanol, 10% FCS (Hitze inaktiviert)
RPMI supp. MO (murine M-CSF Kultur/ Makrophagen)	2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% FCS, 0.1% 2-Mercaptoethanol

## 2.7. Antikörper

Spezifität	Markierung	Ursprung	Firma/Firmensitz
<b>Western Blot</b>			
ADAR1, murin (15.5.6)	-	mouse	Santa Cruz, Dallas USA
Aktin, murin/human	-	mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim
IRF3, murin (N-term)	-	rabbit	Epitomics, Burlingame, USA
IRF7, murin (H-246)	-	rabbit	Santa Cruz, Dallas USA
STAT1, murin	-	rabbit	Cell Signaling, Danvers, USA
TBK1, murin (D1B4)	-	rabbit	Cell Signaling, Danvers, USA
TRIF, murin	-	rabbit	IMGENEX, SanDiego, USA
pIRF3 (Ser396), murin (4D4G)	-	rabbit	Cell Signaling, Danvers, USA
pIRF7 (Ser471/472), murin	-	rabbit	Biorbyt, Cambridge, UK
pTBK1 (ser172), murin (D52C2)	-	rabbit	Cell Signaling, Danvers, USA
pSTAT1 (Ser727), murin (D3B7)	-	rabbit	Cell Signaling, Danvers, USA
pSTAT1 (Tyr701), murin	-	rabbit	Cell Signaling, Danvers, USA
Rabbit IgG	HRP	donkey	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Mouse IgG	HRP	goat	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
<b>ELISA</b>			
IFN $\alpha$ , human	-	mouse	eBioscience, San Diego, USA
IFN $\alpha$ , human	HRP	mouse	eBioscience, San Diego, USA
IFN $\alpha$ , murin	-	rat	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
IFN $\alpha$ , murin	-	rabbit	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
IFN $\beta$ , murin	-	rabbit	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
IFN $\beta$ , murin	-	rat	PBL Interferon Source, Piscataway, USA
IL6, human	-	rat	BD Bioscience, San Jose, USA
IL6, human	Biotin	rat	BD Bioscience, San Jose, USA
IL6, murin	-	rat	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL6, murin	Biotin	rat	R&D Systems, Minneapolis, USA

<b>IP10, murin</b>	-	rabbit	PeproTech, Rocky Hill, USA
<b>IP10, murin</b>	Biotin	rabbit	PeproTech, Rocky Hill, USA
<b>Rabbit IgG</b>	HRP	donkey	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
<b>Rat IgG</b>	HRP	rabbit	Abcam ,Cambridge, UK
<b>FACS</b>			
<b>B220, murin</b>	FITC	rat	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>BDCA-2, human</b>	FITC	mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>CD11b, murin</b>	FITC	rat	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>CD11c, murin</b>	APC	rat	eBioscience, San Diego, USA
<b>CD11c, murin</b>	PE	rat	eBioscience, San Diego, USA
<b>CD14, human</b>	PE	mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
<b>CD80, murin</b>	FITC	rat	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>CD86, murin</b>	PE	rat	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>CD206, murin</b>	APC	rat	BioLegend, San Diego, USA
<b>MHCII, murin</b>	PE	rat	eBioscience, San Diego, USA
<b>F4/80, murin</b>	FITC	rat	eBioscience, San Diego, USA
<b>F4/80, murin</b>	PE	rat	eBioscience, San Diego, USA
<b>Fc-Block</b>	-	mouse	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
<b>Fc-Block</b>	-	rat	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
<b>Sca1 (Ly6A/E), murin</b>	APC	rat	eBioscience, San Diego, USA
<b>Sca1 Isotypenkontrolle</b>	APC	rat	eBioscience, San Diego, USA
<b>Immunfluoreszenz</b>			
<b>IRF3, murin (N-term)</b>	-	rabbit	Epitomics, Burlingame, USA
<b>IRF7, murin (H-246)</b>	-	rabbit	Santa Cruz, Dallas USA
<b>Rabbit-IgG</b>	Alexa546	donkey	Life technologies, Carlsbad, USA

## 2.8. Stimulanzen/Viren

<b>Stimulus/Virus</b>	<b>Sequenz/Ursprung</b>	<b>Firma/Firmensitz</b>
<b>LPS</b>	Lipopolysachharid aus E.coli	InvivoGen, San Diego, USA

<b>Poly I:C</b>	Synthetisches Poly Inosin:Cytidin LMW	InvivoGen, San Diego, USA
<b>Sendai Virus</b>	Sendai Virus aus Allantois Flüssigkeit	Institut für Immunologie, Marburg
<b>VACV70mer</b>	5`-CCA TCA GAA AGA GGT TTA ATA TTT TTG TGA GAC CAT CGA AGA GAG AAA GAG ATA AAA CTT TTT TAC GAC T-3`	Eurofins MWG Operon, Ebersberg

## 2.9. Primer

Primer	Sequenz	Firma/Firmensitz
<b>ADAR1-del1 (536)</b>	5`-CTG CCA CTT CTC CCT GAC TC-3`	Metabion, Martinsried
<b>ADAR1-loyp2t-2 (537)</b>	5`-AGT CCT CTC CCT TCC CTG AA-3`	Metabion, Martinsried
<b>LysMCre1 (672)</b>	5`-CCC AAG AAG AAG AGG AAG GTG TCC-3`	Metabion, Martinsried
<b>LysMCre2 (673)</b>	5`-CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG-3`	Metabion, Martinsried
<b>CD11c-Cre (fow) (1035)</b>	5`-ACT TGG CAG CTG TCT CCA AG-3`	Metabion, Martinsried
<b>Cre-ORF (rev) (1036)</b>	5`-GCG AAC ATC TTC AGG TTC TG-3`	Metabion, Martinsried

Die lyophilisierten Primer wurden in H<sub>2</sub>O ultrapure gelöst und auf 100 pmol/μl eingestellt.

## 2.10. siRNA

Die siRNA wie auch die entsprechende scRNA waren 2`-O-Ribose methyliert, damit sie immunologisch stumm blieben (Hamm, Latz et al. 2010).

siRNA/scRNA	Sequenz	Firma/Firmensitz
<b>ADAR1 siRNA</b>	5`-CGC AGA GUU CCU CAC CUG UAA U-3` 3`-UU GCG UCU CAA GGA GUG GAC AU-5`	IBA, Göttingen
<b>scrambled RNA</b>	5`-UUA UAC GAC CGC UCA CGU GCA U-3` 3`-UU AAU AUG CUG GCG AGU GCA CG-5`	IBA, Göttingen

## 2.11. Mausstämme

Mausstamm	Quelle	Referenz
<b>ADAR1f7-9</b>	Seeburg, Institut für molekulare Neurobiologie, MPI für Medizinische Forschung, Heidelberg	(Hartner, Schmittwolf et al. 2004)

<b>LysMCre-Deleter</b>	I. Förster, Institut für Genetik, Universität zu Köln, Köln	(Clausen, Burkhardt et al. 1999)
<b>CD11cCre-Deleter</b>	B. Reizis, Department of Microbiology, Columbia University Medical Center, New York, USA	(Caton, Smith-Raska et al. 2007)
<b>ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre</b>	Animal facility BMFZ, Marburg	Beschrieben in dieser Arbeit
<b>ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre</b>	Animal facility BMFZ, Marburg	Beschrieben in dieser Arbeit

## 2.12. Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Firma/Firmsitz</b>
<b>6-well Platte</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>6-well Platte (Primaria) (für humane Monozyten)</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>24-well Platte (Primaria) (für humane Monozyten)</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>Chamber-Slides</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>Deckgläschen</b>	Menzel, Braunschweig
<b>Eppendorf-Tube (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>FACS-Röhrchen</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>Fertiggele</b>	Life technologies, Carlsbad, USA
<b>Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>Filterspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)</b>	Peqlab, Erlangen
<b>Handschuhe „Noboglove“</b>	DOBA, Wetter
<b>Kanülen (24 G)</b>	BD Bioscience, Heidelberg
<b>Mikrotiterplatte (Nunc Maxisorp. 96well, Flachboden) (für ELISA)</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Mikrotiterplatte (96-well, Flachboden) (für Makrophagen)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>Mikrotiterplatte (96-well, Flachboden, Primaria) (für humane Monozyten)</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>Mikrotiterplatte (96-well, Rundboden) (für pDCs)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>Mikrotiterplatte (96-well, Spitzboden) (für PCR)</b>	Biorad, Hercules, USA

<b>Mikrotiterplatte (96well, Rundboden, Microlon, unsteril) (für ÜS)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>Nylon Sieb (70µm) „Cell Strainer“</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<b>Pasteurpipetten</b>	Assistent, Sondheim
<b>Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl 1000 µl)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>Plastikpipetten (5 ml, 10 ml)</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Plastikpipetten (25 ml)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>PVDF „Immobilon-P“ Transfermembran</b>	Millipore, Billerica, USA
<b>Spritzen „Omnifix“ (10 ml)</b>	Braun, Melsungen
<b>Tube-Streifen (clear 0,2 ml) und Deckel (clear) (für Schmelzkurvenanalyse)</b>	Biorad, Hercules, USA
<b>Whatman Papier „GB003“</b>	Schleicher + Schuell, Dasse
<b>Zellkulturschalen (3,5 cm) (für Makrophagen)</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>Zellkulturschalen (10 cm) (für Makrophagen)</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>Zellkulturschalen (10 cm)</b>	Greiner bio-one, Frickenhausen
<b>Zellkulturschalen (Nunclon, 10 cm) (für mDC-Kulturen)</b>	Thermo Scientific, Waltham, USA

### 2.13. Software

<b>Software</b>	<b>Firma/Firmensitz</b>
<b>Cell Quest Pro</b>	BD Bioscience, San Jose, USA
<b>Endnote</b>	The Thomson Corporation, Stanford, USA
<b>Flow Jo</b>	Tree Star, Ashland, USA
<b>Image Lab</b>	Biorad, Hercules, USA
<b>LAS AF</b>	Leica Microsystems, Wetzlar
<b>Microsoft Office</b>	Microsoft, Redmond, USA
<b>MultiExperiment Viewer</b>	TM4, Dana-Faber Cancer Institute, Boston USA
<b>Omega Data Analysis</b>	BMG Labtech, Ortenberg
<b>SigmaPlot 10</b>	Systat Software, Chicago, USA
<b>SoftMax Pro v5</b>	Molecular Devices, Sunnyvale, USA

## 3. Methoden

### 3.1. Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1. RNA-Isolation aus primären Zellen

Zur Isolation von RNA aus kultivierten Zellen für eine anschließende Microarray-Analyse (3.7) wurde Trizol verwendet.

- Das Zellpellet ( $5-10 \times 10^6$ ) wurde in 1 ml Trizol resuspendiert
- Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert
- Dem Ansatz wurden 0,2 ml Chloroform/1 ml Trizol hinzugesetzt und dieser anschließend 15 sec geschüttelt
- Der Ansatz wurde für 2-3 min bei RT inkubiert
- $\curvearrowright$  3000x g, 30 min, 4°C
- Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Falcon-Röhrchen transferiert
- Der transferierten Phase wurden 0,5 ml Isopropanol/1ml Trizol hinzugesetzt
- Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert
- $\curvearrowright$  3000x g, 30 min, 4°C
- Der ÜS wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol/1 ml Trizol gewaschen
- $\curvearrowright$  3000x g, 15 min, 4°C
- Der ÜS wurde abgenommen und das Pellet getrocknet
- Das Pellet wurde in 25  $\mu$ l RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert

#### 3.1.2. DNase-Verdau

- Die RNA wurde auf Eis aufgetaut
- Der RNA wurde 1  $\mu$ l DNase (10 Units)/50  $\mu$ g RNA hinzugesetzt
- Dem Ansatz wurde entsprechendes Volumen an *10x Incubation Buffer* hinzugesetzt
- Der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C inkubiert
- Die RNA wurde durch RNA-Fällung aufgereinigt (3.1.2.1)



### 3.1.2.1. RNA-Fällung

- Dem DNase-Verdau (3.1.2) wurde der gleiche Volumenanteil Chloroformisoamylalkohol hinzugesetzt und der Ansatz geschüttelt
- ↻ 10.000x g, 2 min, RT (Phasentrennung trat ein)
- Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt
- Dem Ansatz wurde der gleiche Volumenanteil Chloroform hinzugesetzt und geschüttelt
- ↻ 10.000x g, 2 min, RT
- Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt
- Dem Ansatz wurde der 2,5x Volumenanteil 100% Ethanol und 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5.0) hinzugesetzt
- Der Ansatz wurde für 1 h bei -80°C oder ü.N. bei -20°C inkubiert
- ↻ 10.000x g, 20 min, 4°C
- Der ÜS wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen
- ↻ 10.000x g, 5 min, 4°C
- Der ÜS wurde abgenommen und das Pellet getrocknet
- Das Pellet wurde in 30-50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst

### 3.1.3. DNA-Extraktion aus Mäuseschwänzen

Zur Genotypisierung der Mausstämmen wurde DNA aus der Schwanzspitze isoliert und der Genotyp für den entsprechenden Locus nach einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern anhand der entstandenen Amplifikate analysiert.

- Die Mausschwanzspitze (~ 0,4 cm) wurde in ein Eppendorf-Tube überführt (Lagerung bei -80°C möglich)
- 500 µl Lysepuffer versetzt mit 100 µg/ml Proteinase K wurden zu der Schwanzspitze gegeben
- Der Ansatz wurde ü.N. bei 56°C schüttelnd inkubiert
- Die verdauten Mäuseschwänze wurden bei 10.000x g für 20 min bei RT zentrifugiert
- ~ 450 µl des ÜS wurden in ein neues Eppendorf-Tube überführt
- Zum Fällern der DNA wurden dem ÜS 500 µl Isopropanol zugesetzt und die Lösung invertiert bis der DNA-Faden sichtbar wurde
- Der DNA-Faden wurde in 200 µl H<sub>2</sub>O u.p. überführt
- Zum Lösen der DNA wurde diese 2-3 h bei RT schüttelnd inkubiert (Lagerung bei -20°C)

Von diesem Ansatz wurden 2 µl als Template für die anschließende PCR-Reaktion eingesetzt (3.1.4).

### 3.1.4. PCR

Zur standardmäßigen Analyse von DNA wie z.B. bei der Maus-Genotypisierung wurde das „Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen)“ verwendet.

Tab. 3.1 Taq PCR-Ansatz

Substanz	Stockkonzentration	Endkonzentration
Taq Mix	2x	1x
Primer sense	10 pmol/ $\mu$ l	3,33 pmol/ $\mu$ l
Primer antisense	10 pmol/ $\mu$ l	3,33 pmol/ $\mu$ l
DNA	-	100 ng (~ 2 $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O ultrapure	-	ad 30 $\mu$ l

### 3.1.5. Gelelektrophorese von DNA oder RNA

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren verifiziert oder qualitativ kontrolliert.

- 1-2% Agarosegele wurden durch Aufkochen der Agarose in 1x TAE-Puffer (für DNA) oder 1x MOPS-Puffer (für RNA) gelöst, nach kurzem Abkühlen wurde das Gel gegossen
- Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x TAE-Puffer (für DNA) oder 1x MOPS-Puffer (für RNA) befüllt und das Gel darin platziert (für RNA Gele wurde die Gelkammer sowie der Gelschlitten zuvor mit 30%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung desinfiziert)
- Die DNA/RNA-Probe wurde mit 6x Loading-Dye versetzt und anschließend die Geltaschen beladen
- Längenstandard (0,5  $\mu$ g): „Gene Ruler 1 kb oder 100 bp DNA Ladder“
- Gellauf zunächst 10 min bei 80 V, dann 1-2 h bei 100-120 V
- Das Gel wurde im Dunkeln im Ethidiumbromidbad (1  $\mu$ g/ml in ddH<sub>2</sub>O) ~15 min gefärbt und die DNA-Banden durch UV-Belichtung sichtbar gemacht und mit einem Gel-Imager dokumentiert

### 3.1.6. Messung von DNA/RNA-Konzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde aus 1  $\mu$ l Probe am „NanoDrop“ durch die photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Durch Bildung des Quotienten 260 nm/280 nm war eine Aussage bezüglich der Reinheit der Probe möglich, wobei der Quotient 1,8 als „rein“ für DNA und 2,0 als „rein“ für RNA galt.

### 3.1.7. Herstellung von siRNA und VACV70mer

Für einige experimentelle Ansätze mussten aus einzelsträngigen, synthetischen Oligonukleotiden doppelsträngige Oligonukleotide hergestellt werden.

So wurde die, für den siRNA-vermittelten Knockdown in humanen Monozyten, benötigte siRNA und die entsprechende scrambled RNA aus RNA-Einzelsträngen hergestellt (3.4.7). Ebenso wurde das für die Stimulationen der primären Zellen (3.4.8) eingesetzte poxvirale Vaccinia Virus DNA-Motiv (VACV70mer) durch die Komplexierung zweier einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide hergestellt.

- Die Lösungen mit den einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden im selben molaren Verhältnis zueinander gemischt
- Das Gemisch wurde für 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

Zur Kontrolle des gebildeten Doppelstrangs wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (3.1.8).

### 3.1.8. Schmelzkurven von siRNA und VACV70mer

Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur trennt sich der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird ein zuvor zuge-setzter, interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (hier SYBR Gold) freigesetzt, und eine Änderung der Fluoreszenz wird registriert.

Diese Analyse wurde eingesetzt, um die Doppelsträngigkeit von aus zwei Einzelsträngen her-gestellten (3.1.7), doppelsträngigen DNA- oder RNA-Molekülen zu untersuchen. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde auf diese Weise die Doppelsträngigkeit von hergestellter siRNA und scrambled RNA für darauffolgende siRNA-vermittelte-Knockdown-Experimente (3.4.7) sowie des VACV70mer DNA-Motivs für anschließende Stimulationen (3.4.8) überprüft.

**Tab. 3.2 Ansatz zur Analyse von Schmelzkurven**

Substanz	Stockkonzentration	Endkonzentration
SYBR Gold	10.000x	1x
DNA/RNA	-	5 µg
Liposomen-Puffer/H <sub>2</sub> O u.p.	-	ad 50 µl

Tab. 3.3 Real-time Bedingungen zur Erstellung einer Schmelzkurve

Schritt	Bedingung
Schmelzkurve	23-99°C, 0,5°C increment for 10 sec, + Plate read
Kühlung	4°C

## 3.2. Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1. Herstellung von Ganzzelllysaten

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten unter denaturierenden Bedingungen wurde RIPA-Puffer wie folgt eingesetzt (alle Reagenzien und alle Arbeitsschritte auf Eis):

- 1-3x 10<sup>6</sup> Zellen wurden in 80-100 µl RIPA-Puffer aufgenommen und resuspendiert (Inhibitoren und EDTA frisch zugesetzt)

Tab. 3.4 Verwendung von Inhibitoren und EDTA für RIPA-Puffer

Substanzklasse	Substanz	Stockkonzentration	Endkonzentration
Proteinase-inhibitor	Halt Proteinase Inhibitor Cocktail	100x	1x
Phosphatase-inhibitor	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	20 mM	200 µM
	NaF	0,5 M	20 mM
Ca <sup>2+</sup> -Chelator	EDTA	0,5 M	5 mM

- Der Ansatz wurde für 30 min schüttelnd bei 4°C inkubiert
- ↻ 10.000x g, 10 min; 4°C
- Der ÜS wurde bei -80°C aufbewahrt und anschließend nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (3.2.2) für SDS-PAGE (3.2.3)- bzw. Western Blot(3.2.4)-Analysen eingesetzt

### 3.2.2. BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Zelllysate (3.2.1) wurde das „BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

### 3.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinlysaten unter denaturierenden Bedingungen, der anschließend eine Analyse entsprechender Proteine im Western Blot (3.2.4) folgte, wurden *NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gele* (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Die Proben bzw. Zelllysate (3.2.1) wurden dazu vorher mit 6x Lämmli Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 96°C aufgekocht und entsprechend ihrer Proteinkonzentration mit distinktem Volumen auf das Gel aufgetragen.

### 3.2.4. Western Blot

Die im zuvor in der SDS-PAGE (3.2.3) der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden im elektrischen Feld aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen/„geblottet“ und immobilisiert (3.2.4.1). Anschließend wurden über spezifische Antikörper verschiedene Proteine detektiert und analysiert. Dabei wurde der gebundene Primärantikörper durch einen Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Die Chemilumineszenz, die durch den Peroxidasevermittelten Umsatz von Luminol (Substrat), freigesetzt wurde, wurde mit dem „ChemiDoc XRS“ (Biorad) dokumentiert.

#### 3.2.4.1. Blotten

Das elektrophoretische Blotten erfolgte nach dem Tank-Blot System auf eine PVDF-Membran. Als Blot-Modul wurde das „Xcell II Mini Cell“-Modul (Invitrogen) verwendet. Gel und PVDF-Membran wurden entsprechend den Herstellerangaben zwischen Kathode und Anode geschichtet.

- Vor dem Zusammenbau des Blotmoduls wurde die PVDF-Membran 15 sec in Methanol getränkt und anschließend mit Schwämmen und Whatman-Papier in Transferpuffer äquilibriert, das Blot-Modul wurde nach dem Zusammenbau mit Transferpuffer befüllt
- Es wurde für 1,5-2 h bei 25 V geblottet (abhängig von der Größe des nachzuweisenden Proteins)
- Nach Beenden des Laufs wurde der Blot auseinandergebaut, die PVDF-Membran kurz in Transferpuffer gewaschen, dann 15 sec in Methanol gelegt und schließlich luftgetrocknet (Lagerung bis zur Immundetektion bei 4°C)

### 3.2.4.2. Immundetektion

- Die geblottete und getrocknete PVDF-Membran wurde zunächst zur Aktivierung für 15 sec in Methanol gelegt und anschließend für 1-2 h schwenkend in ~ 25 ml Blockpuffer (5% Milchpulver, 0,1% Tween in 1x TBS; für phospho-Proteine: 5% BSA, 0,1% Tween in 1x TBS) inkubiert
- Zum Nachweis der entsprechenden Proteine wurden die spezifischen Primärantikörper entsprechend Tab. 3.5 verdünnt (die Angaben richten sich dabei nach den Herstellerangaben) und der Blot in 10 ml Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert.
- Die PVDF-Membran wurde nach Inkubation mit dem Primärantikörper 3x 10 min mit Waschpuffer (0,1% Tween in 1x TBS) gewaschen
- Die Inkubation mit 10 ml des gemäß Tab. 3.5 verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte schwenkend für 1-2 h bei RT
- Die PVDF-Membran wurde nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper 3x 10 min mit Waschpuffer (0,1% Tween in 1x TBS) und 1x 10 min mit 1x TBS gewaschen
- Die PVDF-Membran wurde mit „RapidStep™ ECL Reagent“ (Merck Millipore) oder „SuperSignal™ West Femto“ (Pierce) als Substrat benetzt, für 1-5 min im Dunkeln inkubiert und anschließend die durch die Reaktion erfolgte Chemilumineszenz mit dem „ChemiDoc XRS“ (Biorad) dokumentiert

**Tab. 3.5** Verwendete Verdünnungen der Primärantikörper für die Western Blot-Analyse (richten sich nach den Herstellerangaben)

Primärantikörper	Verdünnung
mouse $\alpha$ -ADAR1	1:500 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -TBK1	1:1000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -pTBK1	1:1000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -IRF3	1:2000 in 5% BSA , 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -pIRF3	1:1000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -IRF7	1:500 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -pIRF7	1:500 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -STAT1	1:1000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -p(Tyr701)STAT1	1:1000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
rabbit $\alpha$ -p(Ser727)STAT1	1:1000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
mouse $\alpha$ -Aktin	1:10.000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS

**Tab. 3.6** Verwendete Verdünnungen der Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (richten sich nach den Herstellerangaben)

Sekundärantikörper	Verdünnung
donkey $\alpha$ -rabbit-HRP	1:10.000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS
goat $\alpha$ -mouse-HRP	1:10.000 in 5% MP, 0,1% Tween in 1x TBS

Die PVDF-Membran wurde nach erfolgter Immundetektion gegebenenfalls, z.B. für die Immundetektion von Aktin als Ladekontrolle, „gestrippt“, d.h. die gebundenen Antikörper abgelöst. Dazu wurde der kommerziell erhältliche „Restore™ Western Blot Stripping-Buffer“ (Thermo Scientific) verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst 2x 10 min mit 1x TBS gewaschen, anschließend in 10 ml der Strippinglösung für 30 min bei RT schwenkend inkubiert und vor wiederholter Immundetektion 2x 10 min mit 1x TBS gewaschen.

### 3.2.5. Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay (ELISA)

Mit dem ELISA wurde im Rahmen dieser Arbeit die Konzentration von verschiedenen Zytokinen in Zellkulturüberständen gemessen. Dabei handelte es sich um Sandwich-ELISAs. Bei diesen wurde ein spezifischer Antikörper in einer 96-well „Maxisorp“ (Nunc) Flachbodenplatte immobilisiert („coating“) und mit der Probe inkubiert. Durch eine Standardreihe bekannter Konzentrationen wurde eine Kalibrierungskurve zur späteren Quantifizierung der unbekannteren Proben erstellt. Die gebundenen Zytokine wurden über einen weiteren Antikörper erfasst (detection). Die Detektion erfolgte durch den Peroxidase (HRP)-vermittelten Umsatz eines Substrats. Die Peroxidase war als Enzymkonjugat an einen dritten Antikörper gekoppelt, der sich gegen den detection-Antikörper richtete oder lag an Streptavidin gebunden vor und konnte an den Biotin-markierten detection-Antikörper binden. Bei dem humanen IFN $\alpha$ -ELISA lag schon der detection-Antikörper Peroxidase-gekoppelt vor. Nach Umsatz einer Substratlösung, wurde die entstehende Farbentwicklung photometrisch erfasst und anhand der Kalibrierungskurve quantifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf diese Weise humanes und murines Interferon  $\alpha$  und  $\beta$  (hu/muIFN $\alpha$  und hu/muIFN $\beta$ ), humanes und murines Interleukin 6 (hu/muIL6) sowie murines IP10 (muIP10) in Zellkulturüberständen nachgewiesen.

Für den Nachweis von humanem IFN $\beta$  wurde das kommerziell erhältliche „VeriKine™ Human Interferon Beta ELISA Kit“ gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Für den Nachweis der anderen Zytokine sind im Folgenden die allgemeinen Arbeitsschritte angegeben. Im Anschluss sind die für die verschiedenen Zytokine spezifischen Antikörper und Standards unter Angabe der Arbeitskonzentration aufgelistet.

Die 96-well Platten wurden nach jedem Inkubationsschritt 3x mit Waschpuffer (0,05% Tween in 1x PBS; 250 µl/well) gewaschen.

- Die 96-well Platte wurde mit coating-Antikörper-Lösung (in PBS<sup>def</sup>) (50 µl/well) beschichtet und ü.N. bei 4°C inkubiert
- Die 96-well Platte wurde mit 1%iger BSA-Lösung (1% BSA, 0,05% Tween in 1x PBS) (250 µl/well) für 1 h bei RT geblockt
- Für jedes Zytokin wurde ein spezifischer Standard in logarithmischer Verdünnungsreihe (verdünnt in BSA-Blockpuffer) angesetzt und in Doppelbestimmung auf die 96-well Platte übertragen (50 µl/well). Die Proben bzw. Zellkulturüberstände wurden entsprechend verdünnt und in Doppel- oder Dreifachbestimmung auf die 96-well Platte übertragen (50 µl/well). Standard und Proben wurden für 1-2 h bei RT inkubiert
- Die 96-well Platte wurde mit detection-Antikörper-Lösung (verdünnt in BSA-Blockpuffer) (50µl/well) für 1-2h bei RT inkubiert
- Die 96-well Platte wurde mit Enzymkonjugat-Lösung (verdünnt in BSA-Blockpuffer) (50 µl/well) für 30 min-1 h bei RT inkubiert
- Der 96-well Platte wurde Substratlösung (1 mg/ml OPD in Substratpuffer mit 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt) hinzugegeben (50 µl/well)
- Nach ausreichendem Farbumschlag wurde die Reaktion mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung abgestoppt (25 µl/well)

Die Analyse erfolgte mit einem ELISA-Plattenphotometer bei 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm und wurde mit dem Programm „SoftmaxPro V5“ ausgewertet.

#### huIFNα

Coating-Antikörper: anti-human IFN-alpha Coating Antibody [0,1 µg/ml]

1. Standard: humanes IFN-alpha [4 ng/ml]

Detection-Antikörper/

Enzymkonjugat: HRP-Conjugate anti-human IFN-alpha monoclonal antibody (1:1000)

#### huIL6

Coating-Antikörper: rat anti human IL6 [0,5 µg/ml]

1. Standard: recombinant human Interleukin 6 (rh IL-6) [10 ng/ml]

Detection-Antikörper: biotinylated rat anti human IL6 [0,5 µg/ml]

Enzymkonjugat: Streptavidin-POD [0,1 U/ml]

#### muIFNα

Coating-Antikörper: rat monoclonal anti-mouse Interferon alpha (RMMA-1) [1 µg/ml]

1. Standard: murines IFN-alpha [500 U/ml]

Detection-Antikörper: rabbit polyclonal anti-mouse Interferon alpha [0,94 µg/ml]



Enzymkonjugat: Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) [0,16 µg/ml]

#### **muIFNβ** (Inkubationsschritte dunkel bei 100%humid)

Coating-Antikörper: rabbit polyclonal antibody anti-mouse Interferon beta [0,5 µg/ml]

1. Standard: mouse Interferon beta [500 U/ml]

Detection-Antikörper: rat monoclonal anti-mouse Interferon beta [2,5 µg/ml]

Enzymkonjugat: Rabbit polyclonal Secondary Antibody to Rat IgG - H&L (HRP) [2 µg/ml]

#### **muIL6**

Coating-Antikörper: Mouse IL-6 MAb (Clone MP5-20F3) [1 µg/ml]

1. Standard: recombinant mouse IL6 [10 ng/ml]

Detection-Antikörper: Mouse IL-6 Biotinylated Affinity Purified PAb [0,1 µg/ml]

Enzymkonjugat: Streptavidin-POD [0,1 U/ml]

#### **muIP10**

Coating-Antikörper: rabbit anti-mIP-10 [0,5 µg/ml]

1. Standard: recombinant mIP-10 [4 ng/ml]

Detection-Antikörper: biotinylated rabbit anti-mIP-10 [0,25 µg/ml]

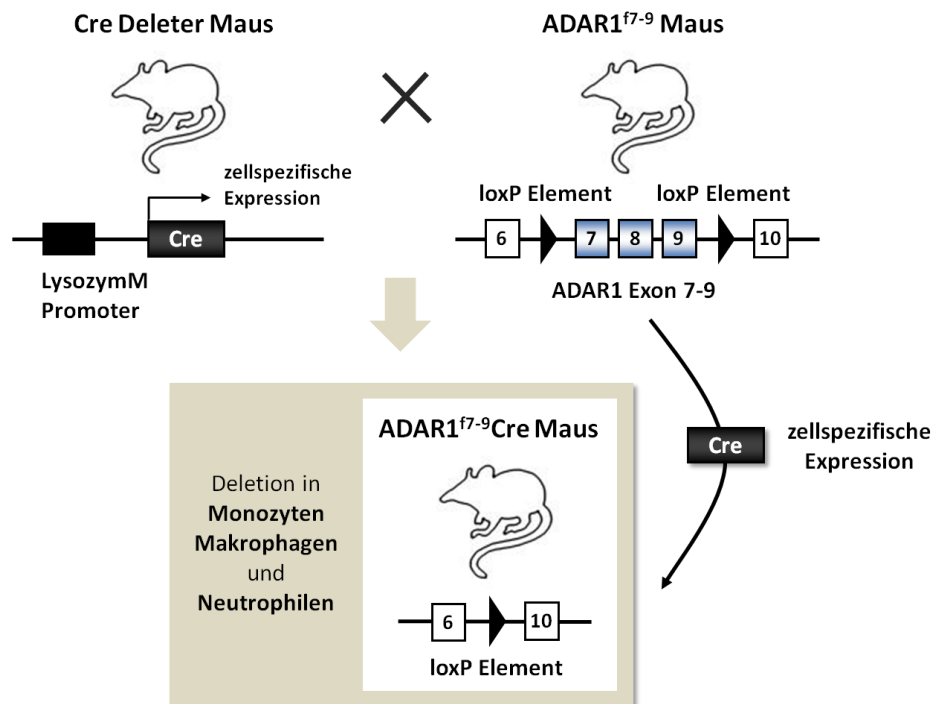
Enzymkonjugat: Streptavidin-POD [0,1 U/ml]

### **3.3. Maus-Typisierung und -Präparation**

#### **3.3.1. ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Maus**

Um die immunologische Funktion von ADAR1 zu untersuchen, wurde eine Mauslinie etabliert, welche eine ADAR1-Defizienz ausschließlich in myeloiden Zellen entwickelte. Diese Defizienz wurde durch den Einsatz des Cre/loxP-Rekombinationssystems generiert (Sauer and Henderson 1988). Hierzu wurde die Mauslinie ADAR1<sup>f7-9</sup> (Hartner, Schmittwolf et al. 2004) mit der Mauslinie LysMCre (Clausen, Burkhardt et al. 1999) gekreuzt. Durch diese Kreuzung wurde der neue Mausstamm ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre generiert. Da das *Cre*-Gen unter der Kontrolle des Lysozym M-Promotors stand, wurde es ausschließlich in den myeloiden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und führte in einer geflochtenen ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Maus zur Deletion der Exons 7-9 des *ADAR1*-Gens, die einen Teil der dsRBDs und die Deaminase-Domäne umfassen. Die doppel-mutanten Nachkommen der F1-Generation, die sowohl für den ADAR1-, als auch für den LysMCre-Status verändert waren, wurden erneut miteinander verpaart, so dass in der F2-Generation die kombinatorisch möglichen sechs Genotypen gemäß den Mendelschen Regeln auftraten (Daten nicht gezeigt). Diese umfassten in Bezug auf den Flox-Status des *ADAR1*-Gens wildtyp, heterozygote und homozygote Mäuse (ADAR1<sup>+/+</sup>, ADAR1<sup>+/f7-9</sup>, ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>), welche zusätzlich positiv oder negativ für das *Cre*-

Transgen ( $Cre^+$  oder  $Cre^-$ ) waren. Phänotypisch zeigten die Mäuse keine Auffälligkeiten. Durch die Generierung dieser Mauslinie war es möglich aus der homozygot-gefloxten,  $Cre$ -positiven Maus  $ADAR1$ -defiziente Immunzellen zu isolieren und im Vergleich mit  $ADAR1$ -kompetenten Zellen der anderen Genotypen zu analysieren. Die Mäuse wurden im Alter von 8-13 Wochen für die Experimente eingesetzt. Für die Experimente stammten die zu vergleichenden Mäuse überwiegend aus derselben Verpaarung, waren gleichen Alters sowie gleichen, vornehmlich weiblichen Geschlechtes.

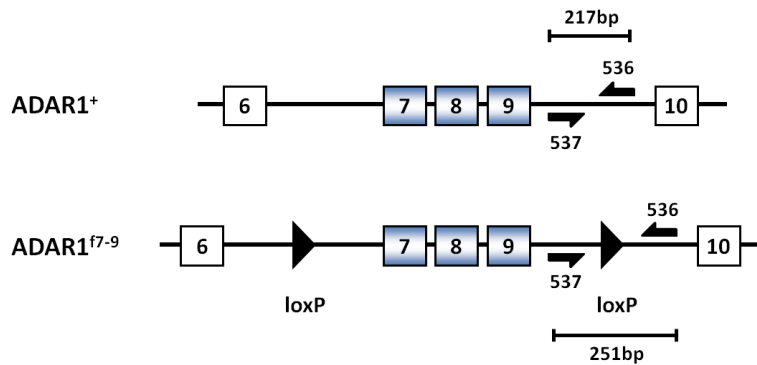


**Abb. 3.1 Generierung der  $ADAR1^{f7-9}/LysMCre$ -Maus.** Kreuzung der  $LysMCre$ -Maus mit der gefloxten  $ADAR1^{f7-9}$ -Maus. Abhängig vom Genotyp der Nachkommen kam es in  $Cre$ -positiven,  $ADAR1$ -gefloxten Mäusen zur konditionalen Deletion von Exon 7-9 des  $ADAR1$ -Gens in myeloiden Zellen.

Zur Ermittlung des Genotyps der jeweiligen Nachkommen wurde die aus den Schwanzspitzen isolierte DNA der Mäuse (3.1.3) in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern (3.1.4) umgesetzt und die resultierenden PCR-Produkte analysiert (3.1.5).

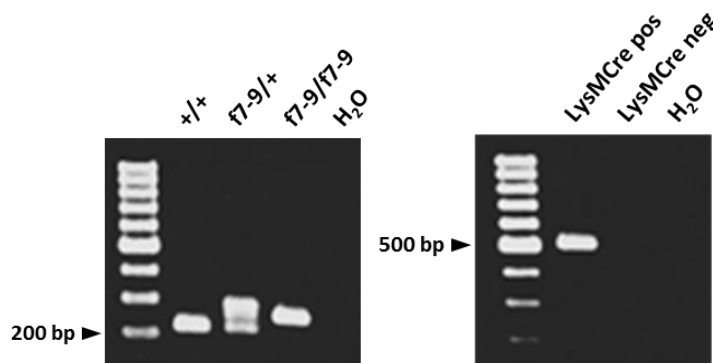
Zur Erfassung der  $Cre$ -Geninsertion wurde ein Primer-Paar gewählt, dessen Zielsequenz im  $Cre$ -Gen lag und daher nur bei  $Cre$ -positiven Mäusen zu einem PCR-Produkt von 580 bp führte (Primer-Paar: 672 und 673). Von der DNA  $Cre$ -negativer Mäuse wurde kein PCR-Fragment in dieser Reaktion amplifiziert. Die Zielsequenzen dieses Primer-Paars für die Analyse des Flox-Status (536 und 537) waren intronisch gewählt, wobei das PCR-Produkt das  $loxP$ -Element aufwärts des Exon 9 überspannte (Abb. 3.2). Während das resultierende PCR-Fragment im Wildtyp 217 bp umfasste (Abb. 3.2, oben), wurde es im gefloxten  $ADAR1$ -Allel entsprechend der

Größe des loxP-Elements um 34 bp auf 251 bp vergrößert (Abb. 3.2, unten). Wurde in einer solchen PCR-Reaktion sowohl ein Fragment von 217 bp als auch von 251 bp detektiert, lag ein heterozygoter Flox-Status ( $ADAR1^{+/f7-9}$ ) vor, während bei einem wildtyp ( $ADAR1^{+/+}$ ; 217 bp Bande) oder homozygoten Genotyp ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}$ , 251 bp Bande) eine singuläre Bande auftrat.



**Abb. 3.2 Strategie der Genotypisierung des Flox-Status.** Das Primer-Paar 537 und 536 flankierte das rechte loxP-Element (schwarzes Dreieck) des geflochten *ADAR1*-Gens. Daher vergrößerte sich das PCR-Produkt im geflochten Allel (unten) um die Größe des loxP-Elements (=34 bp) auf 251 bp im Vergleich zum wildtyp Allel mit nur 217 bp (oben)

Abb. 3.3 zeigt exemplarisch die PCR-Ergebnisse sowohl zur Untersuchung des *ADAR1*-Flox-Status (A) als auch des *LysMCre*-Status (B).



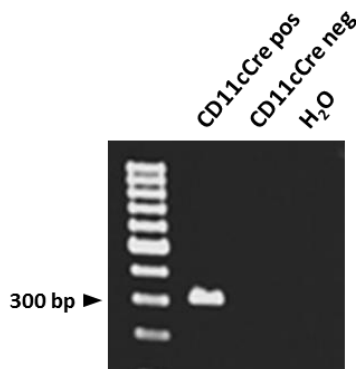
**Abb. 3.3 PCR zur Untersuchung *ADAR1*-Flox-Status (A) und des *LysMCre*-Status (B).** +/+ : *ADAR1* wildtyp; f7-9/+ : *ADAR1* heterozygot gefloxt; f7-9/f7-9 : *ADAR1* homozygot gefloxt; *LysMCre* pos: *LysMCre*-positiv; *LysMCre* neg: *LysMCre*-negativ; H<sub>2</sub>O: Wasser-Kontrolle (keine DNA)

### 3.3.2. *ADAR1*<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Maus

Das *ADAR1*<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Mausmodell wurde in Analogie zu dem *ADAR1*<sup>f7-9</sup>/*LysMCre*-Mausmodell (3.3.1) etabliert. Anstelle des *LysMCre*-Deleter-Mausstamms wurde hier ein CD11cCre-Deleter-Stamm eingesetzt (Caton, Smith-Raska et al. 2007), der mit dem beschriebenen geflochten *ADAR1*-Mausstamm verpaart wurde. Die CD11cCre-Expression führte in der *ADAR1*<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Maus ausschließlich in dendritischen Zellen (DCs), natürlichen Killerzellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und einigen Lymphozyten zur Deletion der ent-

sprechenden Exons des *ADAR1*-Gens (Cabanas and Sanchez-Madrid 1999). Auch hier wurden in der F2-Generation die kombinatorisch möglichen sechs Genotypen gemäß der Mendel'schen Regeln erzielt (Daten nicht gezeigt). Diese umfassten in Bezug auf den Flox-Status des *ADAR1*-Gens wildtyp, heterozygote und homozygote Mäuse ( $ADAR1^{+/+}$ ,  $ADAR1^{+/f7-9}$ ,  $ADAR1^{f7-9/f7-9}$ ), welche zusätzlich positiv oder negativ für das *Cre*-Transgen ( $Cre^+$  oder  $Cre^-$ ) waren. Auch diese Mäuse wiesen keine phänotypischen Auffälligkeiten auf. Durch die Generierung dieser Mauslinie war es möglich, aus der homozygot geflochten, *Cre*-positiven Maus *ADAR1*-defiziente Immunzellen zu isolieren und im Vergleich mit *ADAR1*-kompetenten Zellen zu analysieren. Gemäß dem experimentellen Ansatz im  $ADAR1^{f7-9}/LysMCre$ -Mausmodell wurden Mäuse im Alter von 8-13 Wochen für die Experimente eingesetzt. Für die Experimente stammten die zu vergleichenden Mäuse überwiegend aus derselben Verpaarung, waren gleichen Alters sowie gleichen, vornehmlich weiblichen Geschlechtes.

Die PCR-Strategie zur Genotypisierung des *ADAR1*-Flox-Status entsprach der für das  $ADAR1^{f7-9}/LysMCre$ -Mausmodell beschriebenen Strategie (3.3.1 und Abb. 3.2). Zur Erfassung der *Cre*-Geninsertion wurde ein Primer-Paar gewählt, dessen Zielsequenz im *Cre*-Gen lag und daher nur bei *Cre*-positiven Mäusen zu einem PCR-Produkt von 300 bp führte (Primer-Paar: 1035 und 1036). Von der DNA *Cre*-negativer Mäuse wurde kein PCR-Fragment in dieser Reaktion amplifiziert. Abb. 3.4 zeigt exemplarisch die PCR-Ergebnisse zur Untersuchung des *Cre*-Status. Exemplarische Daten bezüglich des Flox-Status wurden in Abb. 3.3 gezeigt.



**Abb. 3.4 PCR zur Untersuchung des CD11cCre-Status.** CD11cCre pos: CD11cCre-positiv; CD11cCre neg: CD11cCre-negativ; H<sub>2</sub>O: Wasser-Kontrolle (keine DNA)

### 3.3.3. Präparation des Knochenmarks

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Das Präparierbesteck wurde in 70% Ethanol bereitgestellt, alle Medien und Proben wurden auf Eis aufbewahrt und steril behandelt.

- Femur und Tibia wurden präpariert und in eine Petrischale überführt

- Der Knochenschaft wurde unter der Sterilbank eröffnet und das Knochenmark mit 10 ml Medium in eine neue Petrischale gespült (10 ml Spritze und 24 G Kanüle)
- Mit einer 10 ml Pipette und Pipettierhilfe wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und über einen 70 µm Nylonstrainer in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt
- ↻ 300x g, 7 min, 4°C
- Das Zellpellet wurde zur Erythrozytenlyse in 3 ml Rote-Blut-Zell-Lyse (RBL)-Puffer resuspendiert und für 7 min bei RT inkubiert
- Zum Abstoppen der Lyse wurden 5 ml Medium hinzugefügt
- ↻ 300x g, 7 min, 4°C
- Das Zellpellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.4. Arbeit mit primären Zellen

Die Arbeiten mit primären Zellen wurden an einer Sterilbank der Sicherheitsklasse 2 durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei den entsprechenden Bedingungen kultiviert. Alle Materialien und Geräte wurden, bevor sie zum Einsatz kamen, gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert.

#### 3.4.1. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen in entsprechendem Medium resuspendiert und ein Aliquot mit Trypanblau zu einer Endkonzentration von 0,25% versetzt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in die Kammer überführt und die Zellen in den vier äußeren Eckquadraten gezählt. Der Mittelwert der gezählten Zellen aus den ausgezählten Quadraten ergab mit Hilfe folgender Formel die Zellkonzentration bzw. Zellzahl:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{\text{ml}}$$

#### 3.4.2. Generierung von Makrophagen mittels M-CSF

Mit Hilfe des Wachstums- und Differenzierungsfaktors M-CSF (macrophage colony stimulating factor) wurden *in vitro* Makrophagen aus dem Knochenmark generiert (Stanley, Chen et al. 1978).

##### Tag 0 Anlegen einer M-CSF-Kultur

- Das Knochenmark (KM) wurde präpariert (3.3.3)

- $5 \times 10^6$  KM Zellen/10 ml RPMI supp. (MO) wurden in eine 10 cm-Kulturschale (Becton 353003) ausgesät und M-CSF zu einer Endkonzentration von 20 ng/ml hinzugesetzt
- Die Zellen wurden für 5 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert

### Tag 3 M-CSF-Zugabe

- Den Kulturen wurde erneut 20 ng/ml M-CSF hinzugesetzt

### Tag 5 Zellernte

- Das Medium der M-CSF-Kulturen wurde abgesaugt
- Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS<sup>def</sup> gewaschen
- Die adhärennten Zellen wurden durch Inkubation mit 5 ml 3% FCS, 2 mM EDTA in PBS<sup>def</sup> für 15 min bei 37°C abgelöst und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt
- ↻ 300x g, 7 min, 4°C
- Das Zellpellet wurde in entsprechendem Volumen RPMI supp. (MO) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.4.1)

Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Makrophagen wurde durchflusszytometrisch (3.5) über das Oberflächenmolekül F4/80, einem Pan-Makrophagenmarker, kontrolliert.

### 3.4.3. Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen mittels Flt3L

Mit Hilfe des Wachstums- und Differenzierungsfaktors Flt3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) wurden *in vitro* plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) aus dem Knochenmark generiert (Brasel, De Smedt et al. 2000).

#### Tag 0 Anlegen der Flt3L-Kultur

- Das Knochenmark (KM) wurde präpariert (3.3.3)
- $15 \times 10^6$  KM Zellen/ 10 ml OptiMEM supp. (pDCs) wurden in eine 10 cm-Kulturschale (Primaria) ausgesät und Flt3L (aus Überstand einer stabil Flt3L-exprimierenden CHO-Zelllinie gewonnen) abhängig von der Charge 1:250-1:500 zugesetzt
- Die Zellen wurden für 8 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert

#### Tag 8 Zellernte

- Die Suspensionszellen wurden geerntet
- ↻ 300x g, 7 min, 4°C
- Das Zellpellet wurde in entsprechendem Volumen OptiMEM supp. (pDCs) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.4.1)

Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu pDCs wurde durchflusszytometrisch (3.5) über die Expression der Oberflächenmoleküle CD11c, einem DC Marker, und B220 kontrolliert.

### 3.4.4. Generierung von myeloiden dendritischen Zellen mittels GM-CSF

Mit Hilfe des Wachstums- und Differenzierungsfaktors GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) wurden *in vitro* myeloide dendritische Zellen (mDCs) aus dem Knochenmark generiert (Inaba, Inaba et al. 1992).

#### Tag 0 Anlegen der GM-CSF-Kultur

- Das Knochenmark (KM) wurde präpariert (3.3.3)
- $3-6 \times 10^6$  KM-Zellen/ 10 ml RPMI comp. (mDCs) wurden in eine 10 cm-Kulturschale (Nunc-Ion) ausgesät und abhängig von der Charge mit 5-15% GM-CSF-haltigem Kulturüberstand (aus einer stabil GM-CSF exprimierenden X6310 Zelllinie) versetzt
- Die Zellen wurden für 7 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert

#### Tag 3 GM-CSF-Zugabe

- Abhängig von der Charge wurde den Kulturen erneut GM-CSF-haltiger Überstand zugesetzt

#### Tag 6 GM-CSF-Zugabe (siehe Tag 3)

#### Tag 7 Zellernte

- Die Suspensionszellen wurden geerntet
- $\cup$  300x g, 7min, 4°C
- Das Zellpellet wurde in entsprechendem Volumen RPMI supp. (mDCs) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.4.1)

Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu mDCs wurde durchflusszytometrisch (3.5) über die Expression des Oberflächenmoleküls CD11c, einem DC-Marker, kontrolliert.

### 3.4.5. Isolation von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) aus „Buffy coats“

Frische „Buffy coat“-Präparationen aus peripherem Venenblut gesunder Blutspender wurden aus der Abteilung für Transfusionsmedizin des Uniklinikum Marburg/Gießen verwendet. „Buffy coats“ entstehen bei der Separation bestimmter Blutzellen (Herstellung von Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten) und enthalten neben den Granulozyten auch hochangereichert periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC, peripheral blood mononuclear cells). Die Präparation der PBMC-Fraktion erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode, wobei aufgrund von Dichteunterschieden mononukleäre Zellen von anderen Blutzellen getrennt wurden. Die PBMC-Fraktion enthält neben Monozyten auch B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen.

- 13 ml des Ficoll-Mediums (Dichte: 1,079 g/ml) wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt (2 Falcon-Röhrchen pro Spender)
- Der Inhalt eines „Buffy coats“ wurde auf zwei weitere 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt (maximal 25 ml pro 50 ml Falcon-Röhrchen) und anschließend vorsichtig auf das Ficoll-Medium geschichtet
- $\curvearrowright$  670x g, 30 min, RT, ohne Bremse
- Die Plasmaschicht wurde abgenommen und verworfen
- Die Leukozytenfraktion wurde abgenommen, auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und mit kaltem PBS<sup>def</sup> auf 50 ml aufgefüllt
- $\curvearrowright$  350x g, 10 min, 4°C, ohne Bremse
- Die Zellpellets wurden resuspendiert, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt und auf 50 ml mit kaltem PBS<sup>def</sup> aufgefüllt
- $\curvearrowright$  350x g, 10 min, 4°C, ohne Bremse
- Das Zellpellet wurde in entsprechendem Volumen RPMI supp. (Monos) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.4.1)
- Aus den isolierten PBMCs wurden anschließend humane Monozyten aufgereinigt (3.4.6)

### 3.4.6. Isolation humaner Monozyten

Die Elutriation bietet die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Größe und Dichte zu trennen. Dies wird möglich durch die Erzeugung zweier entgegengesetzt wirkender Kräfte. Durch die Rotation der Zentrifuge wird eine Sedimentationskraft hervorgerufen (Zentrifugalkraft), auf die ein von einer Pumpe erzeugter, kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom in entgegengesetzter Richtung wirkt (Zentripetalkraft).

Jede Zelle in der Separationskammer wandert in eine Zone, in der ein Gleichgewicht zwischen ihrer Sedimentationsrate und der durch die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums erzeugten Zentripetalkraft besteht. Innerhalb der Separationskammer wird durch ihre spezielle Geometrie ein Fließgeschwindigkeitsgradient erzeugt. Hierdurch wird es möglich, Zellen mit verschiedenen Sedimentationsraten in Suspension zu halten. Durch die schrittweise Erhöhung der Flüssigkeitsrate und der dadurch hervorgerufenen Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums oder durch die Verringerung der Rotordrehzahl können schrittweise relativ homogene Zellpopulationen aus der Kammer ausgespült werden. Jede folgende Separation besteht aus größeren Zellen als die vorhergehende Fraktion.



Zwischen Flüssigkeitsrate und Rotordrehzahl besteht folgender Zusammenhang:

$$F = X \times D^2 \times (RPM \times 10^3)^2$$

$F$  = Flüssigkeitsrate in ml/min

$X$  = Kammerfaktor : 0,0511

$D$  = Zelldurchmesser in mm

$RPM$  = Rotordrehungen pro min

Bei Verwendung einer konstanten Rotordrehzahl wird es mit Hilfe dieser Formel möglich, die Größe der Zellen zu berechnen, die bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums aus der Kammer ausgespült werden.

Die Durchführung der Elutriation erfolgte bei der konstanten Rotorgeschwindigkeit von 3000 Umdrehungen pro Minute und bei 4°C. Zum Separieren der Zellen wurde die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums schrittweise erhöht. Als Elutriationsmedium wurde 0,1% EDTA, 0,1% AB-Serum in PBS<sup>def</sup> verwendet. Pro Elutriationsschritt wurden 300-500x 10<sup>6</sup> PBMCs eingesetzt.

- Die aufgereinigten PBMCs (3.4.5) wurden in 35 ml RPMI supp. (Monos) aufgenommen und mit einer Pumpleistung von 7 ml/min in die Separationskammer eingezogen
- Es wurde für 5 min bei einer Pumpleistung von 15 ml/min gespült, um Thrombozyten und Erythrozyten zu entfernen
- Die Fließgeschwindigkeit wurde schrittweise bis zu einer Pumpleistung von 28,5 ml/min erhöht, um Lymphozyten und NK-Zellen auszuwaschen
- Die Monozytenfraktion wurde in 100 ml Elutriationsmedium durch Erhöhung der Pumpleistung auf 36 ml/min separiert
- ↻ 350x g, 10min, 4°C
- Das Zellpellet wurde in entsprechenden Volumen RPMI supp. (Monos) resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.4.1)

### 3.4.7. siRNA-vermittelter ADAR1-Knockdown in humanen Monozyten

Humane Monozyten, die durch PBMC-Isolierung aus „Buffy coats“ (3.4.5) und anschließende Elutriation (3.4.6) aufgereinigt wurden, wurden im Anschluss für siRNA (small interfering RNA)-vermittelte Knockdown-Experimente eingesetzt. Dazu wurde das „*Human Monocyte Nucleofector Kit* (AMAXA/Lonza)“ eingesetzt. Die siRNA, wie auch die entsprechende scRNA, waren 2'-O-Ribose methyliert, damit sie immunologisch stumm blieben (Hamm, Latz et al. 2010).

- 3,5 ml RPMI supp. (Monos) wurden pro well einer 6-well Platte (Primaria) vorgelegt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit äquilibriert
- Monozyten wurden  $\cup$  310x g, 7 min, 4°C
- Das Zellpellet wurde in 10-25 ml PBS<sup>def</sup> mit 0,1% AB-Serum aufgenommen
- $\cup$  310x g, 7 min, RT
- Pro Nukleofektionsansatz wurden  $8 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l *Nucleofector Solution* (supplementiert, RT) aufgenommen
- Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Tube mit 100 pmol vorgelegter siRNA überführt und vorsichtig gemischt und die Zell/DNA-Suspension wurde kurz (~1 min) bei RT inkubiert
- Die Zell/DNA-Suspension wurde luftblasenfrei in eine Küvette überführt und nach Herstellerangaben mit dem *Nucleofector Device II* im Programm Y-001 nukleofektiert
- 500  $\mu$ l des äquilibrierten RPMI supp. (Monos) wurden zu der Zellsuspension in die Küvette gegeben
- Die Zellsuspension wurde mit beigelegter Pipette vorsichtig aus der Küvette in ein well der vorbereiteten 6-well Platte (Primaria, finales Volumen 3,5 ml/well) überführt (wiederholte Aspiration wurde vermieden)
- Den Zellen wurde rhGM-CSF zu einer finalen Konzentration von 20 ng/ml zugegeben und für zwei Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert

### 3.4.8. Stimulation von primären Zellen

Humane elutrierte Monozyten (3.4.6), murine M-CSF-generierte Makrophagen (3.4.2), murine Flt3L-generierte plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) (3.4.3), sowie murine GM-CSF-generierte myeloide dendritische Zellen (mDCs) (3.4.4) wurden mit verschiedenen PRR-Liganden stimuliert. Die Überstände wurden mittels ELISA (3.2.5) auf die enthaltenen Zytokinmengen untersucht und/oder die Zellen lysiert (3.2.1) und mittels Western Blot (3.2.4) auf die Expression bestimmter Signalmoleküle überprüft. Humanen Monozyten sowie murinen Makrophagen wurden zur Kostimulation rekombinantes GM-CSF zu einer Endkonzentration von 20 ng/ml hinzugesetzt.

#### Stimulation mit Lipofektamin-komplexierten PRR-Liganden

- Eine 2x konzentrierte Stimulus-Lösung pro Ansatz wurde vorbereitet, die im gleichen Volumenverhältnis der Zellsuspension hinzugesetzt wurde
- Der Stimulus wurde entsprechend in OptiMEM verdünnt
- Der Stimulus-Lösung wurde in gleichem Volumen Lipofektamin-Lösung zugesetzt und der Ansatz zur Komplexbildung 10 min bei RT inkubiert

Lipofektamin-Lösung: Lipofektamin wurde in OptiMEM verdünnt, wobei pro 1 µg eingesetzter Nukleinsäure 1 µl Lipofektamin eingesetzt wurde

- Der Komplexierungsreaktion wurde der gleiche Volumenanteil des entsprechenden Kulturmediums zugegeben

#### Stimulation mit nicht-komplexierten PRR-Liganden oder Viren

- Eine 2x konzentrierte Stimulus-Lösung pro Ansatz wurde vorbereitet, die im gleichen Volumenverhältnis der Zellsuspension hinzugesetzt wurde
- Der Stimulus/Virus wurde in entsprechendem Kulturmedium verdünnt

Die stimulierten Zellen wurden für die indizierten Zeitpunkte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### **3.4.9. MTT-Test muriner M-CSF-generierter Makrophagen**

Das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) wird in lebenden Zellen durch die enzymatischen Aktivitäten mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazanderivat reduziert. Die optische Dichte des blauen Farbstoffes ist dabei direkt proportional zur Anzahl der Zellen und korreliert mit deren Stoffwechselaktivität. Der MTT-Test kann deshalb zur Bestimmung der Zellzahl bzw. dem Proliferationsverhalten von Zellen nach einer entsprechenden Stimulation eingesetzt werden.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf den MTT-Test im 96-well-Format.

- Der Kulturüberstand wurde von den stimulierten Zellen abgenommen
- Den kultivierten Zellen wurden 200 µl RPMI supp. (MO) versetzt mit 125 µg/ml MTT zugegeben
- Der Ansatz wurde bei 37°C für 1-3 h inkubiert bis eine ausreichende Blaufärbung eingesetzt hatte
- Der Überstand wurde abgesaugt, 100 µl Isoprop-HCl [0.04 M] pro well zugesetzt und der gebildete Farbstoff durch Resuspendieren gelöst

Die Absorption wurde mit einem Plattenphotometer bei 570 nm gemessen (Referenzwellenlänge: 630 nm)

### **3.5. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie, auch als FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Analyse bezeichnet, ist eine Methode zur Analyse von Zellen bezüglich ihrer Größe und Granularität. Außerdem sind quantitative Analysen von Zelloberflächenmarkern sowie intrazellulären Proteinen mit Hilfe Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper möglich. Die Zellen werden dabei durch

eine Kapillare angesaugt und passieren verschiedene Detektoren und Laser spezifischer Wellenlänge. Auf der Basis von Licht-Emission und -Streuung können dann Parameter wie Fluoreszenz, Fluoreszenzstärke und Morphologie einer Zelle gemessen werden. Der forward scatter (FSC) erlaubt dabei Rückschlüsse auf die Zellgröße, während der sideward scatter (SSC) Auskunft über die Granularität einer Zelle gibt.

### 3.5.1. Oberflächenfärbung für Durchflusszytometrie

- 100.000-500.000 Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen
- $\cup$  300x g, 7 min, 4°C
- Das Zellpellet wurde in 30  $\mu$ l Fc-Block (112  $\mu$ g/ml Fc-Block in FACS-Puffer) resuspendiert
- Der Ansatz wurde für 7 min bei 4°C inkubiert
- 30  $\mu$ l Ak-Mix (in FACS-Puffer verdünnt, die entsprechenden finalen Arbeitskonzentrationen der Antikörper sind in Tab. 3.7 angegeben) wurden zu den Zellen gegeben und gemischt
- Der Ansatz wurde für 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert
- Die Zellen wurden 2x mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 150-200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen

Die Messung erfolgte mit dem „FACS Calibur“ Durchflusszytometer unter Verwendung der Software „CellQuest“ (BD). Die Daten wurden anschließend mit dem Auswertungsprogramm „FlowJo 8.1.1“ analysiert.

**Tab. 3.7 Arbeitskonzentrationen verwendeter FACS-Antikörper**

Antikörper	Konjugiertes Fluorchrom	Arbeitskonzentration
rat $\alpha$ mouse <b>F4/80</b> (M $\phi$ )	PE	2,5 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>F4/80</b> (M $\phi$ )	FITC	2,5 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>CD11b</b> (M $\phi$ )	FITC	1 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>CD80</b> (M $\phi$ )	FITC	2,5 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>CD86</b> (M $\phi$ )	PE	1 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>CD206</b> (M $\phi$ )	APC	1 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>Sca1</b> (M $\phi$ )	APC	0,2 $\mu$ g/ml
<b>Sca1 Isotypenkontrolle</b> (M $\phi$ )	APC	0,2 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>CD11c</b> (pDC)	PE	0.5 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>B220</b> (pDC)	FITC	1,25 $\mu$ g/ml
rat $\alpha$ mouse <b>CD11c</b> (mDC)	APC	0,4 $\mu$ g/ml

rat $\alpha$ mouse <b>MHCII</b> (mDC)	PE	0,2 $\mu\text{g/ml}$
mouse $\alpha$ human <b>BDCA-2</b> (Monos)	FITC	0,5 $\mu\text{g/ml}$
mouse $\alpha$ human <b>CD14</b> (Monos)	PE	0,5 $\mu\text{g/ml}$
<b>TO-PRO-3 Iodid</b>	-	50 nM

M $\phi$ : Makrophagen, mDCs: myeloide dendritische Zellen, pDCs: plasmazytoide dendritische Zellen, Monos: humane Monozyten

### 3.6. Immunfluoreszenz

Murine M-CSF-generierte Makrophagen (4.3.1.1) wurden für die Immunfluoreszenzfärbungen in Chamber-Slides (100.000 Zellen/Chamber/200  $\mu\text{l}$ ) ausgesät und nach entsprechender Stimulation (3.4.8) gefärbt.

- Die Zellen wurden mit 2%iger Paraformaldehyd-Lösung für 20 min bei RT fixiert
- Die Zellen wurden 2x mit PBS<sup>def</sup> gewaschen
- Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit Saponin-Puffer (1% BSA, 0,5% Saponin in PBS<sup>def</sup>)
- Den Zellen wurden pro Chamber 100  $\mu\text{l}$  der 1. AK-Lösung (in Saponin-Puffer verdünnt; die entsprechenden Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind in Tab. 3.8 angegeben) hinzugesetzt
- Der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert
- Die Zellen wurden 4x mit Saponin-Puffer gewaschen
- Den Zellen wurden pro Chamber 100  $\mu\text{l}$  der 2. AK-Lösung versetzt mit DAPI (in Saponin-Puffer verdünnt, die entsprechenden Verdünnungen der verwendeten Antikörper bzw. von DAPI sind in Tab. 3.9 angegeben) zugegeben
- Der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert
- Die Zellen wurden 4x mit Saponin-Puffer gewaschen
- Die Zellen wurden 1x mit PBS<sup>def</sup> gewaschen
- Die Zellen wurden mit Mowiol eingedeckelt

Die Aufnahme und Analyse der Immunfluoreszenz erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop „TCS Sp5“ (Leica).

**Tab. 3.8 Verdünnungen verwendeter Primärantikörper für Immunfluoreszenz**

Primärantikörper	Verdünnung
rabbit $\alpha$ -IRF3	1:200 in 1% BSA, 0,5% Saponin in PBS <sup>def</sup>
rabbit $\alpha$ -IRF7	1:200 in 1% BSA, 0,5% Saponin in PBS <sup>def</sup>

Tab. 3.9 Verdünnungen verwendeter Sekundärantikörper bzw. von DAPI für Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper/DAPI	Verdünnung
donkey $\alpha$ -rabbit-Alexa546	1:200 in 1% BSA, 0,5% Saponin in PBS <sup>def</sup>
DAPI	1:10.000 in 1% BSA, 0,5% Saponin in PBS <sup>def</sup>

### 3.7. Microarray

Für die Microarray-Analyse wurde RNA aus Zellen isoliert (3.1.1) und anschließend DNase verdaut (3.1.2). Die RNA wurde qualitativ mittels Gelelektrophorese (3.1.5) und anhand des Quotienten 260 nm/280 nm aus der Absorptionmessung zur Konzentrationsbestimmung überprüft (3.1.6). 1  $\mu$ g der RNA wurde an die „*Expression Core Facility*“ des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der TU München unter Leitung von Prof. Dr. med. D. H. Busch geschickt.

Die RNA-Proben wurden mittels eines „*mouse Gene ST*“ (28.853 probe set) Microarray-Chips durch die „*Expression Core Facility*“ analysiert.

Die Expressionsdaten wurden nach der Festlegung definierter „Cut-offs“ in Form einer heatmap mit der *MeV (MultiExperiment Viewer)*-Software dargestellt und analysiert. „Cut-offs“ wurden für die logarithmisch angegebene Expressionsstärke (Cutoff: >7) sowie für das Verhältnis (Ratio) (Cutoff: >+2; <-2) der logarithmischen Expressionsdaten bestimmt.

## 4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Themenschwerpunkte. Der erste Teil untersucht die Rolle von ADAR1 in der Typ I Interferon (IFN)-Immunantwort in humanen Monozyten. Die darauffolgenden Teile zeigen die Ergebnisse zur Analyse der immunregulatorischen Funktionen von ADAR1 in Hinblick auf die Typ I IFN-Immunantwort in zwei verschiedenen Mausmodellen und die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen. Abschließend wurde der Einfluss von ADAR1 auf die Entwicklung verschiedener Immunzellpopulationen untersucht.

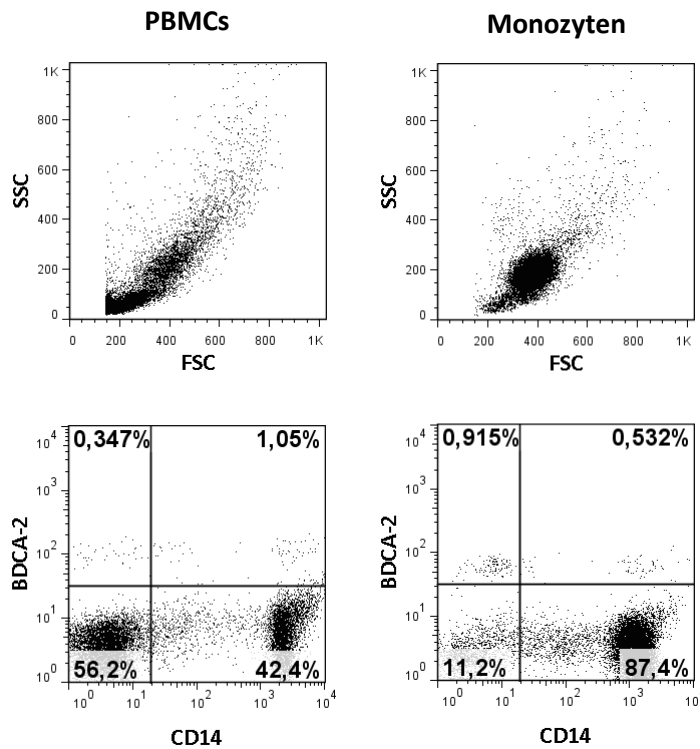
### 4.1. siRNA-vermittelter ADAR1-Knockdown in humanen Monozyten

Zur Analyse der Rolle von ADAR1 auf die Typ I IFN-Immunantwort in humanen Monozyten wurde zunächst siRNA (small interfering RNA)-vermittelt ein ADAR1-Knockdown (3.4.7) durchgeführt. In diesen Zellen wurde anschließend die Freisetzung von Typ I IFN sowie von proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit verschiedenen PRR (pattern-recognition receptor)-Liganden untersucht.

#### 4.1.1. Isolation von humanen Monozyten aus PBMCs

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von humanen Blutmonozyten wurden frische „Buffy coat“-Präparationen aus peripherem Venenblut gesunder Blutspender verwendet. Die Präparation der angereicherten peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode (3.4.5). Die PBMC-Fraktion enthielt neben Monozyten auch B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Die weitere Aufreinigung der Monozyten erfolgte unter Verwendung der „Counter flow“-Zentrifugation (Elutriation) (3.4.6).

Die Reinheit der aufgereinigten Monozyten wurde durchflusszytometrisch (3.5) sowohl über Größen- und Granularitätsverteilung im Forward-Scatter (FSC) bzw. Side-Scatter (SSC) als auch über die Oberflächenmoleküle CD14 und BDCA-2 kontrolliert. CD14 ist ein Oberflächenprotein, das v.a. von humanen Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, wohingegen BDCA-2 plasmazytoide dendritische Zellen charakterisiert und Monozyten damit für diesen Marker negativ sind. Abb. 4.1 zeigt exemplarisch eine solche Reinheitsanalyse. Durch Elutriation konnten die CD14-positiven, BDCA-2-negativen Monozyten von 42,4 % in der PBMC-Fraktion auf 87,4 % angereichert werden. Diese Zellen wurden anschließend für die siRNA-Behandlung und die darauffolgenden Stimulationsexperimente eingesetzt.



**Abb. 4.1 Reinheit der humanen Monozyten.** Die Reinheit der elutrierten Monozyten wurde über die Verteilung der Zellen im FSC bzw. SSC und durch die Färbung der Oberflächenmoleküle CD14 und BDCA-2 beurteilt. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen vor (PBMCs) und nach Aufreinigung (Monozyten).

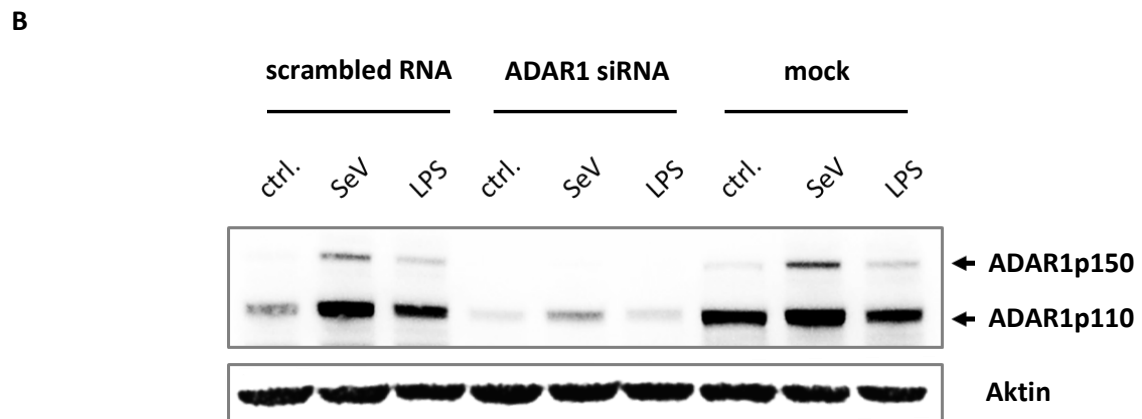
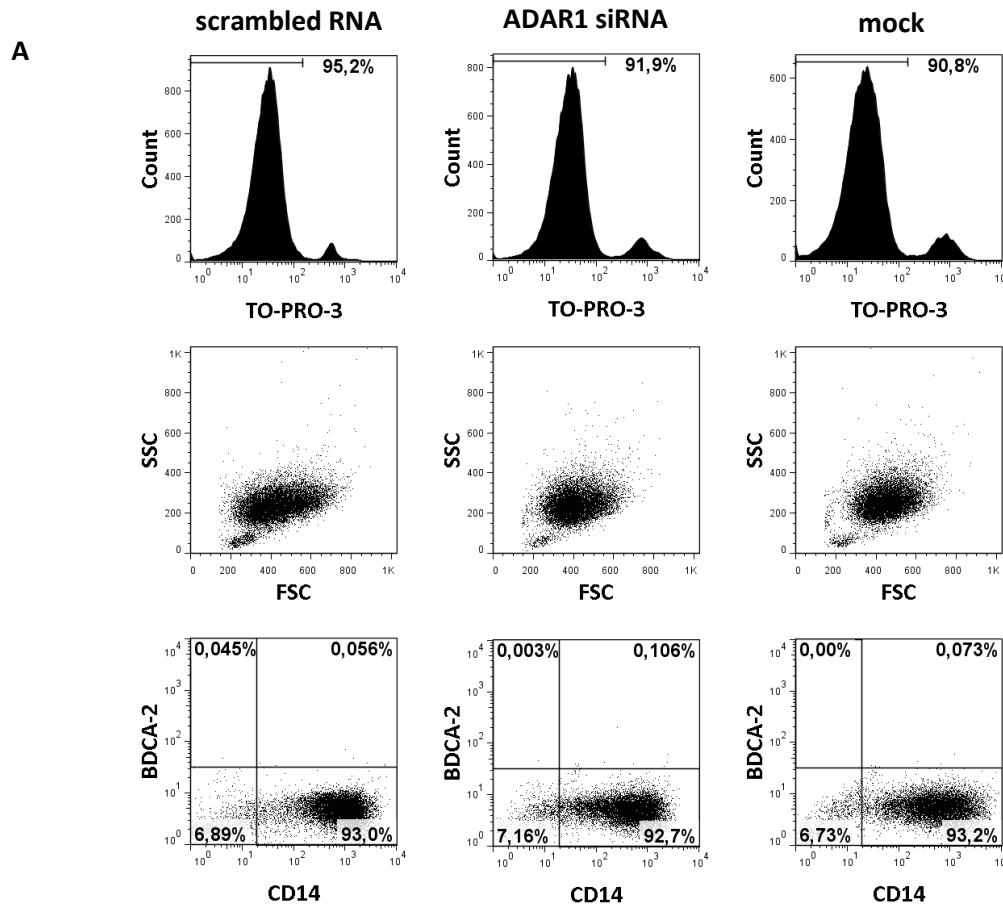
#### 4.1.2. Etablierung und Validierung des siRNA-Knockdowns in humanen Monozyten

Die aus 4.1.1 aufgereinigten Monozyten wurden der siRNA-Behandlung unterzogen, wobei Zellen, die mit der entsprechenden scrambled RNA (scrRNA) oder mock-transfiziert wurden, als Kontrolle dienten. Vorexperimente zeigten den effizientesten ADAR1-Protein-Knockdown nach 48h der siRNA-Behandlung.

Zur Validierung des siRNA-vermittelten ADAR1-Knockdowns wurden 48 h nach siRNA- oder Kontroll-Behandlung Proteinlysate (3.2.1) hergestellt und in einem Western Blot gegen ADAR1 gefärbt (3.2.4). Die behandelten Zellen wurden darüber hinaus durchflusszytometrisch, wie in 4.1.1 beschrieben, auf ihren Monozyten Phänotyp untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen mit TO-PRO-3 angefärbt. TO-PRO-3 ist ein karbozyaner, monomerer Farbstoff, der hochsensitiv Nukleinsäuren anfärbt und sich als Indikator für tote Zellen eignet.

Die Stabilität des ADAR1-Knockdowns nach Stimulation der Zellen mit LPS oder Sendai Virus (SeV) über einen Zeitraum von 20 h wurde ebenfalls mittels Western Blot kontrolliert, um eine ADAR1-Defizienz über den gesamten untersuchten Zeitraum gewährleisten zu können.





**Abb. 4.2 siRNA-vermittelter ADAR1-Knockdown in humanen Monozyten.** (A) Der Monozyten-Phänotyp wurde, wie in 4.1.1 beschrieben, durchflusszytometrisch kontrolliert. (B) Der ADAR1-Knockdown wurde mittels Western Blot gegen ADAR1 sowohl in unstimulierten (ctrl.) als auch nach Stimulation mit LPS [10 ng/ml] oder Sendai Virus (SeV) [2 MOI] im Vergleich zu scrambled RNA- oder mock-transfizierten Zellen validiert. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Der Monozyten-Phänotyp konnte auch 48 h nach Behandlung (siRNA, scRNA oder mock) mit ca. 93% Reinheit nachgewiesen werden, wie die Färbung gegen CD14, als Monozyten Marker, in Abb. 4.2 A zeigt. Über eine Färbung von BDCA-2, als Marker für plasmazytoide dendritische Zellen und damit als Marker für weitere IFN-produzierende Zellen konnte eine Anwesenheit dieser Zellen im Hinblick auf die folgenden Stimulationsexperimente ausgeschlossen werden.

Der Western Blot zeigt in den Kontrollzellen (scrambled RNA oder mock) eine Induktion des ADAR1-Proteins nach Stimulation mit SeV oder LPS im Vergleich zu unbehandelten Zellen (ctrl.), wobei die Expression der langen IFN-induzierbaren ADAR1p150-Isoform v.a. durch die SeV Infektion verstärkt wurde (Abb. 4.2 B).

Durch die siRNA-Behandlung konnte das ADAR1-Protein in den CD14-positiven humanen Monozyten signifikant reduziert werden. Dieser siRNA-vermittelte ADAR1-Knockdown war auch nach Stimulation mit LPS oder SeV stabil, sowohl in Hinblick auf die kurze ADAR1p110- als auch bezüglich der langen, IFN-induzierbaren ADAR1p150-Form (Abb. 4.2 B).

### **4.1.3. Typ I Interferon-Freisetzung der Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden**

Zur Untersuchung der Rolle von ADAR1 auf die Typ I IFN-Antwort wurden die siRNA-behandelten, ADAR1-defizienten Zellen (4.1.2) im Hinblick auf die Freisetzung der Typ I IFN, IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ , nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden analysiert. Als Kontrollen dienten scrambled RNA-behandelte oder mock-transfizierte, ADAR1-kompetente Zellen.

Dazu wurden die Zellüberstände der behandelten und stimulierten Monozyten nach 4 h, 12 h, und 20 h geerntet und die enthaltene Zytokinmenge mittels ELISA (3.2.5) bestimmt. Zusätzlich wurden auch die Interleukin 6 (IL6)-Spiegel in den Überständen gemessen.

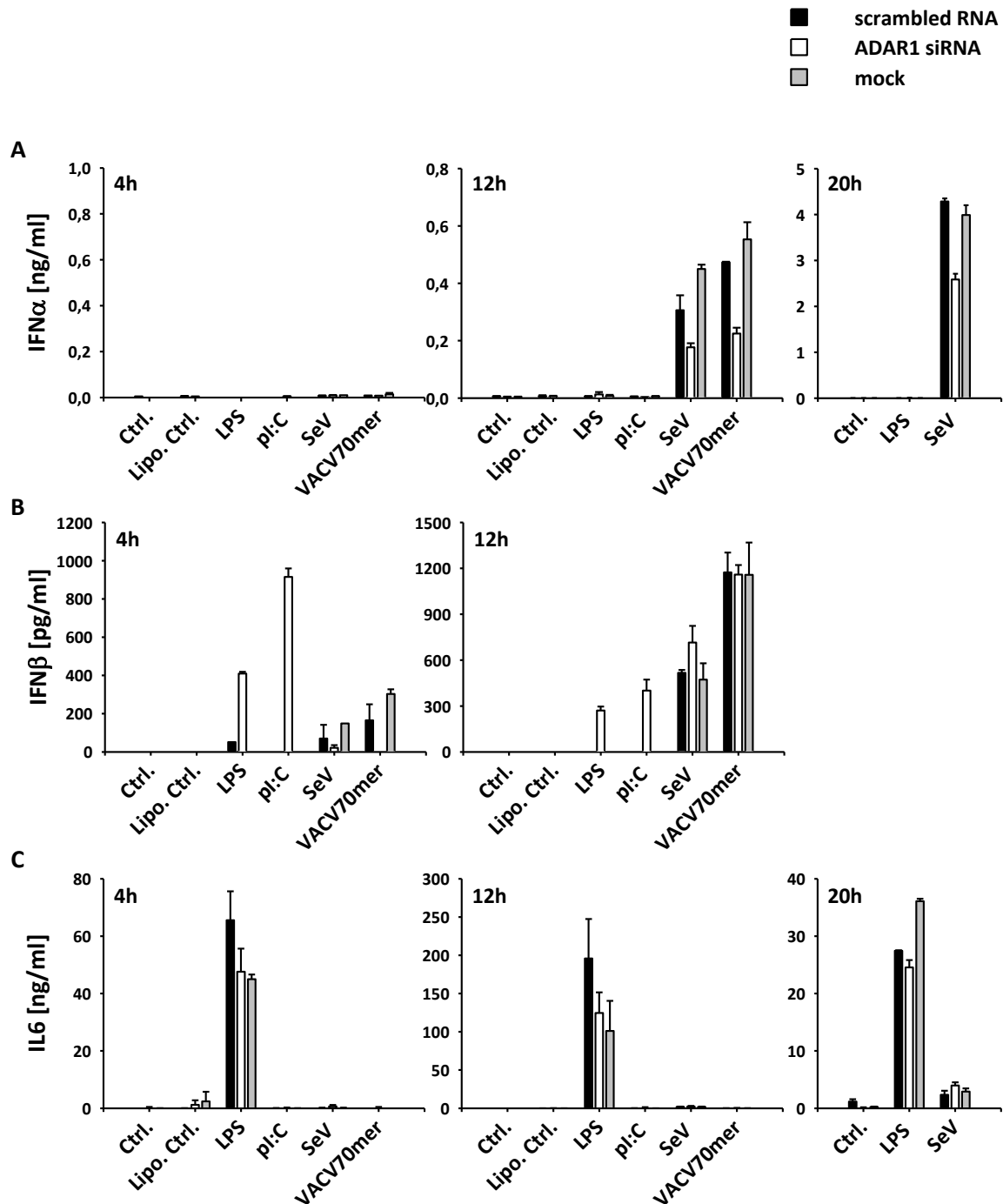
Als PRR-Liganden kamen, LPS, PolyI:C, Sendai Virus (SeV) und ein synthetisches dsDNA-Motiv aus dem Vaccinia Virus (VACV70mer) zum Einsatz. Dabei stimulieren LPS, als TLR4-Ligand, und PolyI:C, als TLR3-Ligand, TRIF-abhängig die Typ I IFN-Induktion. Das Einzelstrang-RNA Virus SeV führt über die Aktivierung des zytosolischen RIG-I-Rezeptors IPS1-abhängig zur Typ I IFN-Freisetzung. Das transfizierte VACV70mer (mit Lipofektamin komplexiert) kann schließlich über die zytosolischen DNA-Sensoren IFI16 und/oder cGAS STING-abhängig die Typ I IFN-Induktion steuern (Unterholzner, Keating et al. 2010; Sun, Wu et al. 2013; Wu, Sun et al. 2013).

Die siRNA-vermittelte ADAR1-Defizienz führte zu einer reduzierten Freisetzung von IFN $\alpha$  nach Stimulation mit SeV oder dem VACV70mer. Mit PolyI:C konnte unabhängig vom ADAR1-Status nur eine geringe IFN $\alpha$ -Induktion gemessen werden (Abb. 4.3 A).

Da IFN $\beta$  in der Typ I IFN-Antwort in der frühen Phase als initiales Interferon gebildet wird, wurden die IFN $\beta$ -Spiegel nach 4 h und 12 h Stimulation in den Zellüberständen gemessen. Entsprechend der beobachteten reduzierten Freisetzung von IFN $\alpha$  wurde in ADAR1-defizienten Zellen (ADAR1 siRNA) auch für IFN $\beta$  zunächst nach 4 h eine reduzierte Sekretion nach Stimulation mit SeV oder VACV70mer gemessen. Die freigesetzten IFN $\beta$ -Mengen glichen sich aber nach 12 h denen der Kontrollzellen (scrambled RNA oder mock) an (Abb. 4.3 B). Die

siRNA-vermittelte ADAR1-Defizienz führte aber nicht zu einer generellen Reduktion induzierter Typ I IFN. Sowohl für LPS als auch für PolyI:C, als TRIF-abhängige PRR-Liganden, zeigten sich erhöhte IFN $\beta$ -Konzentrationen in ADAR1-defizienten Zellen (Abb. 4.3 B).

Die IL6-Induktion blieb unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz (Abb. 4.3 C).



**Abb. 4.3 Zytokin-Freisetzung der siRNA-behandelten Monozyten nach 4 h, 12 h und 20 h.** Humane Monozyten wurden behandelt mit siRNA gegen ADAR1 (weiß), scrambled RNA (grau) oder mock transfiziert und mit LPS [10 ng/ml], PolyI:C [5  $\mu$ g/ml], Sendai Virus (SeV) [2 MOI] oder mit einem synthetischen, poxviralem Vaccinia Virus DNA-Motiv (VACV70mer mit Lipofektamin komplexiert) [3  $\mu$ g/ml] für 4 h, 12 h und 20 h stimuliert. Zytokinspiegel von IFN $\alpha$  (A) IFN $\beta$  (B) IL6 (C) in den Zellüberständen wurden mittels ELISA ermittelt. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

## 4.2. ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Maus

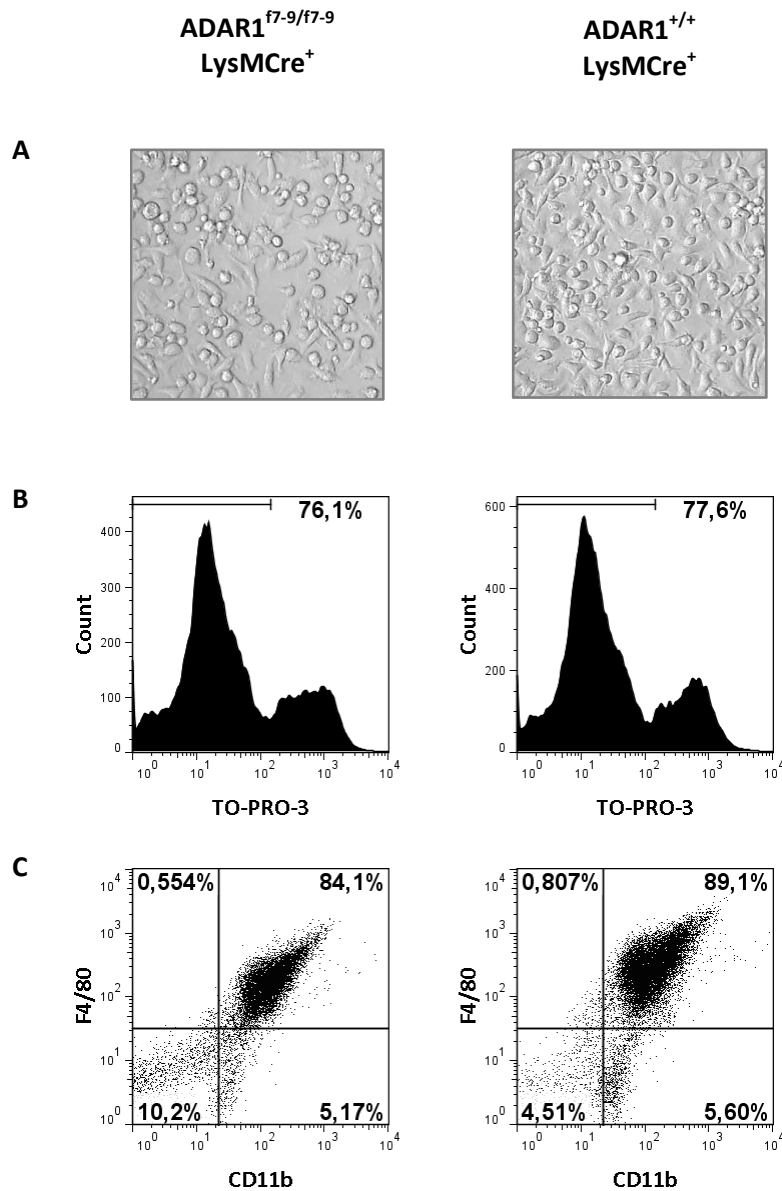
Im Folgenden werden die Ergebnisse zu dem ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Mausmodell vorgestellt. Da sich in diesem Mausmodell der ADAR1-Knockout in LysMCre-exprimierenden, myeloiden Zellen, wie z.B. Makrophagen manifestiert, beziehen sich die Ergebnisse auf die Untersuchungen M-CSF-generierter Makrophagen. Homozygot ADAR1-gefloxt, LysMCre-positive Mäuse (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) dienten dabei als Donor für ADAR1-defiziente M-CSF-Kulturen. M-CSF-Kulturen aus Mäusen, die kein gefloxtes ADAR1-Allel trugen, dennoch aber LysMCre-positiv waren (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>), wurden als ADAR1-kompetente Kontrollen eingesetzt. Das Mausmodell und die entsprechende Strategie zur Genotypisierung wurden in 3.3.1 dargestellt.

### 4.2.1. Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark

Zur Analyse der immunregulatorischen Rolle von ADAR1 im Hinblick auf die Typ I IFN-Antwort, wurden *in vitro* Makrophagen aus Knochenmark homozygot ADAR1-gefloxter und, als Kontrollen, nicht-gefloxter Mäuse generiert. Um einen Einfluss der Cre-Expression auf die gemessenen Parameter auszuschließen, wiesen sowohl die homozygot geflochten Tiere zur Induzierung des ADAR1-Knockouts in Makrophagen einen positiven LysMCre-Status auf als auch die nicht-geflochten Tiere.

Die ADAR1-defizienten Makrophagen (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) wurden im Anschluss im Vergleich zu ADAR1-kompetenten (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>) Zellen bezüglich ihres Zytokinprofils nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden sowie bezüglich verschiedener Aktivierungsmarker untersucht.

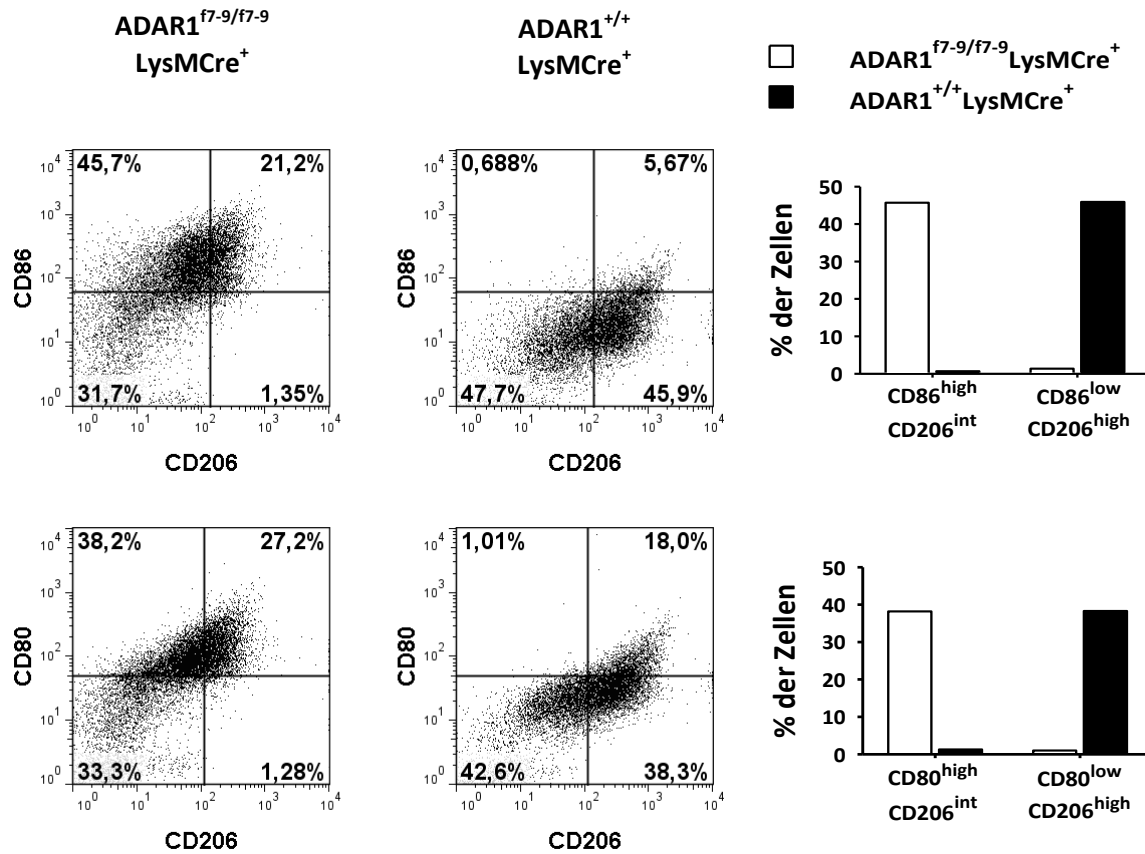
Die Makrophagen wurden in einer Knochenmarkskultur *in vitro* mit M-CSF differenziert (3.3.3 und 3.4.2). Die Differenzierung der Zellen wurde sowohl mikroskopisch anhand ihrer Morphologie als auch durchflusszytometrisch (3.5) über die Oberflächenmoleküle F4/80 und CD11b kontrolliert. Dabei zeigten die Kulturen unabhängig vom ADAR1-Status eine typische Makrophagen-Morphologie (Abb. 4.4 A), ebenso wie eine vergleichbare Anreicherung F4/80-, CD11b-positiver Makrophagen von 84.1% bzw. 89.1% (Abb. 4.4 C). Durch eine Färbung der Zellen mit TO-PRO-3 zur Markierung toter Zellen konnte darüber hinaus eine Anreicherung dieser in der ADAR1-defizienten Kultur gegenüber der ADAR1-kompetenten Kultur ausgeschlossen werden (Abb. 4.4 B).



**Abb. 4.4 Kontrolle der Makrophagendifferenzierung.** (A) Die M-CSF-differenzierten Knochenmarkszellen zeigten mikroskopisch eine typische Makrophagen-Morphologie. (B) Die Kulturen wurden über eine Färbung mit TO-PRO-3 auf tote Zellen überprüft. (C) Die Differenzierung der TO-PRO-3-negativen Zellen zu Makrophagen wurde durch den Nachweis der Oberflächenmoleküle F4/80 und CD11b überprüft. Dargestellt sind die Analysen von Makrophagenkulturen einer ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>-</sup> und einer ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>-Maus. Repräsentativ für sieben unabhängige Experimente.

Weiterhin wurden die Makrophagen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD86, CD80 und CD206 untersucht, deren Expression in Zusammenhang mit bestimmten Makrophagen-Subpopulationen steht (Liu and Yang 2013). Dabei wiesen die ADAR1-defizienten (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Makrophagen (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>) eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 auf, einhergehend mit einer intermediären Expression des Mannose-Rezeptors CD206. Dieses Expressionsmuster deutet auf einen klassisch aktivierten, als pro-inflammatorisch beschriebenen, M1-ähnlichen Makrophagen-Phänotyp hin. Im Gegensatz dazu zeigten ADAR1-

kompetente Zellen - typisch für M-CSF-generierte Makrophagen (Fleetwood, Lawrence et al. 2007) - einen alternativ aktivierten, sogenannten anti-inflammatorischen, M2-ähnlichen Phänotyp, der durch eine hohe Expression von CD206 charakterisiert ist (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5 Expression von M1- und M2-Markern auf M-CSF-generierten Makrophagen.** Die Kulturen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80, sowie des Mannose-Rezeptors CD206 untersucht. Dargestellt sind die Analysen von Makrophagenkulturen einer ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>- und einer ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>-Maus. Repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

#### 4.2.2. Typ I Interferon-Freisetzung der M-CSF-generierten Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden

Zur Untersuchung der Rolle von ADAR1 auf die Typ I IFN-Antwort wurden ADAR1-defiziente Makrophagen (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) (4.2.1) auf die Freisetzung der Typ I IFN, IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ , nach Stimulation mit verschiedenen PRR (pattern-recognition receptor)-Liganden im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>) analysiert.

Dazu wurden die Zellüberstände der stimulierten Makrophagen nach 4 h und 20 h geerntet und die enthaltene Zytokinmenge mittels ELISA (3.2.5) bestimmt. Zusätzlich wurden auch die

Interleukin 6 (IL6)- und IP10 (IFN $\gamma$  inducible protein 10, auch als CXCL10 bezeichnet)-Spiegel in den Überständen gemessen.

Als PRR-Liganden wurden wie für die humanen Monozyten beschrieben (4.1.3) LPS, PolyI:C, Sendai Virus (SeV) und ein synthetisches, poxvirales dsDNA-Motiv (VACV70mer) eingesetzt.

Die ADAR1-Defizienz (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) führte zu einem vollständigen Abbruch der IFN $\alpha$ -Sekretion nach Infektion bzw. Stimulation mit SeV oder dem VACV70mer (Abb. 4.6 A). Bezüglich der IFN $\beta$ -Freisetzung zeigten sich für die TRIF-abhängigen PRR-Liganden LPS und PolyI:C erhöhte Konzentrationen in den Überständen der ADAR1-defizienten Kulturen, wohingegen nach Infektion bzw. Stimulation mit SeV oder dem VACV70mer eine Reduktion der IFN $\beta$ -Sekretion gemessen wurde (Abb. 4.6 B).

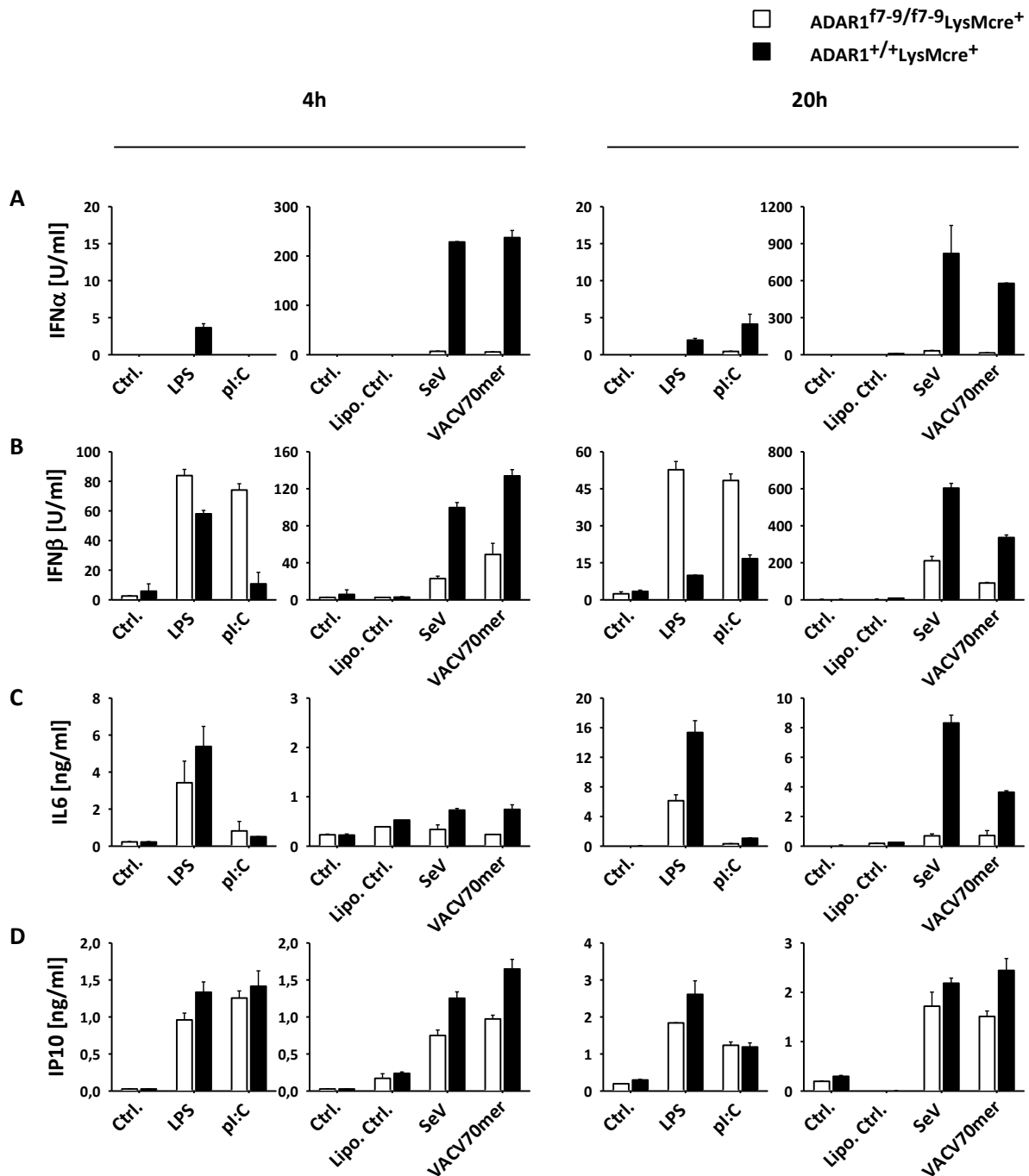
Die IL6-Induktion war, wie auch für IFN $\beta$  zu beobachten, nach Infektion bzw. Stimulation mit SeV oder dem VACV70mer reduziert. Nach LPS-Stimulation konnten nach 4 h keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IL6-Freisetzung gemessen werden, jedoch wurden in dem hier dargestellten Experiment nach 20 h in den Überständen ADAR1-defizienter Zellen reduzierte IL6-Spiegel beobachtet (Abb. 4.6 C). In dem überwiegenden Teil der hierzu durchgeführten Experimente blieb die IL6-Induktion nach LPS-Stimulation allerdings auch nach 20 h unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Somit ist anzunehmen, dass sich im Allgemeinen die ADAR1-Defizienz nicht auf die LPS-induzierte IL6-Freisetzung auswirkt.

Die IP10-Sekretion blieb weitgehend unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz (Abb. 4.6 D).

Insgesamt bestätigen die Daten bezüglich der modulatorischen ADAR1-Effekte auf die Freisetzung der Typ I IFN, IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  aus dem Mausmodell die Ergebnisse aus dem humanen Monozyten-Modell (4.1.3). Wie im humanen System, führt die ADAR1-Defizienz zu einer reduzierten Freisetzung von IFN $\alpha$  sowie von IFN $\beta$  nach TRIF-unabhängiger Stimulation mit SeV oder VACV70mer, wobei die ADAR1-Defizienz in murinen Makrophagen im Vergleich zu den ADAR1-defizienten humanen Monozyten diesbezüglich einen verstärkten Phänotyp hervorrief. Darüber hinaus war die IFN $\beta$ -Sekretion in ADAR1-defizienten murinen Makrophagen auch nach 20 h noch reduziert, während in ADAR1-defizienten humanen Monozyten die IFN $\beta$ -Spiegel zwar zunächst reduziert waren, sich aber nach 12 h an die Spiegel der Kontrollzellen angleichen. In beiden Systemen wurde aber nach LPS-Stimulation eine stabile, stark erhöhte IFN $\beta$ -Sekretion beobachtet.

Im Gegensatz zu der ADAR1-Defizienz in humanen Monozyten führte diese in murinen Makrophagen allerdings nach Stimulation mit SeV oder VACV70mer zu reduzierten IL6-Spiegeln.

Die Unterschiede, die sich teilweise zwischen humanem und murinem System ergaben, sind möglicherweise auf unterschiedliche Effizienzen der ADAR1-Deletion in den verschiedenen Systemen zurückzuführen auf die in 5.1.2 nochmals eingegangen wird.



**Abb. 4.6 Zytokin-Freisetzung ADAR1-defizienter Makrophagen nach 4 h und 20 h.** M-CSF-generierte Makrophagen aus ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup> (weiß) und ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup> (schwarz) Mäusen wurden mit LPS [0,2 µg/ml], PolyI:C (pl:C) [5 µg/ml], Sendai Virus (SeV) [1 MOI] oder poxviralem Vaccinia Virus DNA-Motiv (VACV70mer mit Lipofektamin komplexiert) [3 µg/ml] für 4 h und 20 h stimuliert. Zytokinspiegel von IFNα (A) IFNβ (B) IL6 (C) und IP10 (D) in den Zellüberständen wurden mittels ELISA ermittelt. Repräsentativ für sieben unabhängige Experimente.

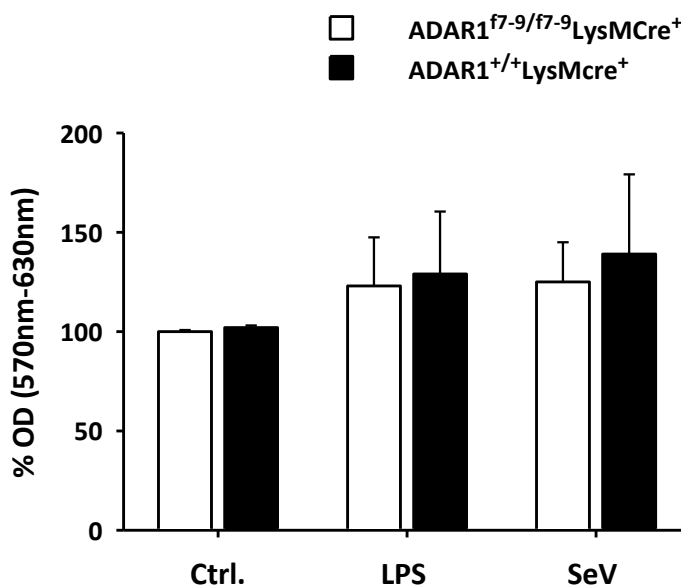
Da ein Zusammenhang einer ADAR1-Defizienz mit apoptotischen Prozessen beschrieben wurde (Wang, Miyakoda et al. 2004; XuFeng, Boyer et al. 2009), wurde nach Stimulation mit LPS oder SeV die Viabilität der ADAR1-defizienten (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) im Vergleich zu ADAR1-



kompetenten ( $ADAR1^{+/+}LysMCre^+$ ) M-CSF-generierten Makrophagen in einem MTT-Assay verifiziert (3.4.9).

Dabei konnten bezüglich der Viabilität keine Unterschiede zwischen  $ADAR1$ -defizienten und  $ADAR1$ -kompetenten Makrophagen festgestellt werden (Abb. 4.7). Dies galt sowohl für Zellen, die zur Kontrolle nicht stimuliert wurden als auch für Zellen, die mit den beschriebenen Stimulanzen behandelt wurden.

Es konnte somit eine vergleichbare Viabilität der Makrophagen unabhängig vom  $ADAR1$ -Status angenommen werden.

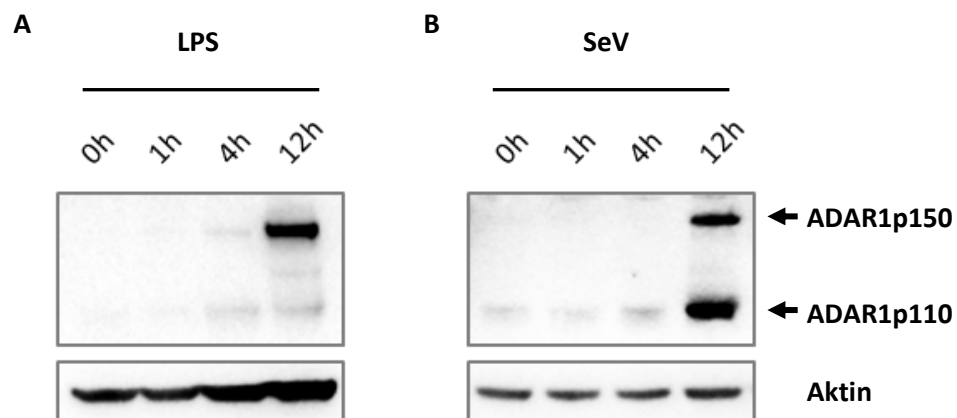


**Abb. 4.7 MTT-Assay stimulierter Makrophagen nach 20 h.**  $ADAR1$ -defiziente ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}LysMCre^+$ , weiß) oder  $ADAR1$ -kompetente ( $ADAR1^{+/+}LysMCre^+$ , schwarz) M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit LPS [0, 2  $\mu$ g/ml] oder Sendai Virus (SeV) [1 MOI] für 20 h stimuliert bzw. infiziert, oder als Kontrolle nicht stimuliert (Ctrl.). Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt und die gemessenen OD-Werte der unstimulierten  $ADAR1$ -defizienten Makrophagen auf 100% gesetzt. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

#### 4.2.3. $ADAR1$ -Induktion in M-CSF-generierten Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden

Wie im vorangegangenen Abschnitt 4.2.2 beschrieben wurde, konnten  $ADAR1$ -abhängige, modulatorische Effekte auf die Typ I IFN-Freisetzung nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden beobachtet werden. Während eine  $ADAR1$ -Defizienz bei TRIF-abhängigen Stimulanzen, wie LPS oder PolyI:C, zu einer erhöhten IFN $\beta$ -Freisetzung führte, kam es nach Infektion bzw. Stimulation mit Sendai Virus (SeV) oder dem VACV70mer DNA-Motiv (VACV) zu einer stark reduzierten Freisetzung von IFN $\beta$ , einhergehend mit einem kompletten Abbruch des IFN $\alpha$ -Signals (Abb. 4.6 A, B). Um eine Beteiligung von  $ADAR1$  bei den beschriebenen Stimulationen zu verifizieren, wurde in  $ADAR1$ -kompetenten M-CSF-generierten Makrophagen (3.4.2) die Induktion von  $ADAR1$  nach Stimulation mit LPS oder Infektion mit SeV mittels Western Blot (3.2.4) nachgewiesen. Um den Zeitpunkt der  $ADAR1$ -Induktion dabei bestimmen zu kön-

nen, wurden die Zellen stimuliert, nach 1 h, 4 h und 12 h Zelllysate hergestellt (3.2.1) und die ADAR1-Proteinexpression nachgewiesen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (0 h). Nach LPS-Stimulation konnte schon nach 4 h eine leichte Induktion sowohl der kurzen (p110) als auch der langen (p150) ADAR1-Form beobachtet werden. Die Induktion der langen Form dominierte nach 12 h (Abb. 4.8 A). Eine Infektion mit SeV führte erst nach 12 h zu einer starken Induktion beider ADAR1-Formen (p110 und p150). Die dominierende Präsenz der langen ADAR1-Form (p150) konnte hier erst nach 20 h (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. Generell lässt sich eine Induktion sowohl nach LPS-Stimulation als auch nach SeV-Infektion nachweisen.



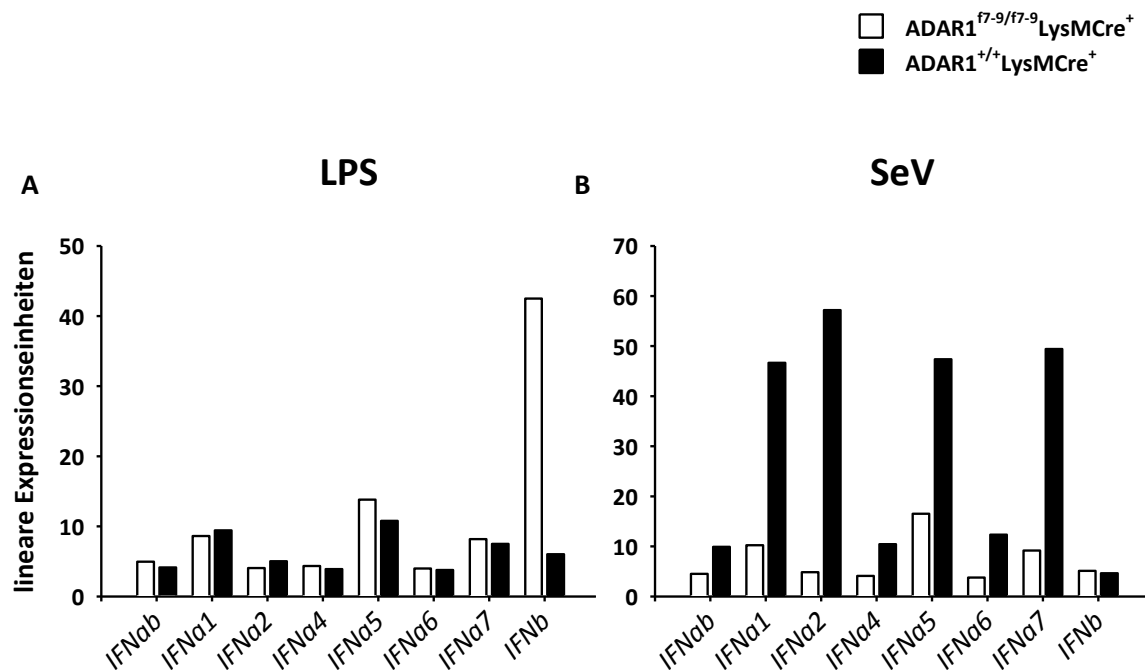
**Abb. 4.8 ADAR1-Proteinexpression in M-CSF-generierten Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder Sendai Virus.** M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit LPS [1 µg/ml] (A) stimuliert oder mit Sendai Virus (SeV) [1 MOI] (B) infiziert. Die ADAR1-Expression wurde in unbehandelten (0 h), 1 h, 4 h und 12 h stimulierten bzw. infizierten Zellen mittels Western Blot nachgewiesen. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

#### 4.2.4. Microarray-Analyse

Wie zuvor beschrieben konnten ADAR1-abhängige Effekte bezüglich der Typ I IFN-Freisetzung nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden beobachtet werden (4.2.2). TRIF-abhängige Stimulation mit LPS oder PolyI:C führte zu einer erhöhten IFN $\beta$ -Freisetzung in ADAR1-defizienten Makrophagen. Nach Infektion bzw. Stimulation mit Sendai Virus (SeV) oder dem VACV70mer DNA-Motiv (VACV70mer) kam es allerdings zu einer stark reduzierten Freisetzung von IFN $\beta$  und zu einem kompletten Abbruch des IFN $\alpha$ -Signals (Abb. 4.6 A, B). Um Hinweise auf einen zugrundeliegenden Mechanismus zu erhalten, sollte im Folgenden ein detaillierter Einblick in Bezug auf veränderte Genexpressionen im Zusammenhang mit der ADAR1-Defizienz gewonnen werden. Dazu wurden M-CSF generierte ADAR1-defiziente (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) und ADAR1-kompetente (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>) Makrophagen (3.4.2)

mit LPS oder SeV stimuliert bzw. infiziert oder unbehandelt belassen. Nach 4 h wurde die RNA aus diesen Zellen isoliert (3.1.1). Die DNase-verdauten RNA-Proben (3.1.2) wurden im Anschluss an der „Expression Core Facility“ des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene an der TU München unter Leitung von Prof. Dr. med. D. H. Busch einer Microarray-Analyse unterzogen (3.7).

Zunächst konnten auch die Microarray-Daten im Fall der LPS-Stimulation eine erhöhte Expression des *IFN $\beta$* -Gens zeigen (Abb. 4.9 A), während, wie erwartet, nach Infektion mit SeV eine verminderte Expression der *IFN $\alpha$* -Gene in ADAR1-defizienten Makrophagen beobachtet wurde (Abb. 4.9 B). Somit bestätigten die Microarray-Daten die in Abb. 4.6 beobachteten Effekte auf die Typ I IFN-Antwort.



**Abb. 4.9 mRNA-Expression der Typ I IFN-Gene.** Dargestellt sind die linearen Expressionswerte einiger *IFN $\alpha$* -Gene sowie des *IFN $\beta$* -Gens in ADAR1-defizienten (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>, weiß)- und ADAR1-kompetenten (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>, schwarz)-Makrophagen nach Stimulation mit LPS [0,5  $\mu$ g/ml] (A) oder Infektion mit Sendai Virus (SeV) [2 MOI] (B) für einen Zeitraum von 4 h. Repräsentativ für ein Experiment.

Die Expressionswerte aus den Microarray-Daten wurden nach dem Festlegen der „Cut-Offs“ für die Expressionswerte selbst und für das Verhältnis zwischen den Expressionswerten bezüglich ADAR1-defizienter und ADAR1-kompetenter Makrophagen in einer „heatmap“ dargestellt (3.7 und Abb. 4.10). Die am stärksten regulierten Gene waren in vielen Fällen assoziiert mit Funktionen in Bereichen von Zellstoffwechsel (Apoc2, Trf, Slc7a2, Vdr, Sars, Asns), Zellzyklus bzw. Proliferation (Wee, S100a8, S100a9 Il15ra, Mad2l1, Ccnb1, Id3, Myc, Akna, Plac8, Ccna2) sowie Zellstress und DNA-Reparatur (Tnfsf, Ikzf1, Daxx, Serpina3f, Histon Cluster 1, Nupr1, Asf1b, Dusp7, Stk17b, Dusp1, Gadd45a, Ddit3). Ein weiterer Komplex ließ sich aber darüber

hinaus mit IFN-assoziierten Prozessen in Verbindung bringen (Tnfsf10, Mx1, IRF1, Mir155, Socs, Ifi47, Rsad2, Ifit2, Mx2, Ifit1, Trim21, Batf2, Igit1, Cxcl11, Irf2bp2, Ly6a, H2-Q6), die v.a. nach TRIF-unabhängiger SeV-Infektion einer starken ADAR1-abhängigen Regulation unterliegen.

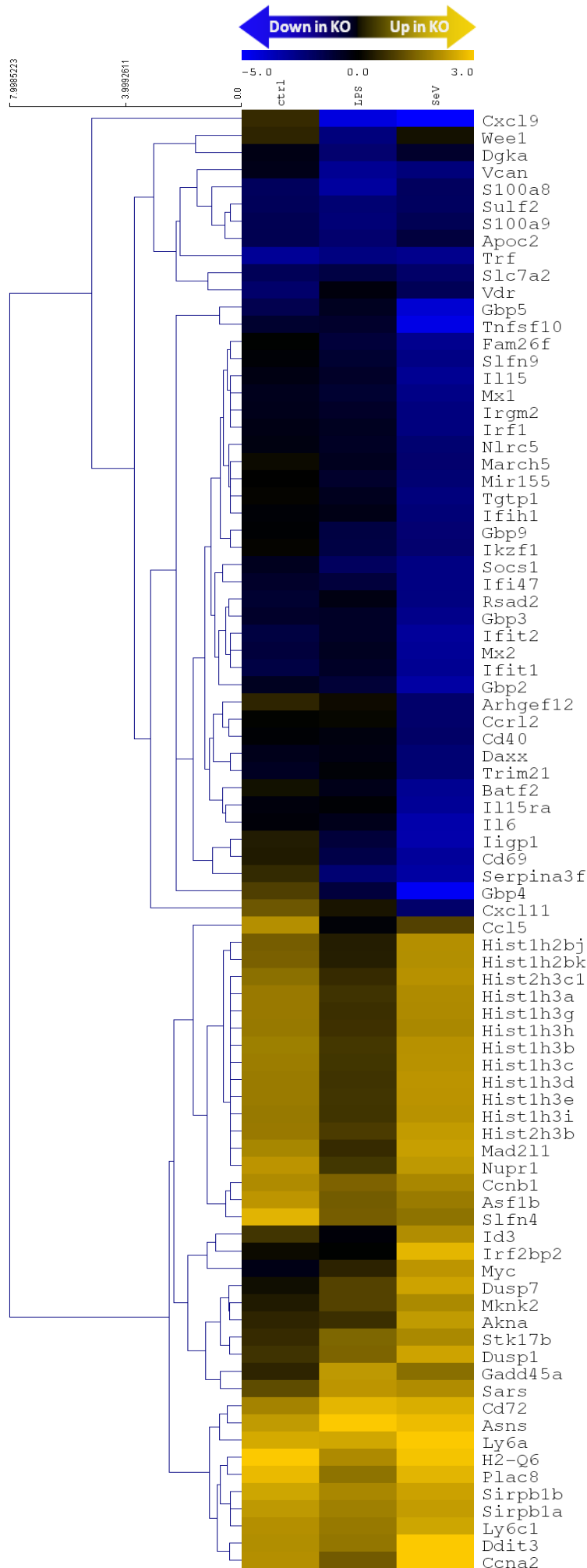
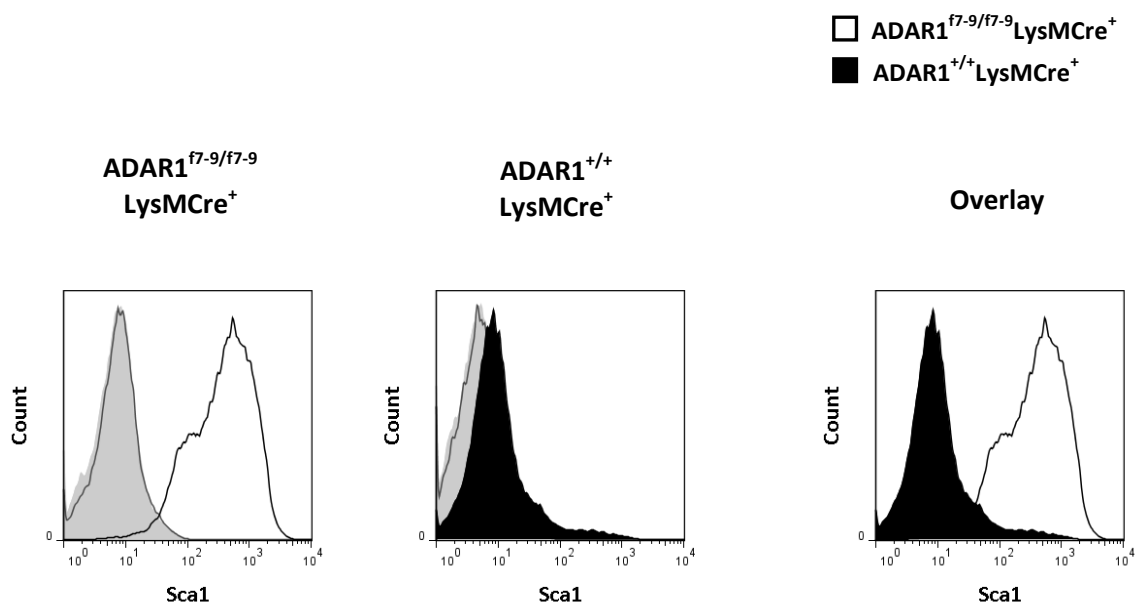


Abb. 4.10 „Heatmap“ der meist regulierten Gene in ADAR1-defizienten Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder SeV. M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit LPS [0,5 µg/ml] stimuliert oder mit Sendai Virus (SeV) [2 MOI] infiziert oder wurden unbehandelt belassen (ctrl). Unterschiede in der Genexpression zwischen ADAR1-defizienten (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) und ADAR1-kompetenten Makrophagen (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>) wurden nach 4 h mittels Microarray analysiert und in einer „heatmap“ dargestellt. Durch hierarchisches Clustering wurden gleichartig regulierte Gene zusammengefasst. Blau, in ADAR1-defizienten Makrophagen herabreguliert; Gelb, in ADAR1-defizienten Makrophagen hochreguliert. Repräsentativ für ein Experiment.

Zur Kontrolle der durchgeführten Microarray-Analysen, wurde eines der am stärksten regulierten Gene zusätzlich auf Proteinebene im Hinblick auf eine Veränderung der Expression überprüft. Dabei handelte es sich um das Molekül Sca1, das sowohl in unbehandelten, als auch in stimulierten Makrophagen um das 6-10fache erhöht war. Sca1, auch bekannt als Ly6A/E, ist ein Mitglied der Ly6-Multigen-Familie. Es wird auf der Zelloberfläche von multipotenten, hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark von Mäusen exprimiert. In der Peripherie weisen C57BL-Mäuse eine relative hohe Anzahl an Sca1-positiven Lymphozyten auf. Die Sca1-Expression wird dramatisch durch zelluläre Aktivierung hochreguliert und ist Typ I IFN-induzierbar. Neben der Sca1-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen ist eine Expression noch für T- und B-Zellen beschrieben worden (Holmes and Stanford 2007), jedoch gibt es bisher keine Daten oder funktionellen Analysen der Sca1-Expression auf myeloiden Zellen, wie z.B. Makrophagen.

Um die Expression von Sca1 auf Proteinebene zu verifizieren, wurde dieses auf M-CSF-generierten unbehandelten Makrophagen durchflusszytometrisch (3.5) nachgewiesen. Die im Microarray beobachtete drastisch erhöhte Expression von Sca1 auf ADAR1-defizienten Zellen konnte auch durchflusszytometrisch bestätigt werden (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11 Sca1-Expression auf ADAR1-defizienten Makrophagen.** Sca1 wurde auf ADAR1-defizienten ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}LysMCre^+$ ) oder ADAR1-kompetenten ( $ADAR1^{+/+}LysMCre^+$ ) M-CSF-generierte Makrophagen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dargestellt ist die Sca1-Färbung in ADAR1-defizienten (schwarze Linie) und in ADAR1-kompetenten Makrophagen (schwarze Fläche) im Vergleich zu entsprechenden, ungefärbten Zellen (grau schattierte Fläche) und der Färbung mit einer Isotypenkontrolle (dunkelgraue Linie). Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

#### 4.2.5. Untersuchung der Typ I Interferon-Signalmoleküle

Die zuvor beschriebene Untersuchung der M-CSF-generierten Makrophagen mittels Microarray-Analyse (4.2.4) gab einen Einblick in ADAR1-abhängig veränderte Genexpressionen auf mRNA-Ebene, die wie z.B. im Fall von *Sca1* mit einer veränderten Expression auf Proteinebene korrelierte (Abb. 4.11). ADAR1 kann, wie in 1.5 beschrieben, aber auch durch Editierung der mRNA-Transkripte posttranskriptionell die Genexpression auf Proteinebene verändern, ohne dass dies auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden kann. Deshalb ist es erforderlich entsprechende Gene auf Proteinebene zu untersuchen. Zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen für die beobachteten modulatorischen Eigenschaften von ADAR1 auf die Typ I IFN-Induktion und als Erweiterung der Microarray-Analysen (4.2.4) wurden wichtige Signalmoleküle innerhalb der Typ I IFN-Induktionskaskade mittels Western Blot (3.2.4) untersucht.

Dazu wurden ADAR1-defiziente ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}LysMCre^+$ ) und ADAR1-kompetente ( $ADAR1^{+/+}LysMCre^+$ ) M-CSF-generierte Makrophagen (3.4.2) mit LPS oder Sendai Virus (SeV) stimuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten Ganzzelllysate hergestellt (3.2.1). In Vorexperimenten wurden die entsprechenden Zeitpunkte für die Induktion der Signalmoleküle nach LPS-Stimulation mit 10 min, 30 min und 1 h Inkubation oder nach SeV Infektion mit 1 h, 4 h, 12 h und 20 h Inkubation ermittelt.

Die einzelnen Signalmoleküle innerhalb der Typ I IFN-Signalkaskade wurden in Abschnitt 1.3 beschrieben. Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den Western Blot-Analysen zu den einzelnen Signalmolekülen und ihren aktivierten, phosphorylierten Formen dargestellt. Untersucht wurden dabei TBK1 (TANK-binding kinase 1), IRF3 (Interferon regulatory factor 3), IRF7 (Interferon regulatory factor 7) sowie STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription).

Sowohl nach Stimulation mit LPS als auch nach Infektion mit SeV ließ sich eine generell erhöhte Expression aller untersuchten Signalmoleküle in den ADAR1-defizienten gegenüber den ADAR1-kompetenten Zellen feststellen (Abb. 4.12 und Abb. 4.13).

Nachstehend werden zunächst die Ergebnisse zur LPS-Stimulation beschrieben (Abb. 4.12). Zuerst wurde TBK1 untersucht. TBK1 ist eine IKK (I $\kappa$ B kinase)-aktivierende Kinase, die eine zentrale Rolle in der Aktivierung von IRF3 spielt (Fitzgerald, McWhirter et al. 2003). Eine bei Aktivierung entstehende Phosphorylierung in TBK1 an Serin 172 ist wichtig für die Kinase-Aktivität und damit für die nachfolgende Phosphorylierung von IRF3 (Kishore, Huynh et al. 2002; McCoy, Carpenter et al. 2008). In ADAR1-defizienten konnte im Gegensatz zu ADAR1-kompetenten Makrophagen bereits ohne Stimulation (0 h) TBK1 nachgewiesen werden. TBK1 zeigte die stärkste Expression nach 10 min, war aber auch nach 30 min, 1 h und 4 h Stimulation mit LPS detektierbar. In ADAR1-kompetenten Zellen konnte eine geringe TBK1-Expression

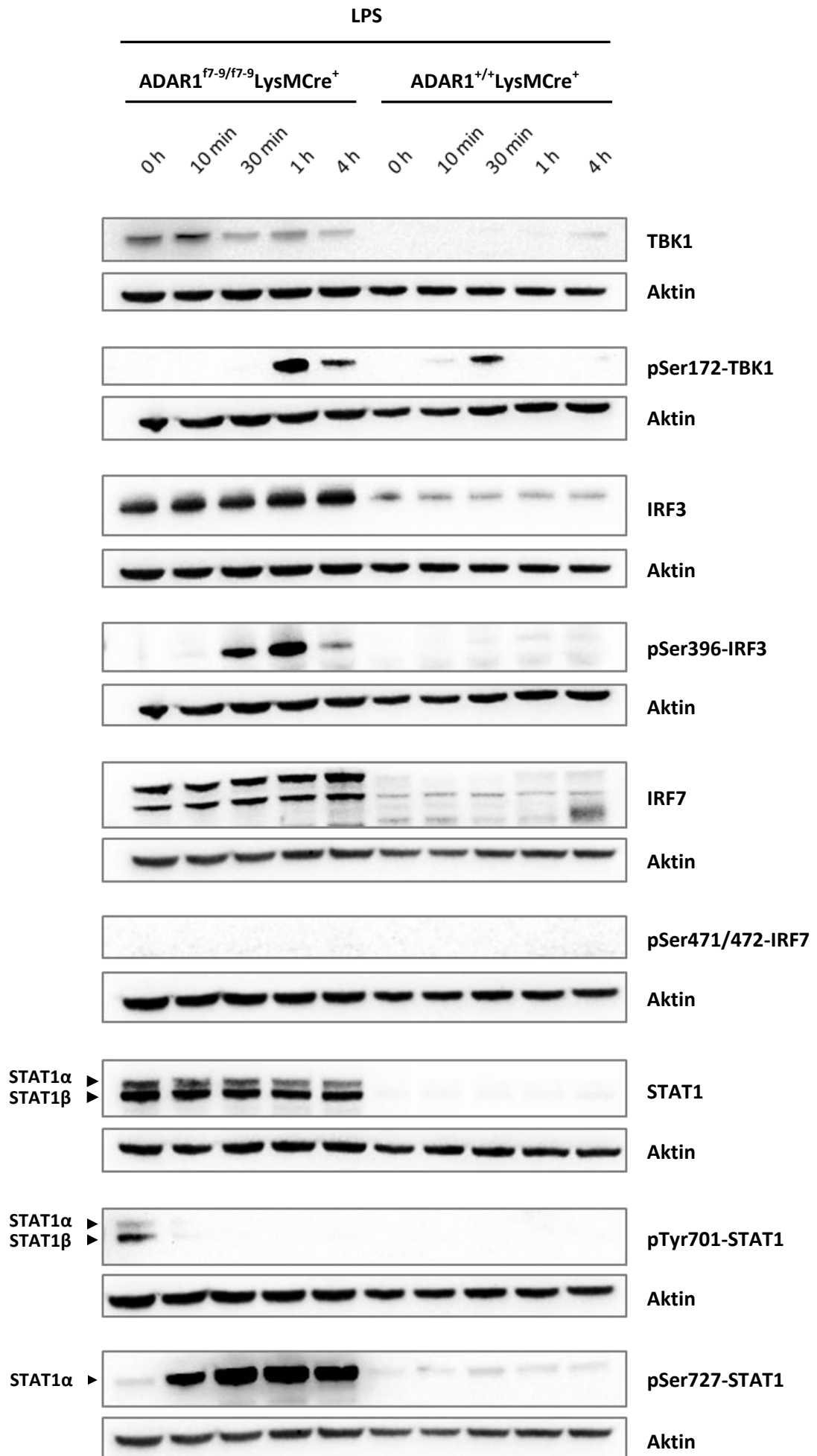
nach 30 min und 1 h beobachtet werden, die sich deutlich nach 4 h LPS-Behandlung zeigte. Eine Aktivierung von TBK1 in Form der Phosphorylierung war sowohl in ADAR1-defizienten als auch in ADAR1-kompetenten Zellen erst nach Stimulation mit LPS zu beobachten, zeigte aber abhängig von dem ADAR1-Status Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Während bei ADAR1-Defizienz phosphoryliertes TBK1 (pSer172-TBK1) erst nach 1 h nachweisbar war und dessen Expression nach 4 h abflachte, konnte bei Anwesenheit von ADAR1 eine geringe Menge von pTBK1 bereits nach 10 min detektiert werden, zeigte ein Maximum nach 30 min und war nach 1 h nicht mehr nachweisbar. Dabei war die Induktionsspitze von pTBK1 in ADAR1-defizienten Makrophagen nach 1 h deutlich ausgeprägter als in ADAR1-kompetenten Zellen nach 30 min. Wie erwähnt ist die Aktivierung von TBK1 wichtig für die Aktivierung von IRF3, deswegen wurde nachfolgend die Expression von IRF3 und dessen Aktivierung durch Stimulation mit LPS untersucht. IRF3 spielt eine Rolle bei der Transkription der *IFN*-Gene sowie der *IFN*-stimulierten Genen (ISGs) (Au, Moore et al. 1995). In unstimulierten Zellen wird IRF3 konstitutiv exprimiert und verbleibt im Zytoplasma. Die relativen Spiegel der IRF3-mRNA verändern sich auch bei Aktivierung der Zelle nicht (Lin, Heylbroeck et al. 1998). Durch Phosphorylierungsereignisse innerhalb des IRF3-Proteins kommt es aber zu einer Akkumulation von IRF3 im Nukleus, wo es durch Komplexbildung mit anderen Proteinen die Expression der *IFN*-Gene und der ISGs induziert (Kumar, McBride et al. 2000). Die genannten Phosphorylierungsereignisse können dabei an verschiedenen Aminosäuren erfolgen. Zum einen ist eine spezifische Phosphorylierung an Serin 385 und 386 beschrieben worden (Suhara, Yoneyama et al. 2000), zum anderen wurde auch ein alternatives Phosphorylierungscluster von Serin/Threonin zwischen den Positionen 396 und 405 nachgewiesen (Lin, Heylbroeck et al. 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivierung von IRF3 in Form von Phosphorylierung am Serin 396 nachgewiesen. Wie in der Literatur beschrieben, lag IRF3 unabhängig vom ADAR1-Status konstitutiv vor und die Expressionsstärken veränderten sich auch bei Stimulation der Zellen mit LPS nicht. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Erhöhung der konstitutiven IRF3-Spiegel in ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen. Wie auch schon für pTBK1 beobachtet werden konnte, führte die Stimulation mit LPS sowohl in ADAR1-defizienten als auch in ADAR1-kompetenten Zellen zu einer nachweisbaren Aktivierung von IRF3 in Form der Phosphorylierung. Aber auch hier zeigten sich abhängig von dem vorliegenden ADAR1-Status Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Bei ADAR1-Defizienz wurde phosphoryliertes IRF3 (pSer396-IRF3), früher als in ADAR1-kompetenten Zellen, bereits nach 10 min leicht induziert. Ein deutliches Signal zeigte sich nach 30 min und 1 h und flachte nach 4 h ab. Im Gegensatz dazu konnte bei Anwesenheit von ADAR1 ein Signal für pIRF3 erst nach 30 min detektiert werden, das nach 1 h und 4 h weiter zunahm. Insgesamt zeigte sich



ungeachtet der Unterschiede im zeitlichen Verlauf der IRF3-Aktivierung ein stark erhöhtes Signal für pIRF3 in ADAR1-defizienten Zellen.

Zur Induktion eines normalen Typ I IFN-Profiles ist zusätzlich zu IRF3 ein weiterer Faktor, IRF7, notwendig (Sato, Suemori et al. 2000). Dieser wird im Gegensatz zu IRF3 nur in geringen Mengen konstitutiv exprimiert und bei Aktivierung induziert (Marie, Durbin et al. 1998). Phosphorylierungsereignisse, die C-terminal an Serin in verschiedenen Positionen nachgewiesen wurden (Lin, Mamane et al. 2000; Yang, Lin et al. 2003; Caillaud, Hovanessian et al. 2005), führen schließlich zur Translokation von IRF7 in den Zellkern, wo dieser dann zur Induktion der *IFN*-Gene und ISGs beiträgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aktiviertes IRF7 mit Phosphorylierungen an Serin 471 und 472 nachgewiesen. Grundsätzlich wurden mehrere Transkriptvarianten von IRF7 identifiziert, jedoch für diese bisher noch keine funktionelle Bedeutungen beschrieben. Da IRF7 nur eine untergeordnete Rolle bei der LPS-vermittelten IFN $\beta$ -Induktion spielt (Sakaguchi, Negishi et al. 2003), wurde wie erwartet weder eine Induktion noch eine Phosphorylierung (pSer471/472-IRF7) von IRF7 in ADAR1-kompetenten Zellen nach LPS-Stimulation beobachtet. Jedoch war die IRF7-Expression in ADAR1-defizienten konstitutiv (0 h) stark erhöht und stieg nach Stimulation mit LPS sogar noch leicht über einen Zeitraum von 20 h an. Eine IRF7-Phosphorylierung blieb trotz erhöhter IRF7-Spiegel aber auch in ADAR1-defizienten Makrophagen aus.

Ein weiteres, zentrales Molekül in der Signalkaskade der Typ I IFN-Antwort stellt STAT1 dar. STAT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch eine große Anzahl von Liganden aktiviert werden kann, aber vor allem wichtig für die Typ I IFN-Rezeptor-vermittelte Signalgebung ist (Durbin, Hackenmiller et al. 1996; Meraz, White et al. 1996). STAT1 stellt damit ein wichtiges Element in der positiven Rückkopplungsschleife der Typ I IFN-Induktion dar (Marie, Durbin et al. 1998). STAT1 kommt in zwei Isoformen vor: STAT1 $\alpha$  (91kDa) und einer Spleißvariante STAT1 $\beta$  (84kDa) (Schindler, Fu et al. 1992). Für eine maximale STAT1-vermittelte Genaktivierung kann STAT1 an zwei Aminosäuren phosphoryliert werden. Zum einen am Tyrosin 701 (pTyr701-STAT1) und zum anderen am Serin 727 (pSer727-STAT1), das in der Spleißvariante STAT1 $\beta$  fehlt. Die Phosphorylierung von STAT1 führt dabei zur Dimerisierung, nukleären Translokation und DNA-Bindung an die entsprechenden, responsiven Elemente (Wen, Zhong et al. 1995). In ADAR1-defizienten Zellen wurde im Gegensatz zu ADAR1-kompetenten Zellen eine starke, konstitutive Expression beider STAT1-Isoformen beobachtet, die durch Stimulation mit LPS über den angegebenen Zeitraum von 10 min bis zu 4 h stabil blieb. In ADAR1-kompetenten Zellen wurde STAT1 erst durch LPS-Stimulation nach 4 h leicht induziert. Die ADAR1-Defizienz führte bereits in unbehandelten Zellen (0 h) zur Phosphorylierung am Tyrosin 701 (pTyr701-STAT1). Diese konnte in ADAR1-kompetenten Zellen nicht nachgewiesen werden.



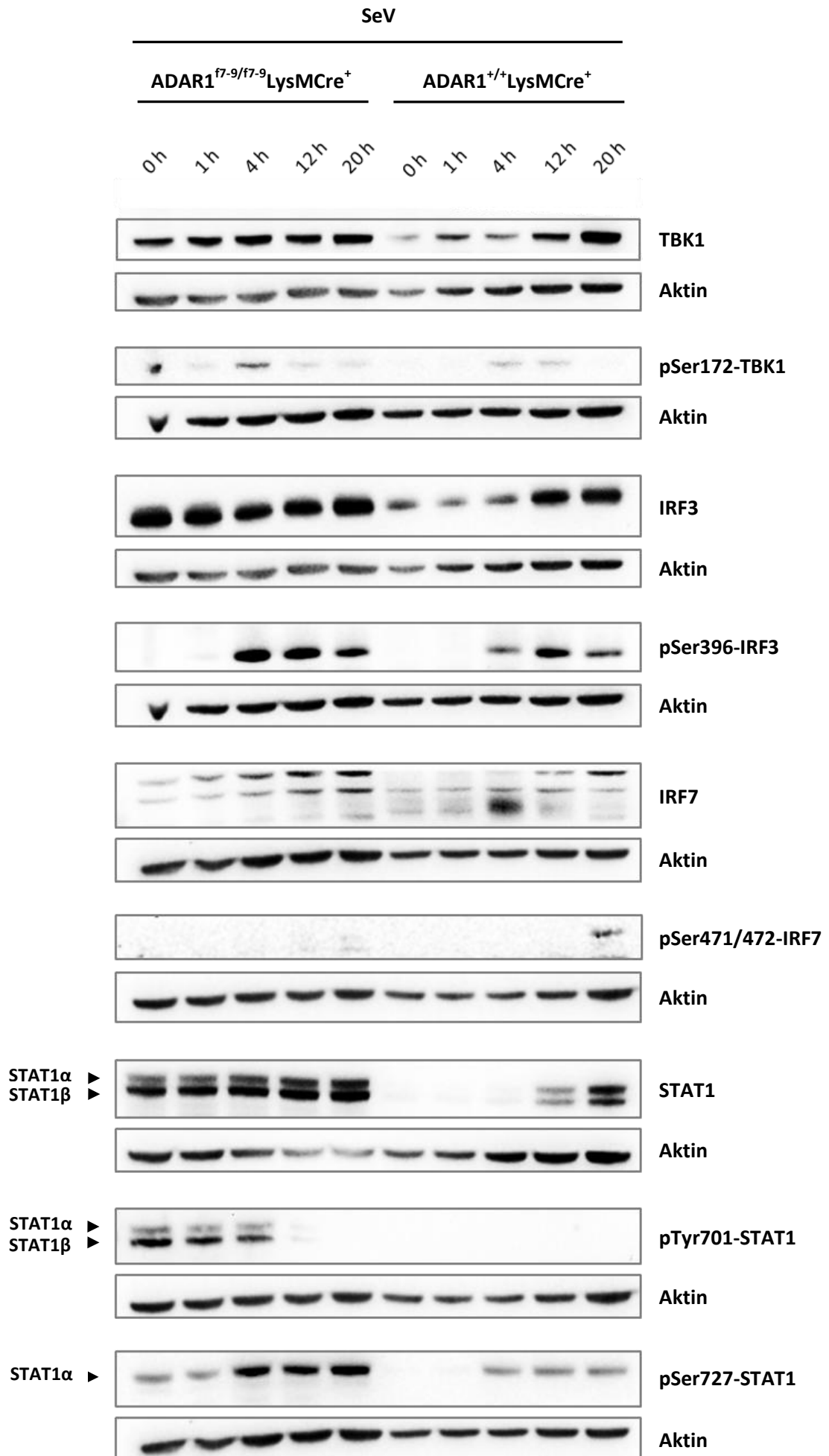
**Abb. 4.12 Expression wichtiger Signalmoleküle der Typ I IFN-Signalkaskade in Makrophagen nach Stimulation mit LPS.** ADAR1-defiziente ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}LysMCre^+$ ) oder ADAR1-kompetente ( $ADAR1^{+/+}LysMCre^+$ ) M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit LPS [1 µg/ml] stimuliert und Proteinlysate nach 0 h, 10 min, 30 min, 1 h und 4 h hergestellt. Die Expression von TBK1, IRF3, IRF7, STAT1 sowie deren aktivierten, phosphorylierten Formen wurden mittels Western Blot nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin nach dem Strippen der Membran diente als Ladekontrolle. TBK1 und IRF3, pTBK1 und pIRF3, sowie pIRF7 und pTyr701-STAT1 konnten aufgrund der großen Laufunterschiede in der SDS-PAGE auf dem gleichen Blot nachgewiesen werden. Dementsprechend sind die Ladekontrollen für die Proteine, die auf demselben Blot nachgewiesen wurden, identisch. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Diese Phosphorylierung war aber nach Stimulation der ADAR1-defizienten Zellen mit LPS nicht mehr detektierbar. Eine weitere Phosphorylierung am Serin 727 (pSer727-STAT1) lag zusätzlich verstärkt in unbehandelten ADAR1-defizienten Zellen (0 h) vor, wobei durch Stimulation mit LPS nach 10 min erhöhte Spiegel induziert werden konnten. Demgegenüber wurde in ADAR1-kompetenten Zellen eine Phosphorylierung am Serin 727 (pSer727-STAT1) erst durch Stimulation mit LPS nach 30 min leicht induziert, deren Spiegel aber deutlich unter denen in ADAR1-defizienten Zellen blieb.

Durch die Untersuchung der hier angegebenen Signalmoleküle ließ sich im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen bereits in unbehandelten (0 h), ADAR1-defizienten Zellen eine ausgeprägte Typ I IFN-Signatur feststellen, die überwiegend durch Stimulation mit LPS verstärkt wurde.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden ADAR1-defiziente und ADAR1-kompetente Makrophagen mit SeV infiziert und die Expression und Aktivierung der angegebenen Signalmoleküle nach den indizierten Zeitpunkten analysiert. Im folgenden Abschnitt werden die entsprechenden Ergebnisse hierzu beschrieben (Abb. 4.13).

Wie Abb. 4.12 schon zeigte, konnte auch hier in ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Makrophagen bereits ohne Stimulation (0 h) eine erhöhte TBK1-Expression nachgewiesen werden. Die TBK1-Expression blieb nach Infektion mit SeV (1 h, 4 h, 12 h) stabil und erhöhte sich leicht nach 20 h. In ADAR1-kompetenten Zellen stieg die TBK1-Expression durch Infektion mit SeV nach 1 h deutlich an. Nach 20 h konnten vergleichbare TBK1-Mengen in diesen Zellen detektiert werden, wie in ADAR1-defizienten Zellen. Eine Aktivierung von TBK1 in Form der Phosphorylierung war sowohl in ADAR1-defizienten, als auch in ADAR1-kompetenten Zellen erst nach Infektion mit SeV zu beobachten, zeigte aber auch hier, ähnlich wie nach LPS-Stimulation (Abb. 4.12) Unterschiede im zeitlichen Verlauf abhängig vom ADAR1-Status. Während bei ADAR1-Defizienz phosphoryliertes TBK1 (pSer172-TBK1) nach 1 h nachweisbar war, dessen Expression nach 4 h ein Maximum erreichte und schließlich nach 12 h und 20 h abflachte, konnte bei Anwesenheit von ADAR1 pTBK1 erst nach 4 h induziert werden.



**Abb. 4.13 Expression wichtiger Signalmoleküle der Typ I IFN-Signalkaskade in Makrophagen nach Infektion mit Sendai Virus.** ADAR1-defiziente (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) oder ADAR1-kompetente (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>) M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit Sendai Virus (SeV) [1 MOI] infiziert und Proteinlysate nach 0 h, 1 h, 4 h, 12 h und 20 h hergestellt. Die Expression von TBK1, IRF3, IRF7, STAT1 sowie deren aktivierten, phosphorylierten Formen wurden mittels Western Blot nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin nach dem Strippen der Membran diente als Ladekontrolle. TBK1 und IRF3, pTBK1 und pIRF3, sowie pIRF7 und pTyr701-STAT1 konnten aufgrund der großen Laufunterschiede in der SDS-PAGE auf dem gleichen Blot nachgewiesen werden. Dementsprechend sind die Ladekontrollen für die Proteine, die auf demselben Blot nachgewiesen wurden, identisch. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

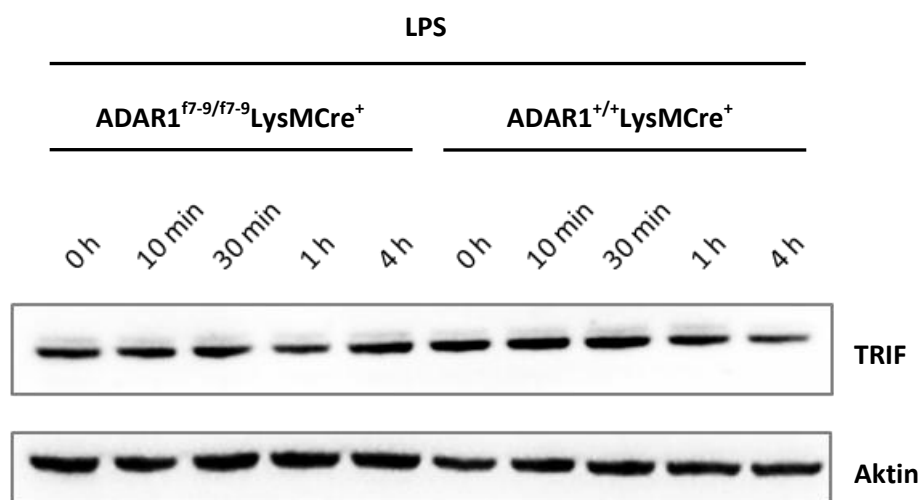
Das Signal für pTBK1 blieb in ADAR1-kompetenten Zellen bis zu 12 h stabil, war aber 20 h nach Infektion mit SeV nicht mehr detektierbar. Hierbei wurde aber nicht dieselbe Expressionsstärke von pTBK1 erreicht, wie in ADAR1-defizienten Zellen nach 4 h der SeV Infektion beobachtet. IRF3 lag unabhängig vom ADAR1-Status konstitutiv vor. Jedoch zeigte sich im unbehandelten Status (0 h) eine deutliche Erhöhung der konstitutiven IRF3-Spiegel in den ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen. In ADAR1-kompetenten Zellen wurden die IRF3-Mengen durch Infektion mit SeV nach 12 h und 20 h auf vergleichbare Spiegel induziert. Die Infektion mit SeV führte nach 4 h sowohl in ADAR1-defizienten als auch in ADAR1-kompetenten Zellen zu einer nachweisbaren Aktivierung von IRF3 in Form der Phosphorylierung (pSer396-IRF3). Bei ADAR1-Defizienz waren jedoch die induzierten pIRF3-Spiegel nach 4h deutlich erhöht und flachten erst nach 20 h leicht ab, während in ADAR1-kompetenten Zellen pIRF3 nach 4 h induziert wurde, die induzierten pIRF3-Spiegel nach 12 h ein Maximum erreichten und schließlich nach 20 h wieder abflachten. Somit war für IRF3 bei ADAR1-Defizienz eine zeitlich früher einsetzende, verstärkte und länger anhaltende Aktivierung zu beobachten.

Nach SeV Infektion ließ sich über den zeitlichen Verlauf von 1 h bis zu 20 h sowohl in ADAR1-defizienten als auch in ADAR1-kompetenten Makrophagen ein Anstieg der IRF7-Mengen beobachten, jedoch führte die ADAR1-Defizienz schon in unbehandelten Zellen (0h) zu einem konstitutiv höherem Spiegel an IRF7 im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen. Entsprechend ging die IRF7-Induktion in diesen Zellen auch zu den einzelnen Zeitpunkten mit einer erhöhten IRF7-Expression einher. Bezüglich der Expression der aktivierten, phosphorylierten IRF7-Form (pSer471/472-IRF7) konnte in ADAR1-kompetenten Zellen eine Aktivierung detektiert werden, die in den ADAR1-defizienten Zellen trotz der konstitutiv erhöhten IRF7-Spiegel abgeschwächt war.

In ADAR1-defizienten Zellen konnte, wie schon bei LPS-Stimulation beobachtet (Abb. 4.12), eine gegenüber ADAR1-kompetenten Zellen deutlich erhöhte konstitutive Expression beider STAT1-Isoformen beobachtet werden, die auch nach Infektion mit SeV über den angegebenen Zeitraum von 1 h bis 12 h stabil blieb bzw. leicht anstieg. Wesentlich schwächer wurde STAT1 in den ADAR1-kompetenten Zellen exprimiert, wobei STAT1 nach 4 h leicht induziert wurde

und schließlich nach 20 h eine deutliche Expression nachweisbar war. Darüber hinaus führte die ADAR1-Defizienz bereits in unbehandelten Zellen (0 h) zur Phosphorylierung am Tyrosin 701 (pTyr701-STAT1), die in ADAR1-kompetenten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Die Stärke des pSTAT1-Signals in diesen Zellen nahm jedoch durch Infektion mit SeV ab, bis nach 20h kein pTyr701-STAT1 mehr detektierbar war. Eine weitere Phosphorylierung am Serin 727 (pSer727-STAT1) lag verstärkt in unbehandelten (0 h), ADAR1-defizienten Zellen vor, wobei durch SeV Infektion nach 4 h zusätzlich erhöhte Spiegel induziert wurden. Demgegenüber wurde in ADAR1-kompetenten Zellen eine Phosphorylierung am Serin 727 erst durch Infektion mit SeV nach 4 h induziert, deren Spiegel aber unter denen in ADAR1-defizienten Zellen blieb - wie auch schon nach LPS-Stimulation beobachtet wurde (Abb. 4.12).

Da erhöhte IFN $\beta$ -Spiegel nur nach TLR3- und TLR4-Ligation beobachtet wurden und diese beiden TLRs die einzigen sind, die die Signalgebung zur Typ I IFN-Induktion über das Adaptermolekül TRIF steuern wurde zusätzlich zu den bisher gezeigten Signalmolekülen die Proteinexpression des Adaptermoleküls TRIF nach Stimulation mit LPS in Makrophagen untersucht (Abb. 4.14). Bezüglich der TRIF-Expression zeigten sich dabei allerdings keine Unterschiede zwischen ADAR1-defizienten und ADAR1-kompetenten Makrophagen. Über die hier untersuchten Zeitpunkte (0 h, 10 min, 30 min, 1 h und 4 h) hinaus wurden in anderen Experimenten noch weitere spätere Zeitpunkte bis zu 20 h nach LPS-Stimulation untersucht. Aber auch zu diesen Zeitpunkten waren keine Unterschiede bezüglich der TRIF-Proteinexpression nachweisbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.14 TRIF-Expression in Makrophagen nach Stimulation mit LPS.** ADAR1-defiziente ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}LysMCre^+$ ) oder ADAR1-kompetente ( $ADAR1^{+/+}LysMCre^+$ ) M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] stimuliert und Proteinlysate nach 0 h, 10 min, 30 min, 1 h und 4 h hergestellt. Die Proteinexpression von TRIF wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Der Nachweis von Aktin diene als Ladekontrolle. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Durch die Untersuchung der hier angegebenen Signalmoleküle ließ sich im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen bereits in unbehandelten (0 h), ADAR1-defizienten Zellen eine ausgeprägte Typ I IFN-Signatur feststellen. Diese Beobachtung konnte auch nach LPS-Stimulation gemacht werden (Abb. 4.12), wobei, entsprechend der erhöhten Expression von Signalmolekülen innerhalb der Typ I IFN-Signalkaskade, nach LPS Stimulation eine erhöhte Freisetzung von IFN $\beta$  in ADAR1-defizienten Makrophagen nachgewiesen wurde (Abb. 4.6 B). Dagegen kam es nach SeV-Infektion zu einer stark reduzierten Freisetzung von IFN $\beta$ . Darüber hinaus war eine IFN $\alpha$ -Sekretion in diesem Zusammenhang im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Makrophagen kaum noch detektierbar (Abb. 4.6 A). Da die IRF7-Aktivierung einen wichtigen Schritt für ein vollständiges Induktionsprofil aller IFN $\alpha$ -Subtypen darstellt (Servant, Tenover et al. 2002), wird durch die Beobachtung der verminderten Phosphorylierung von IRF7 (p471/472-IRF7) in diesem Zusammenhang eine Reduzierung der IFN $\alpha$ -Sekretion verständlich. Da aber eine deutlich verstärkte Aktivierung von IRF3 (pSer396-IRF3) in ADAR1-defizienten Makrophagen verzeichnet wurde, bleibt die starke Reduzierung der IFN $\beta$ -Freisetzung unverstanden (Abb. 4.6 B).

Während also auf Ebene der IFN $\beta$ -Sekretion eine Stimulation mit LPS oder Infektion mit SeV zu deutlich unterschiedlichen Sekretionsprofilen in ADAR1-defizienten Makrophagen führte (Abb. 4.6), waren in diesem Zusammenhang überraschenderweise keine großen Unterschiede auf Ebene der Signalmoleküle festzustellen: Sowohl nach LPS-Stimulation als auch nach SeV Infektion waren diese in ADAR1-defizienten gegenüber ADAR1-kompetenten Zellen erhöht. Um zu verstehen, warum trotz der erhöhten Expression entsprechender Signalmoleküle in ADAR1-defizienten Makrophagen nach SeV Infektion die Sekretion von IFN $\beta$  reduziert war, wurde nachfolgend die Translokation der IFN-regulierenden Faktoren IRF3 und IRF7 untersucht.

#### **4.2.6. IRF3- und IRF7-Translokation**

Wie zuvor beschrieben konnten nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden ADAR1-abhängige Effekte bezüglich der Typ I IFN-Freisetzung in M-CSF-generierten Makrophagen beobachtet werden (4.2.2). Während eine ADAR1-Defizienz bei TRIF-abhängigen Stimulanzen, wie LPS oder PolyI:C, zu einer erhöhten IFN $\beta$ -Freisetzung führte, kam es nach Infektion bzw. Stimulation mit Sendai Virus (SeV) oder dem VACV70mer DNA-Motiv (VACV70mer) zu einer stark reduzierten Sekretion von IFN $\beta$  (Abb. 4.6 B). Eine Untersuchung wichtiger Signalmoleküle innerhalb der Typ I IFN-Induktionskaskade, die die beobachteten Effekte bei der Zytokinexpression auf veränderte Expressionsprofile eines oder mehrerer dieser Moleküle zurückführen sollte (4.2.5), ergab bereits in unbehandelten (0 h), ADAR1-defizienten Zellen eine aus-

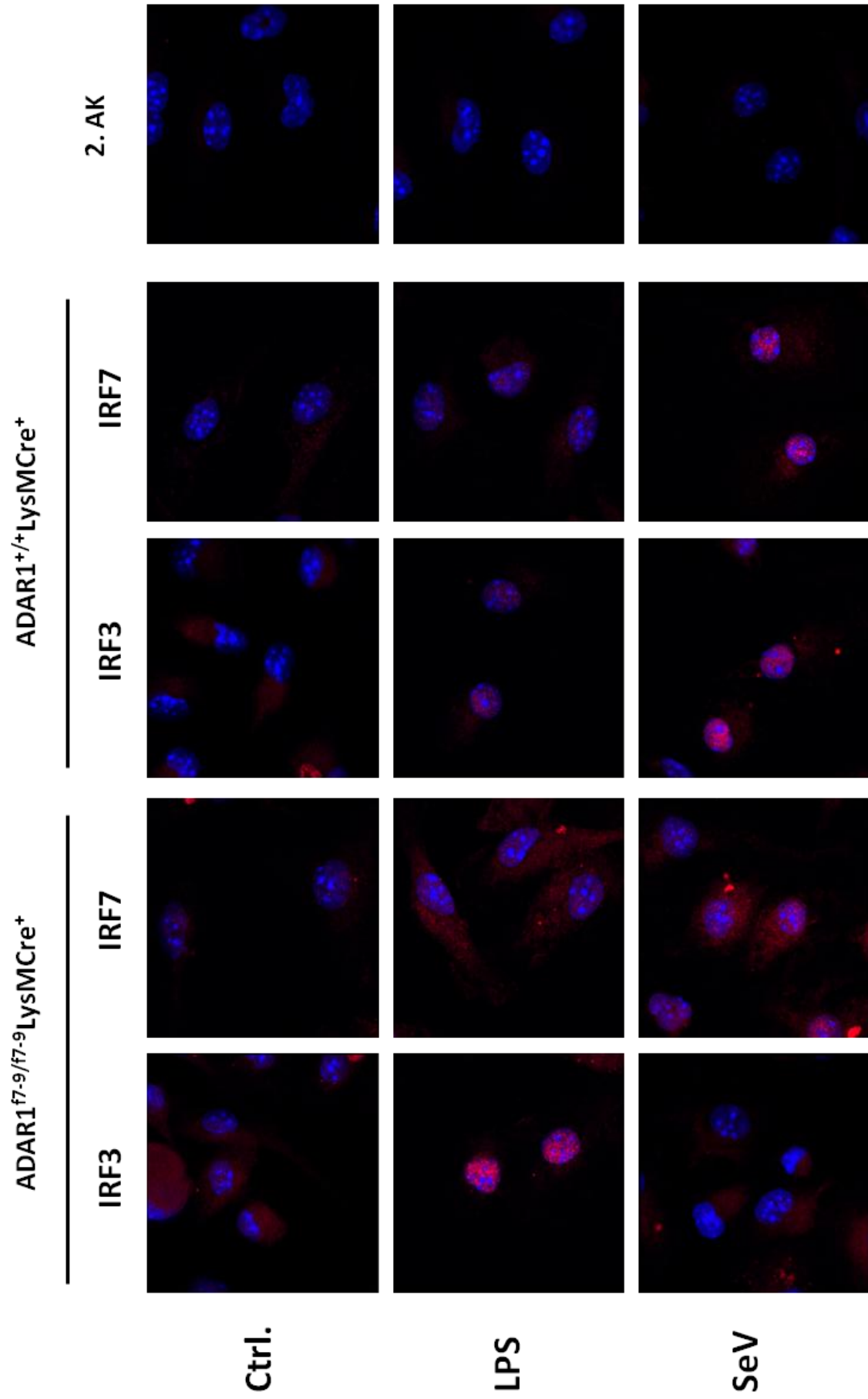
geprägte Typ I IFN-Signatur. Diese wurde durch Stimulation oder Infektion mit LPS oder SeV überwiegend noch verstärkt (Abb. 4.12 und Abb. 4.13). Nach LPS-Stimulation folgte der verstärkten Typ I IFN-Signatur konsequent eine erhöhte IFN $\beta$ -Freisetzung, die nach Infektion mit SeV einer starken Reduzierung unterlag. Da zentrale Schlüsselmoleküle in der Typ I IFN-Induktionskaskade durch die IFN-regulierenden Faktoren IRF3 und IRF7 beschrieben werden (Servant, Tenover et al. 2002) und v.a. die Expression und, wie in 4.2.5 beschrieben, die Aktivierung von IRF3 in ADAR1-defizienten Makrophagen auch nach SeV Infektion deutlich erhöht war, sollte im Folgenden untersucht werden, ob durch die ADAR1-Defizienz Veränderungen in der Translokation von IRF3 und/oder IRF7 in den Zellkern verursacht wurden.

Dazu wurden Immunfluoreszenz-Färbungen gegen IRF3 und IRF7 etabliert (3.6) und die IRF-Translokation nach LPS-Stimulation oder Infektion mit SeV in ADAR1-defizienten und ADAR1-kompetente M-CSF-generierten Makrophagen (3.4.2) untersucht. Die Zellen wurden 1 h nach LPS-Stimulation bzw. 12 h nach SeV Infektion fixiert und für die Immunfluoreszenz mit einem spezifischen Antikörper gegen IRF3 oder IRF7 inkubiert. Die Expression der IRFs wurde mit einem Fluoreszenz-gekoppelten, sekundären Antikörper detektiert. Dies führte zu einer roten Färbung der IRFs (Abb. 4.15). Die Zellkerne wurden mit DAPI, einem fluoreszierenden, DNA-bindenden Farbstoff, gegengefärbt und hatten somit eine blaue Erscheinung (Abb. 4.15). Die gewählten Zeitpunkte richteten sich nach den im Western Blot gezeigten Induktionsspitzen von aktiviertem, phosphoryliertem IRF3 (pSer396-IRF3) nach LPS-Stimulation (Abb. 4.12) sowie nach SeV Infektion (Abb. 4.13). Um eine unspezifische Färbung auszuschließen, wurden für alle Ansätze Sekundärantikörper-Kontrollen durchgeführt (2. AK). Die hier abgebildeten 2. AK-Kontrollen von ADAR1-kompetenten Makrophagen sind repräsentativ für alle durchgeführten 2. AK-Kontrollen (Abb. 4.15) und sind vollständig im Anhang abgebildet (IV).

Unstimulierte Kontrollzellen (Ctrl.) zeigten kein Signal für die untersuchten IRFs im Nukleus. Wie erwartet konnte nach LPS-Stimulation eine IRF3-Translokation in die Zellkerne ADAR1-kompetenter Zellen beobachtet werden, angedeutet durch die rote Färbung für IRF3, die sich mit der blauen Kernfärbung überlagerte. Diese Translokation war sogar noch effizienter in ADAR1-defizienten Makrophagen zu beobachten, im Einklang mit der beobachteten erhöhten IFN $\beta$ -Freisetzung (Abb. 4.6, B). Die LPS-Stimulation führte weder in ADAR1-kompetenten noch in ADAR1-defizienten Zellen zu einem deutlichen IRF7-Signal im Zellkern, entsprechend den bisherigen Kenntnissen über eine IRF7-unabhängige Signalgebung nach LPS-Stimulation (Sakaguchi, Negishi et al. 2003).

In ADAR1-kompetenten Zellen konnte nach SeV Infektion eine intensive Translokation von IRF3 und IRF7 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu blieb in ADAR1-defizienten Zellen eine IRF3-Translokation vollständig aus.





**Abb. 4.15 Translokation von IRF3 und IRF7 in Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder SeV.** ADAR1-defiziente ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}LysMCre^+$ ) oder ADAR1-kompetente ( $ADAR1^{+/+}LysMCre^+$ ) M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] stimuliert, mit Sendai Virus (SeV) [2 MOI] infiziert oder unbehandelt belassen (Ctrl). Die Zellen wurden nach 1 h (LPS) oder 12 h (SeV) fixiert und gefärbt. Die Zellen wurden mit einem spezifischen ersten Antikörper gegen IRF3 oder IRF7 inkubiert und über einen Fluoreszenz-markierten, sekundären Antikörper detektiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Die Immunfluoreszenzen wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Die entsprechenden Sekundärantikörper-Kontrollen (2.AK) sind repräsentativ anhand ADAR1-kompetenter Makrophagen dargestellt. Alle 2. AK-Kontrollen sind im Anhang abgebildet (IV). Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Auch die IRF7-Translokation war schwächer, was zum einen als Konsequenz der fehlenden IRF3-Translokation in ADAR1-defizienten Zellen verstanden werden kann und zum anderen auch durch die verminderte IRF7-Phosphorylierung und damit durch die verminderte IRF7-Aktivierung verursacht wurde (Abb. 4.13).

Aufgrund dieser Beobachtungen wird verständlich, warum eine reduzierte  $IFN\beta$ - und  $IFN\alpha$ -Freisetzung gemessen wurde, obwohl die Expression sowie die Phosphorylierung von IRF3 nach SeV Infektion verstärkt war. Denn trotz der erhöhten Induktion der verantwortlichen Signalmoleküle, fehlte eine entsprechende Translokation von IRF3, die v.a. für die Transkription des  $IFN\beta$ -Gens zwingend notwendig ist.

### 4.3. $ADAR1^{f7-9}/CD11cCre$ -Maus

Im nächsten Themenschwerpunkt werden die Ergebnisse zu dem  $ADAR1^{f7-9}/CD11cCre$  Mausmodell (3.3.2) vorgestellt. In diesem Mausmodell kommt es in CD11c-exprimierenden Zellen zu einem ADAR1-Knockout. Dazu gehören dendritische Zellen (DCs), natürliche Killerzellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und einige Lymphozyten (Cabanas and Sanchez-Madrid 1999). Zum einen sollten dabei die im  $ADAR1^{f7-9}/LysMCre$ -Mausmodell beobachteten modulatorischen Effekte von ADAR1 auf die Typ I  $IFN$ -Antwort in Makrophagen (4.2.2) unter Verwendung eines weiteren konditionellen ADAR1-Knockout Mausmodells bestätigt werden. Zum anderen sollten zusätzlich dendritische Zellen (DCs) auf mögliche ADAR1-abhängige Effekte untersucht werden. Dabei sollte sich auch herausstellen, ob die bisher beobachteten ADAR1-Effekte Makrophagen-spezifisch sind oder ein Zelltyp-übergreifender Phänotyp vorliegt.

Homozygot ADAR1-gefloxte, CD11cCre-positive Mäuse ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ ) dienten dabei als Donor für ADAR1-defiziente Zellkulturen. Zellkulturen aus Mäusen, die kein gefloxtes ADAR1-Allel trugen, dennoch aber CD11cCre-positiv waren ( $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ ) wurden als ADAR1-kompetente Kontrollen eingesetzt.

Das Mausmodell und die entsprechende Strategie zur Genotypisierung wurden in 3.3.2 dargestellt.

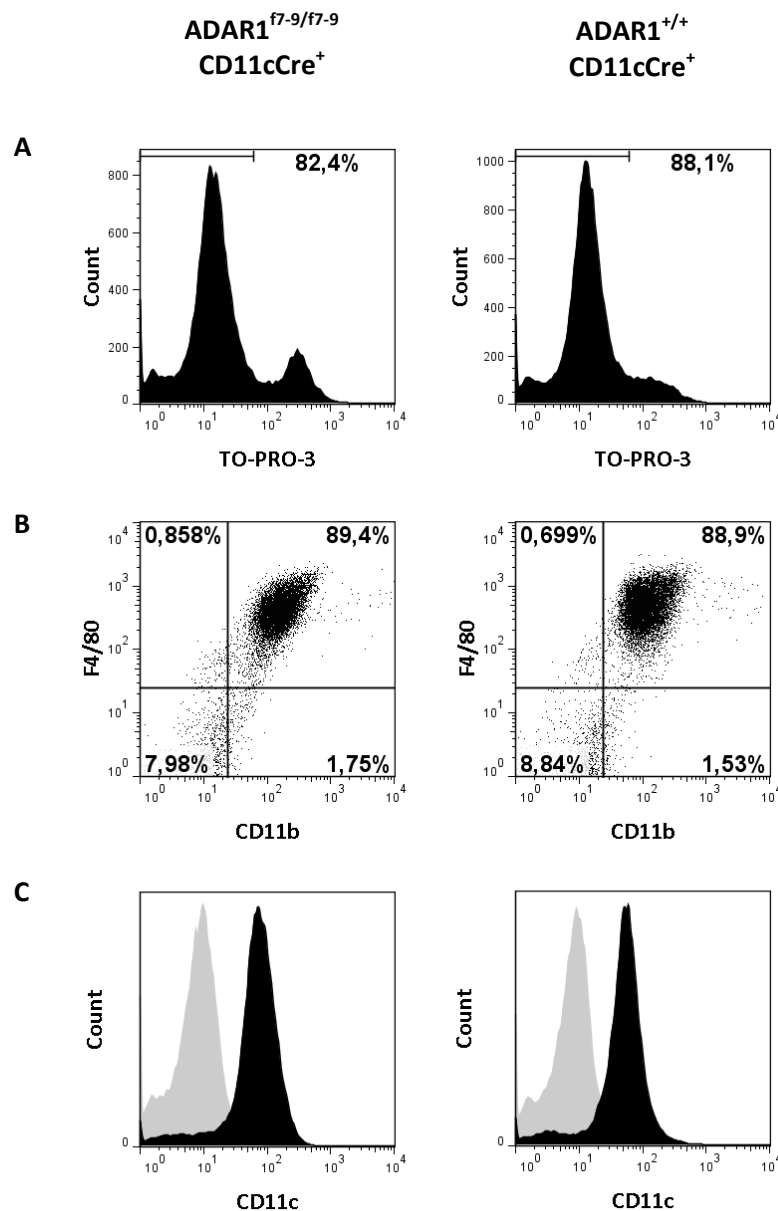
### 4.3.1. Differenzierung verschiedener CD11c-exprimierender Zellpopulationen

Knochenmarkszellen wurden mittels M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) zu Makrophagen (3.4.2), mittels Flt3L (FMS like tyrosine kinase 3 Ligand) zu plasmazytoiden dendritischen Zellen (3.4.3) sowie mittels GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) zu myeloiden dendritischen Zellen (3.4.4) differenziert. Die Ergebnisse dazu werden in einzelnen Abschnitten dargestellt.

Die differenzierten Zellen aus dem Knochenmark homozygot ADAR1-gefloxter, CD11cCre-positiver ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ ) und als Kontrollen, nicht-gefloxter, CD11cCre-positiver Mäuse ( $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ ) wurden anschließend zur Analyse der immunregulatorischen Rolle von ADAR1, wie schon in 4.2.2 beschrieben, bezüglich ihres Zytokinprofils nach Stimulation mit verschiedenen PRR (pattern recognition receptor)-Liganden untersucht (4.3.2).

#### 4.3.1.1. Differenzierung von Makrophagen

Die Makrophagen wurden in einer Knochenmarkskultur *in vitro* mit M-CSF differenziert (3.3.3 und 3.4.2). Die Differenzierung der Zellen wurde durchflusszytometrisch (3.5) über die Oberflächenmoleküle F4/80 und CD11b kontrolliert. Dabei zeigten die Kulturen unabhängig vom ADAR1-Status mit 89,4% bzw. 88,9% eine vergleichbare Anreicherung von F4/80- und CD11b-positiven Makrophagen (Abb. 4.16 B). Durch eine Färbung der Zellen mit TO-PRO-3 wurde darüber hinaus eine erhöhte Anzahl toter Zellen in der ADAR1-defizienten Kultur ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ ) gegenüber der ADAR1-kompetenten Kultur ( $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ ) ausgeschlossen (Abb. 4.16 A). Da der ADAR1-Knockout in diesen Zellen abhängig von der Aktivität des CD11c-Promotors war, wurde zusätzlich die CD11c-Expression untersucht. Sowohl ADAR1-defiziente als auch ADAR1-kompetente Makrophagen waren dabei positiv für CD11c. Somit war die Aktivität des Promotors nicht beeinträchtigt (Abb. 4.16 C).

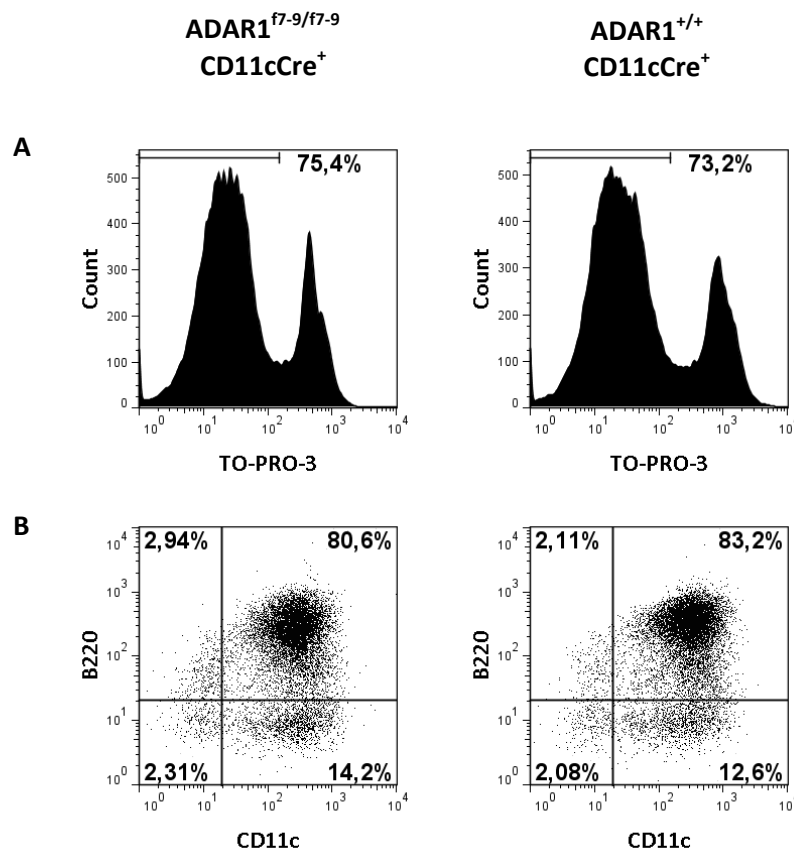


**Abb. 4.16 Kontrolle der Makrophagendifferenzierung.** (A) Die Kulturen wurden über eine Färbung mit TO-PRO-3 auf tote Zellen überprüft. (B) Die Differenzierung der Zellen zu Makrophagen wurde durch den Nachweis der Oberflächenmoleküle F4/80 und CD11b kontrolliert. (C) Zusätzlich wurde die Expression von CD11c (CD11c = schwarz schattiert; ungefärbt = grau schattiert) nachgewiesen. Dargestellt sind die Analysen von Makrophagenkulturen einer ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup> CD11cCre<sup>+</sup>- und einer ADAR1<sup>+/+</sup> CD11cCre<sup>+</sup>-Maus. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

#### 4.3.1.2. Differenzierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen

Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) wurden in einer Knochenmarkskultur *in vitro* mit Flt3L differenziert (3.3.3 und 3.4.3). Die Differenzierung der Zellen wurde auch hier durchflusszytometrisch (3.5) überprüft. Dazu dienten die Oberflächenmoleküle B220 und CD11c als Marker. Die Differenzierung war unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz. Die Zellen zeigten unabhängig vom ADAR1-Status mit 80,6% bzw. 83,2% eine vergleichbare Anreicherung von

B220- und CD11c-positiven dendritischen Zellen (Abb. 4.17 B). Darüber hinaus konnte durch eine Färbung der Zellen mit TO-PRO-3 eine Anreicherung toter Zellen in der ADAR1-defizienten ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ ) gegenüber der ADAR1-kompetenten Kultur ( $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ ) auch hier ausgeschlossen werden (Abb. 4.17 A).



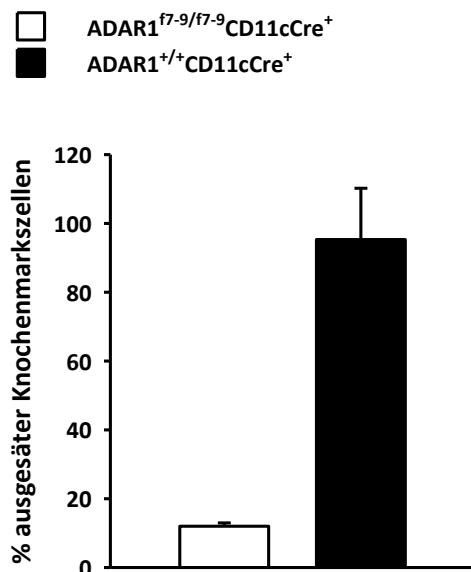
**Abb. 4.17 Kontrolle der pDC-Differenzierung.** (A) Die Kulturen wurden über eine Färbung mit TO-PRO-3 auf tote Zellen überprüft. (B) Die Differenzierung der Zellen zu dendritischen Zellen wurde durch den Nachweis der Oberflächenmoleküle B220 und CD11c kontrolliert. Dargestellt sind die Analysen von pDC-Kulturen einer  $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ - und einer  $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ -Maus. Repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

#### 4.3.1.3. Differenzierung von myeloiden dendritischen Zellen

Entsprechend den zuvor beschriebenen Differenzierungsprotokollen wurden myeloide dendritische Zellen (mDCs) aus Knochenmarkszellen durch Zugabe des Differenzierungs- und Wachstumsfaktors GM-CSF gewonnen (3.3.3 und 3.4.4).

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen *in vitro* Differenzierungen zu Makrophagen (4.3.1.1) oder plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) (4.3.1.2), konnten überraschenderweise nach Kultivierung der Knochenmarkszellen mit GM-CSF in den ADAR1-defizienten Kulturen ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ ) lediglich ca. 15% der ausgesäten Zellen gerettet werden. In

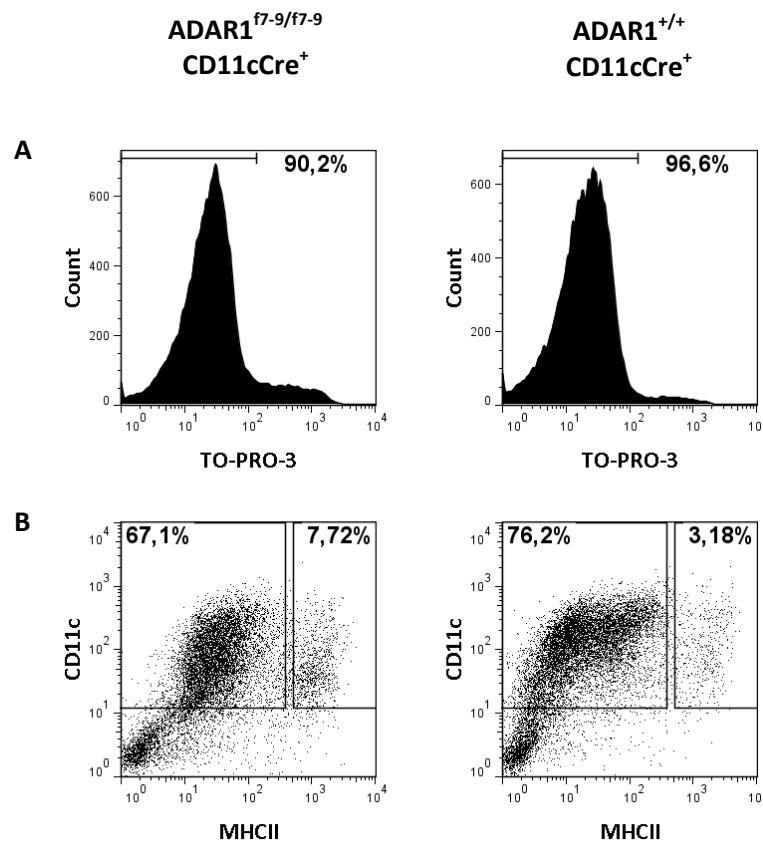
ADAR1-kompetenten Kulturen ( $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ ) wurde eine für GM-CSF-Kulturen typische Ausbeute von bis zu 100% erreicht (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18 Zell-Ausbeute in mDC-Kulturen.** Zellen aus ADAR1-defizienten ( $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ , weiß) und ADAR1-kompetenten ( $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ , schwarz) GM-CSF-Kulturen wurden geerntet und die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil der geernteten Zellen in Bezug auf die ausgesäte Zellzahl. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Differenzierung der Zellen wurde durchflusszytometrisch (3.5) über die Oberflächenmoleküle CD11c und MHCII kontrolliert (Abb. 4.19 B). Dabei zeigten Zellen der ADAR1-kompetenten Kultur eine mit 76,2% für diese Kultur typische Anreicherung CD11c-positiver dendritischer Zellen mit einer niedrigen bis intermediären Expression von MHCII. Nur 3,18% der CD11c-positiven Zellen zeigten eine hohe MHCII-Expression. Während zwar ca. 75% der verbleibenden Zellen der ADAR1-defizienten Kultur CD11c-positiv waren, zeigten diese aber bezüglich MHCII ein verändertes Expressionsprofil. Mit 7,72% war die Population der CD11c-positiven, hoch-MHCII-exprimierenden Zellen um das Doppelte gegenüber der ADAR1-kompetenten Kultur erhöht. Während in der ADAR1-kompetenten Kultur zwei CD11c-positiv Populationen mit niedriger und intermediärer MHCII-Expression voneinander unterschieden werden konnten, kam es hier in der ADAR1-defizienten Kultur zu einer Verschiebung der MHCII-Expression. In Folge war in der ADAR1-defizienten Kultur nur noch eine Population vorhanden, die bezüglich der MHCII-Expression zwischen denen der niedrig- und der intermediär-MHCII-exprimierenden Population lag.

Durch eine Färbung der Zellen mit TO-PRO-3 wurde darüber hinaus der Anteil an toten Zellen in der ADAR1-defizienten gegenüber der ADAR1-kompetenten Kultur überprüft. Dabei wurde aber lediglich eine leichte Zunahme der TO-PRO-3-positiven Zellen beobachtet (Abb. 4.19 A).



**Abb. 4.19 Kontrolle der mDC-Differenzierung.** (A) Die Kulturen wurden über eine Färbung mit TO-PRO-3 auf tote Zellen überprüft. (B) Die Differenzierung der Zellen zu dendritischen Zellen wurde durch den Nachweis der Oberflächenmoleküle CD11c und MHCII überprüft. Dargestellt sind die Analysen von mDC-Kulturen einer ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup> CD11cCre<sup>+</sup>- und einer ADAR1<sup>+/+</sup> CD11cCre<sup>+</sup>-Maus. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

#### 4.3.2. Typ I Interferon-Freisetzung der differenzierten Zellen nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden

Zur Untersuchung der Rolle von ADAR1 auf die Typ I IFN-Antwort im ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre- Mausmodell wurden nach Stimulation mit verschiedenen PRR-Liganden sowohl ADAR1-defiziente Makrophagen (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>+</sup>) (4.3.1.1) als auch ADAR1-defiziente plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>+</sup>) (4.3.1.2) im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen (ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>+</sup>) im Hinblick auf die Freisetzung der Typ I IFN, IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ , analysiert. ADAR1-defiziente myeloide dendritische Zellen (mDCs) konnten diesbezüglich nicht untersucht werden, da wie in 4.3.1.3 beschrieben die ADAR1-Defizienz in diesen Kulturen die mDC-Differenzierung verhinderte.

Für die Analysen der differenzierten Makrophagen und pDCs wurden die Zellüberstände der stimulierten Zellen nach 4 h und 20 h geerntet und die enthaltene Menge der Typ I IFN, IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ , mittels ELISA (3.2.5) bestimmt. Zusätzlich wurden auch die Interleukin 6 (IL6)- und IP10-Spiegel bestimmt.

Wie auch im ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Mausmodell (4.2.2) kamen als PRR-Liganden LPS, PolyI:C, Sendai Virus (SeV) und ein synthetisches, poxvirales dsDNA-Motiv (VACV70mer) zum Einsatz. Wie beschrieben, führt in Makrophagen eine Stimulation mit LPS, als TLR4-Ligand, oder mit PolyI:C, als TLR3-Ligand, TRIF-abhängig zur Typ I IFN-Induktion. Dagegen löst eine Infektion mit dem Einzelstrang-RNA Virus SeV über die Aktivierung des zytosolischen RIG-I-Rezeptors IPS1-abhängig die Typ I IFN-Freisetzung aus. Das VACV70mer steuert STING-abhängig die Typ I IFN-Induktion über die zytosolischen DNA-Sensoren IFI16 und/oder cGAS (Unterholzner, Keating et al. 2010; Sun, Wu et al. 2013; Wu, Sun et al. 2013).

Durch die Freisetzung von IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IL6 und IP10 der Makrophagen (Abb. 4.20) wurden die Ergebnisse bezüglich der Makrophagen aus dem ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Mausmodell bestätigt (Abb. 4.6). Auch hier führte die ADAR1-Defizienz (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) zu einer sehr stark reduzierten IFN $\alpha$ -Sekretion sowie zu einer verminderten IFN $\beta$ -Freisetzung nach Infektion bzw. Stimulation mit SeV oder dem VACV70mer (Abb. 4.20 A, B). Bezüglich der TRIF-vermittelten, LPS- sowie PolyI:C-induzierten IFN $\beta$ -Freisetzung waren erhöhte Konzentrationen in den Überständen der ADAR1-defizienten Kulturen nachweisbar. Die IL6-Freisetzung zeigte eine Reduktion nach Infektion bzw. Stimulation mit SeV oder VACV70mer, blieb nach Stimulation mit LPS jedoch unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz (Abb. 4.20 C). Auch bezüglich der induzierten IP10-Spiegel wurden keine ADAR1-abhängigen Effekte beobachtet (Abb. 4.20 D).

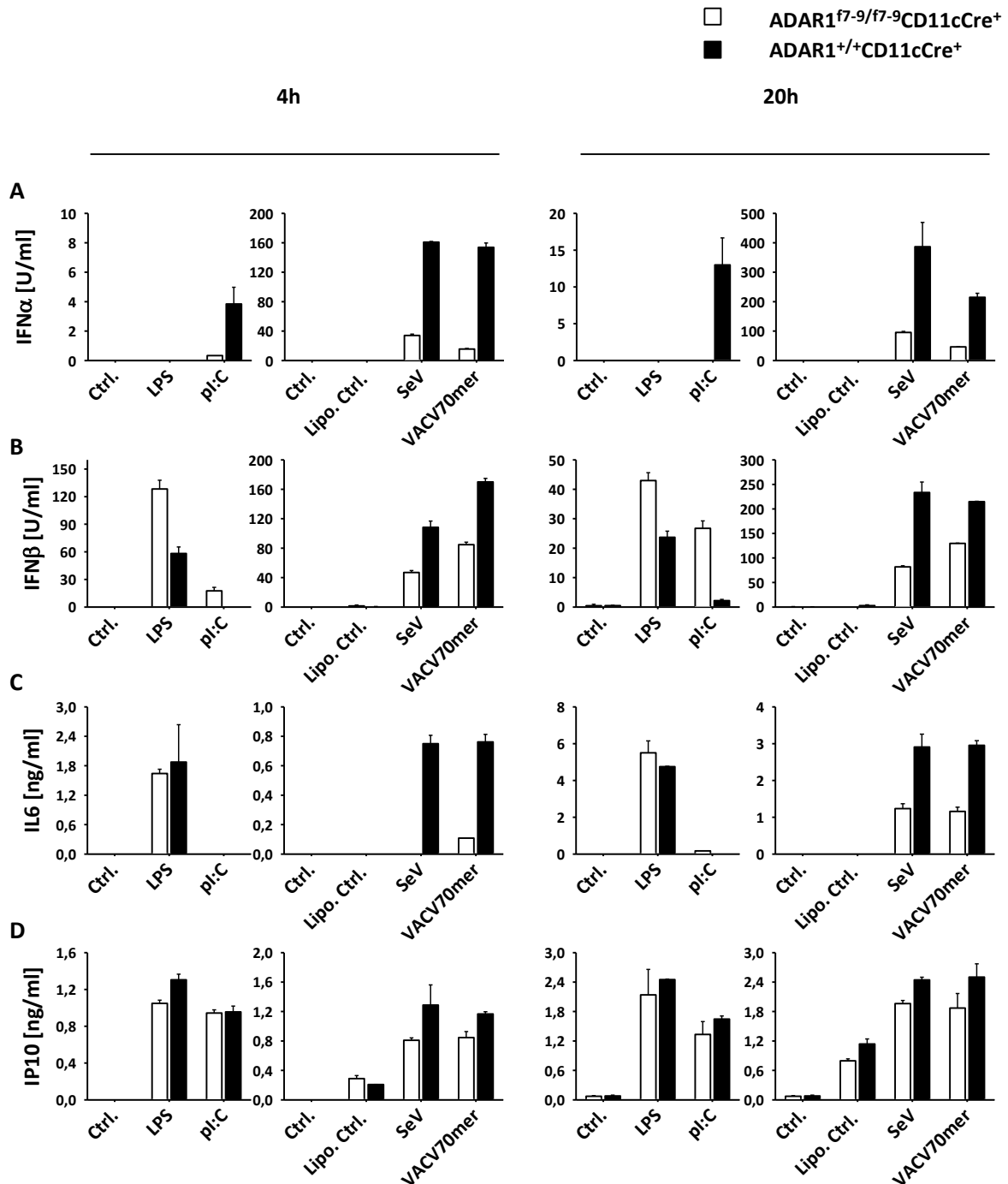
Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die in Abb. 4.6 beobachteten ADAR1-abhängigen Effekte auch auf ein anderes Mausmodell übertragen lassen und verifizieren damit die Ergebnisse im Hinblick auf einen möglichen Mausstamm-abhängigen Effekt bzw. einen artifiziellen Effekt, der auf die für die konditionelle ADAR1-Defizienz benötigte, spezifische Promotoraktivität zurückzuführen ist.

pDCs gelten als klassische Typ I IFN-Produzenten und exprimieren hauptsächlich TLR7 und TLR9. Im Gegensatz zu Makrophagen oder mDCs induzieren pDCs die Typ I IFN-Produktion über diese Rezeptoren MyD88-abhängig. Somit kann SeV als Einzelstrang-RNA Virus in diesen Zellen über die Aktivierung des endosomalen TLR7 zusätzlich zur Aktivierung des zytosolischen RIG-I-Rezeptors die Typ I IFN-Induktion steuern. Das VACV70mer wird sowohl von den zytosolischen DNA-Sensoren IFI16 und/oder cGAS als auch vom endosomalen TLR9 erkannt und vermittelt dadurch die Typ I IFN-Induktion. Für Flt3L-induzierte pDCs aus Knochenmarkszellen wurde außerdem eine geringe Expression von TLR3 und TLR4 nachgewiesen, die für die Ligandbindung mit LPS bzw. PolyI:C verantwortlich ist (Brawand, Fitzpatrick et al. 2002).

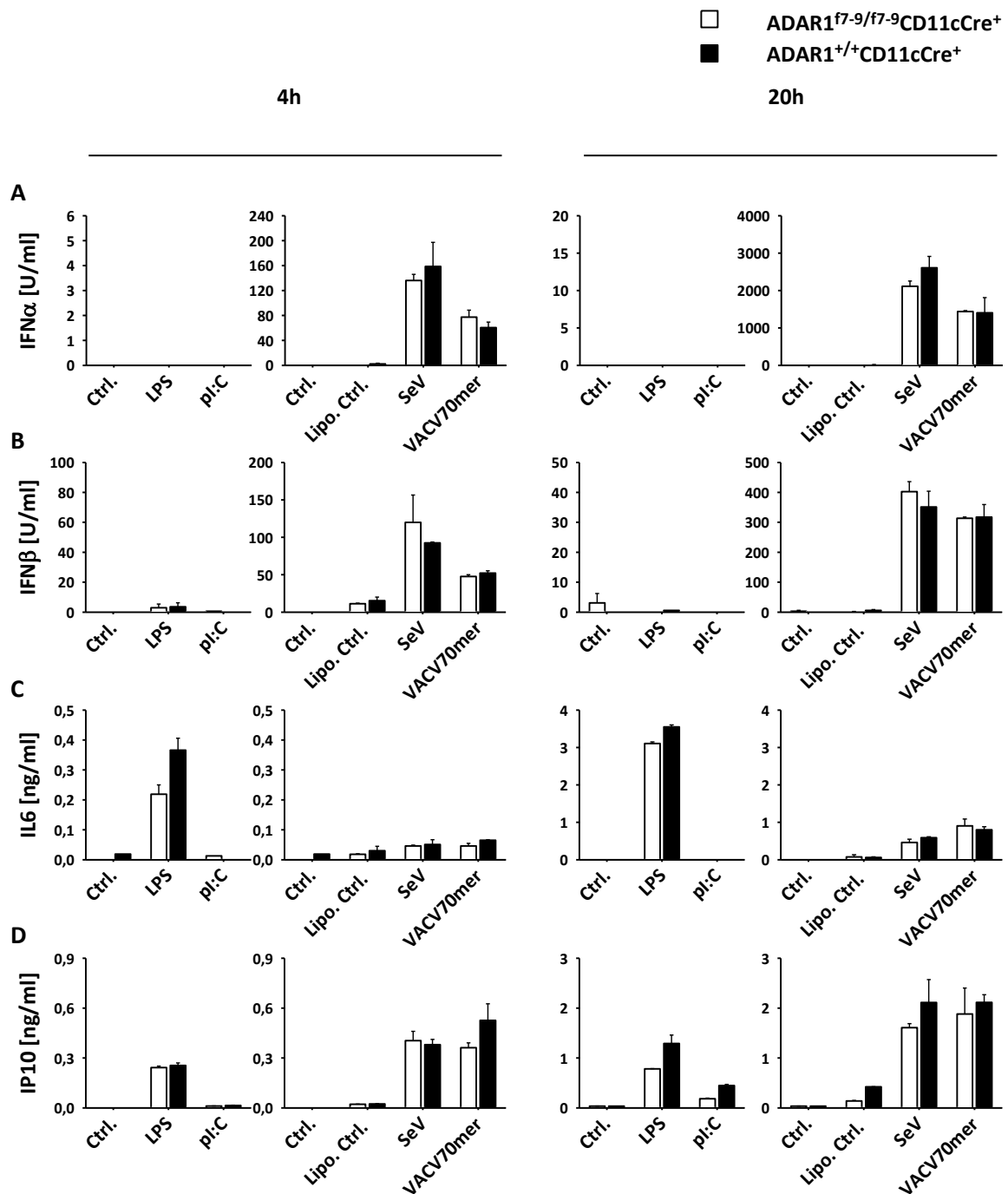
pDCs zeigten, entsprechend ihrer Natur als IFN-Produzenten, nach Infektion bzw. Stimulation mit SeV eine hohe Expression der Typ I IFN, IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  (Abb. 4.21 A, B). Anders als die bisher untersuchten Makrophagen (Abb. 4.6 und Abb. 4.20), zeigten pDC aber keine ADAR1-abhängigen Effekte auf die Typ I IFN-Freisetzung (Abb. 4.21 A, B). Auch die induzierte Sekretion



on von IL6 und IP10 war unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz (Abb. 4.21 C, D). Da Flt3L-induzierte pDCs nur eine geringe Expression von TLR3 und TLR4 zeigen, blieb wie erwartet eine effiziente IFN $\beta$ -Induktion nach Stimulation mit LPS, als TLR4-Ligand und PolyI:C als TLR3-Ligand aus.



**Abb. 4.20 Zytokin-Freisetzung ADAR1-defizienter Makrophagen nach 4 h und 20 h.** M-CSF-generierte Makrophagen aus ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>+</sup> (weiß)- und ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>+</sup> (schwarz)-Mäusen wurden mit LPS [0,2  $\mu$ g/ml], PolyI:C (pi:C) [5  $\mu$ g/ml], Sendai Virus (SeV) [1 MOI] oder poxviralem Vaccinia Virus DNA-Motiv (VACV70mer mit Lipofektamin komplexiert) [3  $\mu$ g/ml] für 4 h und 20 h stimuliert. Zytokinspiegel von IFN $\alpha$  (A) IFN $\beta$  (B) IL6 (C) und IP10 (D) in den Zellüberständen wurden mittels ELISA ermittelt. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

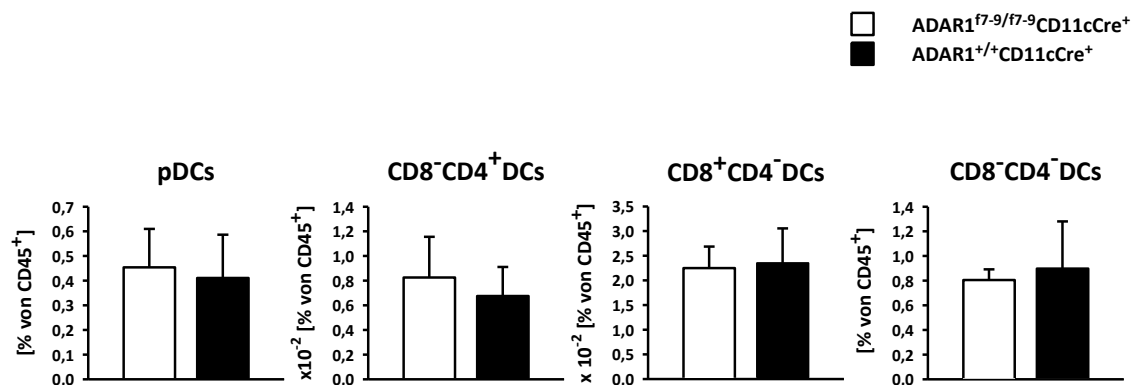


**Abb. 4.21 Zytokin-Freisetzung ADAR1-defizienter pDCs nach 4 h und 20 h.** Flt3L-generierte pDCs aus ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>+</sup> (weiß)- und ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>+</sup> (schwarz)-Mäusen wurden mit LPS [1 µg/ml], PolyI:C (pl:C) [5 µg/ml], Sendai Virus (SeV) [1 MOI] oder poxviralem Vaccinia Virus DNA-Motiv (VACV70mer mit Lipofektamin komplexiert) [1 µg/ml] für 4 h und 20 h stimuliert. Zytokinspiegel von IFNα (A) IFNβ (B) IL6 (C) und IP10 (D) in den Zellüberständen wurden mittels ELISA ermittelt. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

PDCs vermitteln die Induktion von Typ I IFN im Gegensatz zu Makrophagen IRF3-unabhängig über IRF7 (Honda, Takaoka et al. 2006; Tamura, Yanai et al. 2008). Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die IRF7-induzierte Typ I IFN-Freisetzung ADAR1-unabhängig vermittelt wird (Abb. 4.21), während spezifisch die IRF3-vermittelte Typ I IFN-Antwort in Makrophagen starken modulierenden Einflüssen durch ADAR1 unterliegt (Abb. 4.6, Abb. 4.15 und Abb. 4.20).

### 4.3.3. Phänotypische Charakterisierung der Knochenmarkszellpopulationen

Da bei der Differenzierung mittels GM-CSF überraschenderweise ein ADAR1-abhängiger Block der Differenzierung zu myeloiden dendritischen Zellen (mDCs, auch als konventionelle DCs bezeichnet) festgestellt wurde, sollte die Verteilung verschiedener dendritischer Zellpopulationen im Knochenmark untersucht werden. Dazu wurde in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe aus Gießen unter Leitung von Herrn Prof. Hackstein das Knochenmark von  $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$ - sowie von  $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$ -Mäusen präpariert und durchflusszytometrischen Untersuchungen in Bezug auf die prozentuale Verteilung verschiedener dendritischer Zellpopulation (DC) unterzogen.



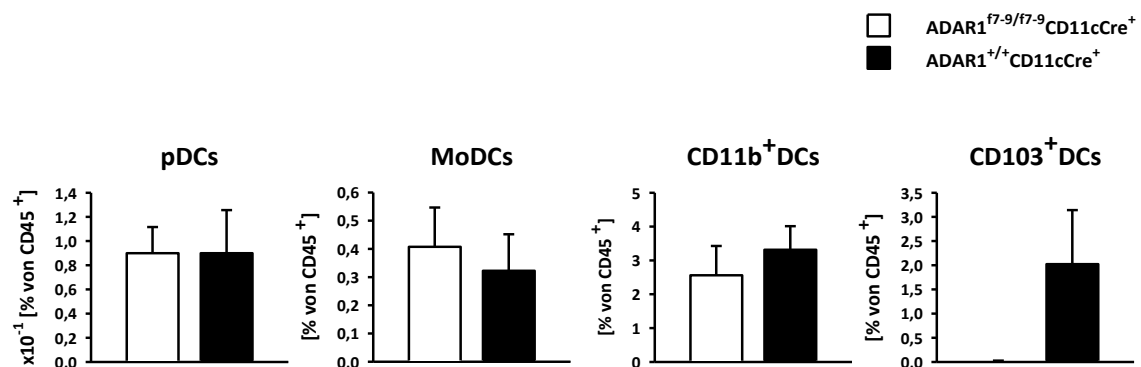
**Abb. 4.22 DC-Populationen im Knochenmark.** Die prozentuale Verteilung von plasmazytoiden (pDCs),  $CD8^-CD4^+$ ,  $CD8^+CD4^-$  sowie  $CD8^-CD4^-$  dendritischen Zellen (DCs) wurde im Knochenmark von  $ADAR1^{f7-9/f7-9}CD11cCre^+$  (weiß)- oder  $ADAR1^{+/+}CD11cCre^+$  (schwarz)-Tieren (n=4) durchflusszytometrisch bestimmt.

Dargestellt sind hier die prozentualen Verteilungen von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) sowie von  $CD8^-CD4^+$ -,  $CD8^+CD4^-$ - und doppelt-negativen dendritischen Zellen (DCs). Während pDCs, die als klassische Typ I IFN-Produzenten beschrieben sind, zu den nicht-konventionellen DCs gehören, sind die  $CD4^-$ - bzw.  $CD8^-$ -einzeln-positiven oder doppelt-negativen DCs auf einen gemeinsamen lymphoiden Progenitor zurückzuführen und werden den konventionellen DCs zugeordnet. Diese stellen wie die *in vitro* generierten mDCs (4.3.1.3) hochspezialisierte Antigen-präsentierende Zellen dar (Kushwah and Hu 2011; Merad, Sathe et al. 2013).

Die Analyse dieser im Knochenmark vorkommenden DC-Populationen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>-</sup>- und ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>-</sup>-Mäusen (Abb. 4.22).

#### 4.3.4. Phänotypische Charakterisierung der peripheren Immunzellpopulationen

Als Erweiterung der Untersuchung zur Verteilung verschiedener dendritischer Zellpopulationen im Knochenmark, bei der keine signifikanten Unterschiede zwischen ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>-</sup>- und ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>-</sup>-Mäusen festgestellt werden konnten (Abb. 4.22), wurde die Verteilung verschiedener dendritischer Zellpopulationen in der Peripherie analysiert. Dazu wurden in der angegebenen Kooperation verschiedene periphere Organe von ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>-</sup>- sowie von ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>-</sup>-Mäusen präpariert und durchflusszytometrischen Untersuchungen unterzogen. Im Rahmen dieser Arbeit werden diesbezüglich die Ergebnisse zu der Verteilung verschiedener dendritischer Zellpopulationen in der Lunge gezeigt.



**Abb. 4.23 DC-Populationen in der Lunge.** Die prozentuale Verteilung von plasmazytoiden (pDCs), CD103<sup>+</sup>, monozytischen (Mo)- sowie CD11b<sup>+</sup>-dendritischen Zellen (DCs) wurde in der Lunge von ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>+</sup> (weiß)- oder ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>+</sup> (schwarz)-Tieren (n=4) durchflusszytometrisch bestimmt.

Neben den klassischen Typ I IFN-produzierenden plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) lassen sich in der Lunge, als weitere nicht-konventionelle dendritische Zellpopulationen, monozytische dendritische Zellen (MoDCs) sowie von diesen abgeleitete CD11b-positive dendritische Zellen (CD11b<sup>+</sup>DCs) finden. Konventionelle, Antigen-präsentierende DCs zeichnen sich in der Lunge durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD103 (CD103<sup>+</sup>DCs) aus (Kushwah and Hu 2011; Hackstein, Wachtendorf et al. 2012; Merad, Sathe et al. 2013).

Bezüglich der nicht-konventionellen DCs, hier pDCs, MoDCs sowie den CD11b<sup>+</sup>DCs, wurden in der Lunge keine signifikanten Unterschiede zwischen ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>-</sup>- und ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>+</sup>-Mäusen festgestellt. Dagegen war die in der Lunge vorkommende Population konventioneller, CD103-positiver DCs in ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>CD11cCre<sup>-</sup> im Gegensatz zu ADAR1<sup>+/+</sup>CD11cCre<sup>+</sup>-Tieren nicht nachweisbar. Diese Beobachtung überträgt den ADAR1-abhängigen Effekt, der schon für die *in vitro* Differenzierung der mDCs (cDCs) beobachtet wurde (Abb. 4.18), in ein *in vivo* Modell.

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die immunologischen Funktionen des ADAR1-Proteins untersucht werden. Die strukturellen Besonderheiten dieses Proteins, v.a. aber das Vorkommen einer IFN-induzierbaren zytoplasmatischen Isoform, exponieren es innerhalb der ADAR-Familie als potentiellen Regulator immunmodulatorischer Prozesse. Es ist bekannt, dass eine ubiquitäre Defizienz im murinen System zu einem embryonal letalen Phänotyp führt. Dieser ist assoziiert mit einer erhöhten Typ I IFN-Signatur und massivem Zellsterben (Hartner, Schmittwolf et al. 2004; Wang, Miyakoda et al. 2004; Hartner, Walkley et al. 2009). Die zugrundeliegenden Mechanismen für die erhöhte Typ I IFN-Signatur konnten jedoch nicht aufgeklärt werden und auch die Frage, ob das massive Zellsterben eine Konsequenz der erhöhten Typ I IFN-Signatur ist oder andere Mechanismen verantwortlich sind, blieb unklar. Außerdem beschränkten sich die bisherigen Daten und die beobachteten ADAR1-abhängigen Effekte vorwiegend auf die Untersuchungen in hämatopoetischen Stammzellen. Die Rolle von ADAR1 in differenzierten Immunzellen konnte aufgrund der Notwendigkeit von ADAR1 für das Überleben nicht adressiert werden. Eine kürzlich erschienene Studie assoziierte ADAR1-Mutationen mit dem Aicardi-Goutières-Syndrom, einer Typ I IFN-assoziierten Autoimmunerkrankung im Menschen, aber auch hier blieben die Mechanismen unklar (Rice, Kasher et al. 2013). Deshalb ergaben sich in diesem Zusammenhang zwei zentrale Fragestellungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurden.

Die erste Fragestellung konzentrierte sich dabei auf die Untersuchung der modulatorischen Rolle von ADAR1 bei der Typ I IFN-Antwort mit Hilfe induzierter ADAR1-defizienter Modelle. Diese Modelle gaben zum einen aufgrund der konditionellen Defizienz im murinen System die Möglichkeit den ADAR1-abhängigen letalen Phänotyp zu umgehen und zum anderen die ADAR1-abhängigen Effekte selektiv in verschiedenen, differenzierten Immunzellen zu untersuchen.

Die zweite Fragestellung beschäftigte sich über das Typ I IFN-Aktivierungspotential hinaus mit dem Einfluss von ADAR1 auf die Differenzierung von verschiedenen Immunzellen.

### 5.1. Modulatorische Rolle von ADAR1 bei der Typ I Interferon-Induktion

Die immunregulatorische Rolle von ADAR1 im Hinblick auf die Typ I IFN-Antwort wurde über eine induzierte Defizienz dieses Proteins untersucht. Um die Relevanz der ADAR1-vermittelten Effekte im humanen sowie im murinen System zelltypspezifisch zu verifizieren, wurden ver-

schiedene Testsysteme etabliert. Humane Monozyten mit einer siRNA-vermittelten ADAR1-Defizienz dienten als Testmodell im humanen System. Es ist bekannt, dass siRNA zur Stimulation des TLR7 führen kann. Aus diesem Grund wurde hier durch die Verwendung einer speziell modifizierten, nicht-stimulatorischen siRNA eine Voraktivierung der Zellen verhindert (Hamm, Latz et al. 2010).

Da eine ubiquitäre ADAR1-Defizienz im Mausmodell zu einem embryonal letalen Phänotyp führt (Hartner, Schmittwolf et al. 2004; Wang, Miyakoda et al. 2004; Hartner, Walkley et al. 2009), wurden im murinen System konditionell ADAR1-defiziente Mausstämme auf Basis des Cre/loxP-Rekombinationssystems eingesetzt (Sauer and Henderson 1988). Dabei diente der ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Mausstamm, der in Zellen der myeloiden Reihe ADAR1<sup>Exon7-9</sup> deletierte, als Donor für M-CSF-generierte Makrophagen aus dem Knochenmark dieser Mäuse. Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), die sich maßgeblich bezüglich der Signalgebung zur Typ I IFN-Induktion von Monozyten bzw. Makrophagen unterscheiden, wurden mittels Flt3L aus dem Knochenmark von Mäusen des ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Mausstamms generiert.

Die Untersuchung der Beteiligung von ADAR1 bei der durch PRRs-ausgelösten Typ I IFN-Antwort erfolgte zunächst durch die Stimulation und anschließende Analyse der IFN $\beta$ - und IFN $\alpha$ -Freisetzung von ADAR1-defizienten Zellen im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Kontrollzellen. Zudem wurde auch die Zytokinmenge von IL6 sowie IP10 (CXCL10) bestimmt, um eine mögliche Beteiligung von ADAR1 auch bei der Induktion pro-inflammatorischer Moleküle zu verifizieren. Gleichzeitig wurde bei den M-CSF-generierten Makrophagen aus dem ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre-Mausstamm die Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay überprüft (Abb. 4.7). Auf dieser Grundlage konnte zum einen eine von der ADAR1-Defizienz unbeeinflusste Viabilität angenommen werden und zum anderen ausgeschlossen werden, dass die beobachteten ADAR1-abhängigen Effekte bezüglich der Zytokinausschüttung auf eine veränderte Zellviabilität zurückzuführen waren.

Die Untersuchung der Beteiligung von ADAR1 an der Typ I IFN-Antwort wurde anschließend auf die Analyse einzelner beteiligter Signalmoleküle erweitert, um einen Einblick in die zugrundeliegenden Mechanismen der ADAR1-abhängigen Veränderungen zu erhalten.

Um die verschiedenen Signalwege abzudecken, die eine Typ I IFN-Antwort induzieren und sich übergeordnet in TRIF-abhängige und TRIF-unabhängige Signalwege einteilen lassen, wurden verschiedene PRR-Liganden eingesetzt. Zu den hier eingesetzten und dargestellten Stimuli gehörten LPS, PolyI:C, Sendai Virus (SeV) sowie ein poxvirales DNA-Oligomer aus dem Vaccinia Virus (VACV70mer).

Dabei löst LPS, als TLR4-Ligand, und PolyI:C, als TLR3-Ligand, TRIF-abhängig die Typ I IFN-Antwort aus. Das Einzelstrang-RNA Virus SeV führt über die Aktivierung des zytosolischen RIG-I-Rezeptors IPS1-abhängig zur Typ I IFN-Freisetzung. Das VACV70mer kann schließlich über die

zytosolischen DNA-Sensoren IFI16 und/oder cGAS STING-abhängig die Typ I IFN-Induktion steuern (Unterholzner, Keating et al. 2010; Sun, Wu et al. 2013; Wu, Sun et al. 2013).

Im Vergleich der TRIF-abhängigen zur TRIF-unabhängigen Typ I IFN-Induktion zeigten sich ADAR1-abhängige modulatorische Effekte, die ADAR1 eine ambivalente Rolle zuwiesen. Bei TRIF-abhängiger Signalwegaktivierung agierte ADAR1 als Suppressor, wohingegen sich ADAR1 als Aktivator bei der TRIF-unabhängigen Typ I-IFN Induktion erwies. Diese ambivalente Eigenschaft wird in Abschnitt 5.1.1 und 5.1.2 separat beschrieben und diskutiert.

Prinzipiell sind bezüglich der Mechanismen einer ADAR1-vermittelten Beteiligung an Signalwegen verschiedene Möglichkeiten vorstellbar. Durch Editierung kann in Protein-kodierenden Bereichen von Transkripten der Signalmoleküle oder von Signalweg-regulierenden Faktoren die Funktion dieser im Sinne einer „gain of function“- oder „loss of function“-Mutation verstärkt oder inhibiert werden, wie es für einige ADAR1-Substrate schon beschrieben wurde (Burns, Chu et al. 1997; Werry, Loiacono et al. 2008; Chen, Li et al. 2013).

Da die Studien der vergangenen Jahre aber eine Häufung der Editierungsereignisse in nicht-kodierenden Bereichen aufzeigen, sind Mechanismen ADAR1-vermittelter Effekte vor allem in diesen Bereichen zu vermuten. Intensiv wurde der Zusammenhang von ADAR1 und der miRNA-Prozessierung beleuchtet. Ota, et al zeigten, dass die Bildung des ADAR1/Dicer-Heterodimers erst die Bildung des RNA-induzierten Silencing Komplexes (RISC) ermöglicht (Ota, Sakurai et al. 2013). Zuvor wurde dahingegen eine antagonistische Wirkung auf miRNA-vermittelte RNAi-Prozesse beschrieben, die durch die verminderte Prozessierung hypereditierter miRNAs und deren Abbau hervorgerufen wird (Scadden and Smith 2001; Kawahara, Zinshteyn et al. 2007; Iizasa, Wulff et al. 2010). Im Sinne einer agonistischen oder antagonistischen Wirkung von ADAR1 auf die RNAi ist es denkbar, dass ADAR1 das „Silencing“ bestimmter Signalmoleküle oder deren Regulatoren induziert bzw. fördert oder inhibiert. Dies kann zur verminderten oder verstärkten Aktivität der entsprechenden Moleküle führen. ADAR1-vermittelte Editierungsereignisse innerhalb der miRNA-Sequenz selbst können darüber hinaus zur Rekodierung der miRNA-Zielsequenz führen und damit die „Silencing“-Kapazität für einige Zielsequenzen beeinflussen (Kawahara, Zinshteyn et al. 2007).

Zudem können Editierungsereignisse in Spleiß-Sequenzen zur Deletion von Donor- oder Akzeptorstellen führen und somit Proteinvarianten mit veränderten Funktionen generieren. Solche Veränderungen sind auch für die Signalmoleküle innerhalb der Typ I IFN-Induktionskaskade denkbar.

Über die bisher beschriebenen Editierungs-abhängigen Mechanismen hinaus, ist eine Modifikation der Funktion entsprechender Signalmoleküle über Protein-Protein-Interaktionen von ADAR1 mit dem jeweiligen Molekül vorstellbar. Die verantwortlichen Domänen in ADAR1 für diese Protein-Protein-Interaktionen konnten bisher nicht eindeutig beschrieben werden. Dis-



kutiert wird hier sowohl eine Abhängigkeit von der nicht-DNA-bindenden Z $\beta$ -Domäne als auch von den dsRNA-Bindedomänen (Barraud and Allain 2011). Ein solcher über Protein-Protein-Interaktion-vermittelter Editierungs-unabhängiger Mechanismus, wurde erst kürzlich für die Dicer-Funktionalität und der damit verbundenen miRNA-Prozessierung gezeigt (Ota, Sakurai et al. 2013).

### 5.1.1. ADAR1 als Typ I Interferon-Suppressor

Die Stimulation der humanen Monozyten (Abb. 4.3) sowie der murinen M-CSF-generierten Makrophagen (Abb. 4.6 und Abb. 4.20) mit LPS als TLR4-Ligand oder PolyI:C als TLR3-Ligand führte in ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen zu einer stark erhöhten IFN $\beta$ -Ausschüttung. Sowohl die TLR4- als auch die TLR3-vermittelte Typ I IFN-Antwort ist abhängig von dem Adaptermolekül TRIF (Hoebe, Du et al. 2003). Das Adaptermolekül TRIF assoziiert nach erfolgter Rezeptor-Ligation über TRAF3 mit TBK1 und führt zur Aktivierung von IRF3. Hierbei wird durch TLR4-Ligation hauptsächlich IRF3 induziert, während nach TLR3-Ligation zunächst IRF3 und dann auch IRF7 eine Rolle bei der Typ I-IFN-Antwort spielt. Entsprechend ist bei der TLR4-vermittelten Typ I IFN-Induktion hauptsächlich eine Ausschüttung von IFN $\beta$  zu beobachten, da für die Expression des vollständigen IFN $\alpha$ -Profils die Aktivierung von IRF7 notwendig ist (Servant, Tenover et al. 2002). Für PolyI:C, das hier als TLR3-Ligand eingesetzt wurde, ist zwar auch eine Erkennung durch die zytoplasmatischen Rezeptoren MDA5 und RIG-I beschrieben (Kato, Takeuchi et al. 2006; Kato, Takeuchi et al. 2008), aber es ist bekannt, dass nicht in die Zelle transferiertes PolyI:C (ohne Transfektionsreagenz) ausschließlich zur TLR3-Aktivierung führt. Da auch hier PolyI:C ohne Transfektionsreagenz eingesetzt wurde, kann eine reine TRIF-abhängige PolyI:C-vermittelte TLR3-Aktivierung in dem hier angewandten Stimulationsansatz angenommen werden (Alexopoulou, Holt et al. 2001; Matsumoto, Kikkawa et al. 2002). Die nach TRIF-abhängiger Stimulation erhöhten IFN $\beta$ -Spiegel wurden bei humanen Monozyten und auch bei M-CSF-generierten Makrophagen aus dem CD11c-abhängig ADAR1-defizienten sowie aus dem LysMCre-abhängig ADAR1-defizienten Mausstamm beobachtet. Dies verifizierte zum einen die Übertragbarkeit des beobachteten ADAR1-abhängigen Effekts von der Maus auf den Menschen und zum anderen validiert es das Ergebnis im Mausmodell in Hinblick auf einen möglichen Mausstamm-abhängigen Effekt bzw. einen artifiziellen Effekt, der auf die für die konditionelle ADAR1-Defizienz benötigte Promotoraktivität zurückzuführen ist.

Da es in Abwesenheit von ADAR1 zu einer erhöhten IFN $\beta$ -Freisetzung kam, lassen diese Daten eine inhibitorische Rolle von ADAR1 auf die TRIF-abhängige Typ I IFN-Induktion vermuten.

Eine ADAR1-vermittelte Inhibition der TLR4-Signalgebung kann als Beitrag zur LPS-Toleranz verstanden werden. Die LPS-Toleranz beruht auf der negativen Regulation des TLR-Signalwegs zur Vermeidung überschießender Immunreaktionen, wie des Endotoxinschocks, und wurde zuvor schon in Makrophagen beschrieben (Ziegler-Heitbrock 1995). Bezüglich der Inhibition des TRIF-Signalwegs wurde SARM (sterile alpha and HEAT-Armadillo motifs) als TIR-Domänen-Adaptermolekül identifiziert (Carty, Goodbody et al. 2006). Weitere inhibitorische Effekte auf die TRIF-Aktivität wurden für SHP-2 (src homology2 domain containing protein tyrosine phosphatase), eine weitläufig exprimierte zytoplasmatische Tyrosin-Phosphatase, sowie für ADAM15 (a disintegrin and metalloproteinase domain 15), eine Disintegrin-Metalloprotease, die zur proteolytischen Degradation von TRIF führt, beschrieben (An, Zhao et al. 2006; Ahmed, Maratha et al. 2013). Denkbar ist, dass ADAR1 zur Hypereditierung einer gegen SARM oder andere Regulatoren gerichteten miRNA führt und dadurch die Degradation der miRNA bewirkt oder die Zielsequenz der miRNA verändert und damit die Expression und Funktionsfähigkeit der SARM-Moleküle gewährleistet. Fehlt eine solche ADAR1-Funktion werden die inhibitorischen Moleküle (z.B. SARM) durch RNAi-Mechanismen degradiert, so dass ein verstärktes Zytokinsignal die Folge ist, wie für die LPS-abhängige IFN $\beta$ -Antwort in den ADAR1-defizienten Monozyten bzw. Makrophagen gezeigt. Um zu überprüfen, ob es in Abhängigkeit von ADAR1 zu Unterschieden in der TRIF-Expressionsstärke kommt wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dabei konnten jedoch gleichwertige Expressionsstärken zwischen ADAR1-defizienten und ADAR1-kompetenten Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 4.14), so dass eine verstärkte TRIF-abhängige IFN $\beta$ -Antwort aufgrund erhöhter TRIF-Expression ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus könnte ADAR1 die TRIF-pre-mRNA selbst durch Editierung regulierend modifizieren, womit eine fehlende Editierung bei ADAR1-Defizienz zu einer Veränderung in diesem Bereich führt. In diesem Kontext kann durch Veränderungen in bestimmten Domänen des TRIF-Moleküls, die Assoziation von TRIF mit dem für die IFN $\beta$ -Induktion notwendigen Signalweiterleitenden Molekül TRAF3 verstärkt und somit eine gesteigerte IFN-Freisetzung induziert werden. Tatsächlich wurden durch eine entsprechende Software („Inosine Predict, University of Utah School of Medicine) mehrere Editierungspositionen innerhalb der TRIF-Sequenz vorhergesagt, von denen einige zu einer Rekodierung der Aminosäuresequenz führen. Eine Editierung dieser Positionen konnte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* nicht eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise ist TRIF zwar ubiquitär exprimiert, zeigt die stärkste Expression aber in der Leber (Yamamoto, Sato et al. 2002). Das massive Zellsterben im ADAR1-defizienten Mausmodell betraf neben den Stammzellen auch verstärkt Hepatozyten (Hartner, Schmittwolf et al. 2004; Wang, Miyakoda et al. 2004; Hartner, Walkley et al. 2009). Es ist bekannt, dass die TRIF-Aktivität apoptotische Prozesse induzieren kann (Kaiser and Offermann 2005). In diesem Zusammenhang könnte eine durch ADAR1-

Defizienz vermittelte erhöhte TRIF-Aktivität die Apoptose v.a. in den stark TRIF-exprimierenden Hepatozyten einleiten.

Neben der Typ I IFN-Induktion wurde die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und IP10 (nur im murinen System) gemessen. Sowohl die IL6-Freisetzung humaner (Abb. 4.3) sowie muriner Monozyten bzw. Makrophagen als auch die IP10-Sekretion muriner Zellen (Abb. 4.6 und Abb. 4.20) nach LPS- oder PolyI:C-Stimulation war weitgehend unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz, wobei nur LPS effizient die IL6-Sekretion induzierte. Der LPS-Rezeptor TLR4 ist im Gegensatz zu dem strikt TRIF-abhängigen TLR3 in der Lage neben dem Adaptermolekül TRIF zusätzlich mit MyD88 zu assoziieren und kann damit NF- $\kappa$ B-abhängig eine starke IL6-Freisetzung induzieren (1.2.2.2). Dementsprechend war zu erwarten, dass lediglich LPS gegenüber PolyI:C eine effiziente IL6-Antwort induziert.

Insgesamt verifiziert diese Beobachtung einen ADAR1-abhängigen, TRIF-vermittelten Effekt, der sich spezifisch auf die Typ I IFN-Induktion auswirkt. Die Typ I IFN-Induktion wird hauptsächlich über die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 gesteuert (Sato, Suemori et al. 2000). Dagegen weisen die Promotoren für das *IL6*- und *IP10*-Gen Bindestellen für eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren auf, die zusammen durch zusätzliches bzw. synergistisches Binden die Transkription dieser Gene treiben. Die Aktivierung der IL6-Genexpression durch NF- $\kappa$ B ist wahrscheinlich der wichtigste Signalweg. Für ein Maximum der IL6-Induktion sind aber weitere Faktoren notwendig, wie AP1 (activator protein 1), CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein), C/EBP (CAAT enhancer binding protein) und NF-IL6 (nuclear factor IL6) (Akira, Isshiki et al. 1992; Matsusaka, Fujikawa et al. 1993; Keller, Wanagat et al. 1996; Koj 1996). Der IP10-Genpromotor wird neben dem Transkriptionsfaktor IRF3 durch NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP und CREB gesteuert (Tamassia, Calzetti et al. 2007; Brownell, Wagoner et al. 2013). Zusätzlich kann die IP10-Transkription aufgrund von vorhandenen ISRE-Promotorelementen auch durch den IFN-Signalweg STAT1-vermittelt verstärkt werden (Guo, Li et al. 2006). Im Gegensatz dazu werden die stark ADAR1-abhängigen Typ I IFN-Signale hauptsächlich von IRF3 und IRF7 gesteuert, was auf eine modulatorische ADAR1-Wirkung auf diese Transkriptionsfaktoren hin deutet. Dabei muss ADAR1 nicht direkt die Funktion von IRF3 oder IRF7 beeinflussen. Denkbar ist auch ein ADAR1-Einfluss auf andere Signalmoleküle, die sich im Signalweg aufwärts von IRF3 oder IRF7 befinden.

Um umfassende Einblicke in Bezug auf potentiell veränderte Genexpressionen im Zusammenhang mit einer ADAR1-Defizienz zu gewinnen, wurden Microarray-Analysen von ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Makrophagen durchgeführt (4.2.4). Diese sollten Hinweise auf einen zugrundeliegenden Mechanismus für die ADAR1-vermittelte erhöhte IFN $\beta$ -Freisetzung nach TRIF-abhängiger Stimulation geben. Die Microarray-Daten belegten die im ELISA gemessene erhöhte IFN $\beta$ -Induktion auch auf mRNA-Ebene (Abb. 4.9). Die Expres-

sionswerte aus den Microarray-Daten wurden nach dem Setzen der „Cut-Offs“ für die Expressionswerte selbst und für das Verhältnis zwischen den Expressionswerten bezüglich ADAR1-defizienter und ADAR1-kompetenter Makrophagen in einer „heatmap“ dargestellt (3.7 und Abb. 4.10). Die am stärksten regulierten Gene waren in vielen Fällen assoziiert mit Funktionen in Bereichen von Zellstoffwechsel (Apoc2, Trf, Slc7a2, Vdr, Sars, Asns), Zellzyklus und Proliferation (Wee, S100a8, S100a9, Il15ra, Mad2l1, Ccnb1, Id3, Myc, Akna, Plac8, Ccna2) sowie Zellstress bzw. DNA-Reparatur (Tnfsf, Ikzf1, Daxx, Serpina3f, Histon Cluster 1, Nupr1, Asf1b, Dusp7, Stk17b, Dusp1, Gadd45a, Ddit3). Ein weiterer Komplex ließ sich darüber hinaus mit IFN-assoziierten Prozessen in Verbindung bringen (Tnfsf10, Mx1, IRF1, Mir155, Socs, Ifi47, Rsad2, Ifit2, Mx2, Ifit1, Trim21, Batf2, Igp1, Cxcl11, Irf2bp2, Ly6a, H2-Q6), die einer starken ADAR1-abhängigen Regulation vor allem nach TRIF-unabhängiger SeV Infektion unterlagen und damit im nächsten Abschnitt diskutiert werden (5.1.2). Unter den in Abhängigkeit von der ADAR1-Defizienz am stärksten hochregulierten Genen, in unbehandelten sowie stimulierten Makrophagen befand sich das Molekül Ly6a (Sca1, stem cell antigen 1). Die erhöhte Sca1-Expression konnte auch auf Proteinebene durchflusszytometrisch bestätigt werden (Abb. 4.11) und validiert damit die Microarray-Daten. Sca1 ist ein Mitglied der Ly6-Multigen-Familie und wird auf der Zelloberfläche von multipotenten, hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark von Mäusen exprimiert. In der Peripherie weisen C57BL-Mäuse eine relative hohe Anzahl Sca1-positiver Lymphozyten auf. Die Sca1-Expression wird dramatisch durch zelluläre Aktivierung hochreguliert und ist Typ I IFN-induzierbar (Holmes and Stanford 2007). Interessanterweise wurde für dieses Molekül auch eine stark erhöhte Expression auf hämatopoetischen Stammzellen im ADAR1-Knockout Mausmodell beschrieben (Hartner, Walkley et al. 2009). Neben der Sca1-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen ist eine Expression für T- und B Zellen beschrieben worden (Holmes and Stanford 2007). Es gibt jedoch bisher keine Daten oder funktionellen Analysen der Sca1-Expression auf myeloiden Zellen, wie z.B. Makrophagen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass im Sinne einer IFN-Induzierbarkeit auch unabhängig von der ADAR1-Defizienz eine Sca1-Expression auf wildtyp Makrophagen durch Stimulation mit dem VACV70mer nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt). Trotz der fehlenden funktionellen Assoziation einer Sca1-Expression, zeigt die erhöhte Expression einerseits einen Mausmodell- und Zell-übergreifenden ADAR1-abhängigen Phänotyp und zum anderen weist es auf eine konstitutive IFN-Signatur in den ADAR1-defizienten Zellen hin. Unerwartet befanden sich aber unter den abgebildeten, in Abhängigkeit von ADAR1-regulierten Genen keine Moleküle, wie z.B. Signalmoleküle, die eine direkte Assoziation der ADAR1-Defizienz mit der beobachteten erhöhten IFN $\beta$ -Freisetzung darstellen würden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte für die Microarray-Analyse nur ein Zeitpunkt (4 h) nach LPS-Stimulation analysiert werden und somit ist es denkbar, dass der hier gewählte Zeit-

punkt im Kontext der LPS-Stimulation nicht im entsprechenden Zeitfenster für potentielle, transkriptionelle Veränderungen liegt. Darüber hinaus kann eine solche Untersuchung einen Einblick in ADAR1-abhängige, veränderte Genexpressionen auf mRNA-Ebene geben, die wie z.B. im Fall von *Sca1* auch mit einer veränderten Expression auf Proteinebene korrelierte. Damit ist jedoch eine Aussage bezüglich Veränderungen im Bereich posttranslationaler Modifikationen bestimmter Moleküle nicht möglich. Posttranslationale Modifikationen kommen aber gerade in Bezug auf Signalmoleküle besonders häufig als Phosphorylierungen vor und spiegeln eine Aktivierung dieser wider. Zudem kann ADAR1, wie in 1.5 beschrieben, auch durch Editierung der mRNA-Transkripte posttranskriptionell die Genexpression auf Translationsebene verändern, ohne dass sich diese Veränderungen auf mRNA-Ebene nachweisen lassen. Deshalb ist es erforderlich die Expression entsprechender Gene auf Proteinebene zu untersuchen.

Zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen für die beobachteten modulatorischen Eigenschaften von ADAR1 auf die Typ I IFN-Induktion und als Erweiterung der Microarray-Analysen wurden in einer Kinetik wichtige Signalmoleküle innerhalb der Typ I IFN-Induktionskaskade (1.3) mittels Western Blot untersucht (4.2.5). Zu den untersuchten Signalmolekülen gehörten dabei TBK1, IRF3, IRF7, STAT1 sowie die entsprechenden aktivierten, phosphorylierten Formen. Die Western Blot-Analysen zeigten in ADAR1-defizienten Zellen eine konstitutiv erhöhte Expression vieler dieser Signalmoleküle, die durch Stimulation mit LPS überwiegend noch verstärkt wurde (Abb. 4.12). Damit wiesen die ADAR1-defizienten Makrophagen, wie schon durch die erhöhte Expression des IFN-induzierbaren *Sca1*-Moleküls gezeigt, eine ausgeprägte Typ I IFN-Signatur auf. Auch durch Untersuchungen in dem embryonal letalen ADAR1-Knockout-Mausmodell wurde eine solche Signatur angedeutet (Hartner, Walkley et al. 2009). Darüber hinaus wurde kürzlich auch ein Zusammenhang einer ADAR1-Defizienz im Menschen und einer erhöhten IFN-Signatur gezeigt. Das Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS), eine schwere Autoimmunerkrankung, ist charakterisiert durch eine erhöhte Produktion der Typ I IFN-Produktion und wird unter anderem durch Mutationen im *ADAR1*-Gen hervorgerufen. V.a. die erhöhten Spiegel an phosphoryliertem TBK1 und dementsprechend die erhöhten Spiegel an phosphoryliertem IRF3, das nach Dimerisierung als zentraler Transkriptionsfaktor die LPS-vermittelte IFN $\beta$ -Induktion treibt (Sakaguchi, Negishi et al. 2003), bringen konsistent die in ADAR1-defizienten Makrophagen beobachtete erhöhte IFN $\beta$ -Sekretion nach LPS-Stimulation in den Kontext einer verstärkten Signalgebung. Da bei der LPS-vermittelten IFN $\beta$ -Induktion IRF7, ein weiterer Transkriptionsfaktor für eine effiziente Typ I IFN-Induktion, nur eine untergeordnete Rolle spielt (Sakaguchi, Negishi et al. 2003), war zu erwarten, dass weder eine Induktion noch Phosphorylierung von IRF7 in ADAR1-kompetenten Zellen nach LPS-Stimulation zu beobachten ist. Die IRF7-Phosphorylierung blieb trotz erhöhter IRF7-Spiegel auch in ADAR1-defizienten Makrophagen nach LPS-Stimulation aus.

Zentrale Schlüssel­moleküle in der Typ I IFN-Induktionskaskade sind durch die IFN-regulierenden Faktoren IRF3 und IRF7 dargestellt (Servant, Tenover et al. 2002). Da v.a. die Expression und Aktivierung von IRF3 in ADAR1-defizienten Makrophagen sowohl nach TRIF-abhängiger Stimulation mit LPS als auch, wie im folgenden Abschnitt noch ausführlich diskutiert (5.1.2), nach TRIF-unabhängiger Stimulation mit SeV, deutlich erhöht war, wurde anschließend die Translokation dieser IRFs in den Nukleus nach Stimulation mit LPS oder SeV (diskutiert in 5.1.2) untersucht. Dazu wurden ADAR1-defiziente und im Vergleich dazu ADAR1-kompetente Makrophagen mit LPS stimuliert, nach 1 h fixiert und gegen IRF3 und IRF7 gefärbt (4.2.6 und Abb. 4.15). Der gewählte Zeitpunkt richtete sich dabei nach der im Western Blot aufgezeigten Induktionsspitze von aktiviertem, phosphoryliertem IRF3 nach LPS-Stimulation (Abb. 4.12). Wie erwartet, konnte in ADAR1-kompetenten Zellen eine Translokation von IRF3 in den Zellkern detektiert werden. Diese war verstärkt in ADAR1-defizienten Makrophagen zu erkennen, entsprechend der erhöhten IFN $\beta$ -Sekretion. Die LPS-Stimulation bewirkte nur ein sehr schwaches IRF7-Signal im Nukleus ADAR1-kompetenter sowie ADAR1-defizienter Zellen, was zum einen mit der ausbleibenden Phosphorylierung bzw. Aktivierung von IRF7 nach LPS-Stimulation (Abb. 4.12) korreliert und zum anderen konsistent mit der IRF3 und nicht IRF7-vermittelten IFN $\beta$ -Induktion nach LPS-Stimulation ist (Sakaguchi, Negishi et al. 2003). Das verstärkte IRF3-Signal kann auf eine erhöhte Translationsrate für dieses Molekül, aber auch auf Veränderungen in Regulationsmechanismen für die IRF3-Homöostase zurückzuführen sein. IRF3 wird konstitutiv exprimiert und wandert auch im „Steady State“ beständig zwischen Zytoplasma und Nukleus hin und her. Eine entsprechende Aktivierung führt dann zur nukleären Retention von IRF3, wobei die IRF3-Aktivität im Zellkern durch den Export des IRF3-Moleküls und anschließendem proteosomalem Abbau limitiert wird (Lin, Heylbroeck et al. 1998; Servant, Tenover et al. 2002). Durch ADAR1-Defizienz-bedingte Veränderungen in diesen Prozessen, können hier zu einem verstärkten IRF3-Signal beitragen.

Somit lässt sich zusammenfassend für ADAR1 im humanen sowie im murinen System eine Rolle als Suppressor der TRIF-abhängigen Typ I IFN-Produktion beschreiben. Im Falle einer ADAR1-Defizienz führt dies zu einer erhöhten Typ I IFN-Signatur. Dabei kommt es zur Expression der entsprechenden Signalmoleküle sowie verstärkter Aktivierung dieser nach Stimulation. Dies wiederum führt zu einer verstärkten IRF3-Translokation.

Um einen weiteren Zelltyp zu analysieren, wurden auch Flt3L-induzierte pDCs dem in 5.1 beschriebenen Stimulationsansatz unterzogen (4.3.2). Da für *in vitro* differenzierte pDCs nur eine geringe Expression von TLR3, TLR4 und TRIF nachgewiesen wurde (Brawand, Fitzpatrick et al. 2002), konnte in diesem Fall keine TRIF-abhängige Typ I IFN-Induktion detektiert und somit auch kein TRIF-abhängiger ADAR1-Einfluss verifiziert werden (Abb. 4.21).

### 5.1.2. ADAR1 als Typ I Interferon-Aktivator

Die Stimulation der humanen Monozyten (Abb. 4.3) sowie der murinen M-CSF-generierten Makrophagen (Abb. 4.6 und Abb. 4.20) mit SeV oder mit dem VACV70mer führte in ADAR1-defizienten Zellen im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen zu einer stark reduzierten IFN $\alpha$ - und IFN $\beta$ -Antwort. Im Gegensatz zu LPS als TLR4-Ligand und PolyI:C als TLR3-Ligand, die TRIF vermittelt die Typ I IFN-Antwort auslösen (5.1.1) induzieren SeV und das VACV70mer die Typ I IFN-Freisetzung unabhängig von dem Adaptermolekül TRIF. Das Einzelstrang-RNA Virus SeV führt hauptsächlich über die Aktivierung des zytosolischen RIG-I-Rezeptors IPS1-abhängig zur Typ I IFN-Freisetzung (Elco, Guenther et al. 2005; Kato, Takeuchi et al. 2006; Strahle, Garcin et al. 2006). Das Adaptermolekül IPS1 assoziiert nach erfolgter Rezeptor-Ligation über TRAF3 mit den Kinasen TBK1 und IKKi. Dabei werden TBK1-abhängig IRF3 und IRF7 und die anschließende Transkription der Typ I IFN aktiviert. IKKi-abhängig wird über NF- $\kappa$ B die IL6-Produktion induziert (Akira 2009; Kumar, Kawai et al. 2011). Das Lipofektamin-komplexierte VACV70mer aktiviert die zytosolischen DNA-Sensoren IFI16 und/oder cGAS und führt STING-abhängig über die Aktivierung von TBK1 sowie IRF3 und IRF7 zur Induktion der Typ I IFN. Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung von IKKi und NF- $\kappa$ B, das in Folge die IL6-Produktion steuert (Unterholzner, Keating et al. 2010; Sun, Wu et al. 2013; Wu, Sun et al. 2013).

Auch in diesem Fall konnte die beobachtete Reduktion der Typ I IFN-Ausschüttung nach TRIF-unabhängiger Stimulation bei humanen Monozyten und M-CSF-generierten Makrophagen sowohl aus dem CD11c-abhängigen, ADAR1-defizienten wie auch aus dem LysMCre-abhängigen, ADAR1-defizienten Mausstamm beobachtet werden. So kann auch hier der ADAR1-abhängige Effekt von dem murinen auf das humane System übertragen werden. Zudem wurde das Ergebnis im Mausmodell bezüglich eines möglichen Mausstamm-abhängigen Effekt bzw. eines artifiziellen Effekts validiert, der auf die für die konditionelle ADAR1-Defizienz benötigte Promotoraktivität zurückzuführen ist. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass im humanen System bei ADAR1-defizienten Monozyten die Reduktion der IFN $\alpha$ -Ausschüttung zwar deutlich, aber nicht so stark wie im murinen System ausfiel und dass die verringerte IFN $\beta$ -Sekretion nur transient nach 4 h zu beobachten war und sich nach 12 h wieder an die sekretierten IFN $\beta$ -Mengen ADAR1-kompetenter Zellen angleich. Die leichte Abweichung zu den Daten aus dem murinen System lässt sich durch die unterschiedliche Art und Weise der erzeugten ADAR1-Defizienz erklären. Anders als im konditionellen ADAR1-Knockout-Mausmodell, bei dem auf genomischer Ebene das Zielgen deletiert wurde, hängt bei siRNA-vermitteltem Knockdown, wie bei den humanen Monozyten, die Deletionseffizienz von der Halbwertszeit der siRNA sowie von dem Teilungsverhalten der Zellen ab. Zudem findet dabei eine Deletion nur auf Transkript-Ebene statt und führt damit zu einem mehr oder weni-

ger langanhaltenden aber transienten Knockdown des Zielgens (Bartlett and Davis 2006). Somit es möglich, dass die Effizienz der ADAR1-Deletion in siRNA-behandelten Monozyten nicht im selben Maß erreicht wurde, wie im murinen Knockout-System, und damit zu einem im Vergleich zum murinen System weniger stark ausgeprägten Phänotyp führte.

Insgesamt zeigen diese Daten aber eine aktivierende Rolle von ADAR1 auf die TRIF-unabhängige Typ I IFN-Induktion.

Im Gegensatz zu dem ADAR1-abhängigen Effekt auf die TRIF-abhängige Signalgebung nach TLR4- und TLR3-Ligation (5.1.1) kann in diesem Fall die betroffene Signalgebung zur Typ I IFN-Induktion nicht auf ein gemeinsames Adaptermolekül zurückgeführt werden, welches dann, wie zuvor beschrieben (5.1), von ADAR1-abhängigen Mechanismen modifiziert wird.

Neben der Typ I IFN-Induktion wurde auch hier die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und IP10 (nur im murinen System) gemessen. Die IL6-Freisetzung in humanen Monozyten nach SeV Infektion oder VACV70mer-Stimulation war, wie auch schon für die TRIF-abhängige Signalgebung beschrieben (5.1.1), weitgehend unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz (Abb. 4.3). In murinen Makrophagen konnte hier allerdings eine Reduzierung des IL6-Signals beobachtet werden, wohingegen die IP10-Ausschüttung unbeeinflusst war (Abb. 4.6 und Abb. 4.20). Die Gründe für die Abweichung in der IL6-Sekretion zwischen humanem und murinem System sind möglicherweise auch hier, in der Effizienz des jeweiligen Knockdowns bzw. Knockouts zu suchen. Darüber hinaus wird, wie schon im vorherigen Abschnitt beschrieben, die Typ I IFN-Induktion hauptsächlich über die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 gesteuert (Sato, Suemori et al. 2000), während die Promotoren für die *IL6*- und *IP10*-Gene-Bindestellen für eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren aufweisen (Tamassia, Calzetti et al. 2007; Brownell, Wagoner et al. 2013). Im Gegensatz zu dem ADAR1-vermittelten Effekt auf die TRIF-abhängige Signalgebung, der selektiv auf die IRF3-abhängige Typ I IFN-Induktion wirkt, zeigt sich hier auch ein Einfluss auf die hauptsächlich NF- $\kappa$ B-vermittelte IL6-Produktion. Die von der ADAR1-Defizienz nach Stimulation mit SeV oder dem VACV70mer unveränderten IP10-Spiegel in den Zellüberständen zeigen aber, dass ein genereller Defekt des Reaktionsvermögens der defizienten Makrophagen auszuschließen ist. Vielmehr kann von einer speziellen Funktion des ADAR1-Proteins, v.a. in Bezug auf die durch die Transkriptionsfaktoren IRF3- und IRF7-vermittelte Typ I IFN-Induktion ausgegangen, werden. Dieser verhält sich erstaunlicherweise gegensätzlich zur Funktion innerhalb der TRIF-abhängigen Typ I IFN-Induktion. Während ADAR1 TRIF-abhängig als Typ I IFN-Suppressor fungiert, so verhält sich ADAR1 im Rahmen der hier beschriebenen und diskutierten TRIF-unabhängigen Signalgebung als Typ I IFN-Aktivator. Dabei kann ADAR1 zum einen direkt auf IRF3 oder IRF7 wirken, zum anderen aber auch weitere Signalmoleküle aufwärts von IRF3 oder IRF7 beeinflussen.



Auch hier gab eine Microarray-Analyse von ADAR1-defizienten Makrophagen im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Makrophagen umfassende Einblicke in Bezug auf veränderte Genexpressionen im Zusammenhang mit der ADAR1-Defizienz (4.2.4 und Abb. 4.10). Diese sollten Hinweise auf einen zugrundeliegenden Mechanismus für die ADAR1-vermittelte, reduzierte Typ I IFN-Induktion nach TRIF-unabhängiger Stimulation geben. Die Microarray-Daten bestätigten auch hier die in diesem Kontext, im ELISA gemessene, verringerte Typ I IFN-Induktion nach TRIF-unabhängiger SeV Infektion auf mRNA-Ebene (Abb. 4.9, B).

Die Microarray-Daten wurden schon im vorangegangenen Abschnitt (5.1.1) vorgestellt und deswegen werden hier nur kurz Besonderheiten in Bezug auf die SeV Infektion dargestellt. Größtenteils ergab sich unabhängig von der Stimulation mit TRIF-abhängigem LPS oder TRIF-unabhängiger SeV Infektion ein ähnliches Muster an hoch- bzw. herabregulierten Genen in ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Makrophagen. Auffällig war aber, dass insgesamt mehr differenziell regulierte Gene im Kontext der SeV Infektion gegenüber der LPS-Stimulation auftraten und zudem die differentielle Regulierung der Gene stärker ausfiel. Außerdem waren, im Einklang mit der reduzierten Typ I IFN-Induktion, 15 der 18 in der heat-map-erfassten IFN-assoziierten Gene (Sulf2V, Tnsf10, Mx1, Irf1, Mir155, Ifi47, Rsad2, Ifit2, Mx2, Socs, Ifit1, Trim21, Batf2, Iigp1, Cxcl11) in ADAR1-defizienten Makrophagen herabreguliert.

Aber auch im Kontext der SeV Infektion gaben die Microarray-Daten keinen weiteren Aufschluss über möglicherweise transkriptionell veränderte Signalmoleküle, die eine direkte Assoziation der ADAR1-Defizienz mit der beobachteten verminderten Typ I IFN-Freisetzung beschreiben. Jedoch muss auch hier angemerkt werden, dass die Microarray-Analyse ausschließlich zu einem Zeitpunkt (4 h) nach SeV Infektion stattfand und damit auch hier möglicherweise nicht das richtige Zeitfenster für entsprechende, potentiell transkriptionell veränderte Signalmoleküle gewählt wurde. Zudem können mit der Microarray-Analyse keine posttranslationalen Veränderungen exprimierter Moleküle erfasst werden. Aber gerade diese posttranslationalen Veränderungen v.a. in Form von Phosphorylierungen sind wichtige Marker für die Aktivierung vieler Signalmoleküle. Außerdem kann ADAR1, wie in 1.5 beschrieben, durch Editierung der mRNA-Transkripte posttranskriptionell die Genexpression auf Proteinebene verändern, ohne dass dies auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden kann.

Aus diesen Gründen ist es erforderlich entsprechende Gene auf Proteinebene zu untersuchen. Zur Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen für die beobachteten modulatorischen Eigenschaften von ADAR1 auf die Typ I IFN-Induktion und als Erweiterung der Microarray-Analyse wurden, wie auch schon für LPS-stimulierte Makrophagen, wichtige Signalmoleküle innerhalb der Typ I IFN-Induktionskaskade (1.3) in einer Kinetik mittels

Western Blot untersucht (4.2.5). Zu den untersuchten Signalmolekülen gehörten auch hier TBK1, IRF3, IRF7, STAT1 sowie die aktivierten, phosphorylierten Formen.

In Betrachtung der Signalgebung zur Typ I IFN-Induktion konvergiert im Kontext der hier betrachteten TRIF-unabhängigen Signalgebung die Signalweiterleitung in der Aktivierung von TBK1. Dies führt zur Aktivierung von IRF3 und IRF7 und schließlich zur Typ I IFN-Produktion. Da im Zusammenhang mit der TRIF-unabhängigen Stimulation mit SeV oder VACV70mer eine verminderte Typ I IFN-Induktion in ADAR1-defizienten Makrophagen beobachtet wurde, wurde eine verminderte Proteinexpression der entsprechenden Signalmoleküle und deren aktivierten, phosphorylierten Formen erwartet. Überraschenderweise zeigten die Western Blot-Analysen aber auch im Kontext der viralen Infektion eine konstitutiv erhöhte Expression der Signalmoleküle, die durch Infektion mit SeV überwiegend noch verstärkt wurde (Abb. 4.13). Damit wiesen die ADAR1-defizienten Makrophagen auch hier eine ausgeprägte Typ I IFN-Signatur auf. Die erhöhte Expression des IFN-induzierbaren Sca1-Moleküls, das in der Microarray-Analyse auch im viralen Kontext als eines der am stärksten hochregulierten Gene erschien (Abb. 4.10), deutete bereits eine solche Signatur an. Jedoch blieb gerade aufgrund der erhöhten Spiegel an phosphoryliertem TBK1 und dementsprechend der erhöhten Spiegel an aktiviertem, phosphoryliertem IRF3, die verminderte Sekretion an IFN $\beta$  völlig unverstanden. Für IRF7, einem weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor für eine effiziente Typ I IFN-Induktion, konnte in wildtyp Makrophagen eine Aktivierung detektiert werden, die in den ADAR1-defizienten Makrophagen trotz der konstitutiv erhöhten IRF7-Spiegel abgeschwächt war. Da die IRF7-Induktion sowie -Aktivierung einen wichtigen Schritt für ein vollständiges Induktionsprofil aller IFN $\alpha$ -Subtypen darstellt (Servant, Tenover et al. 2002), wird durch diese Beobachtung eine Reduzierung der IFN $\alpha$ -Sekretion in der späten Phase (nach 12 h) verständlich. IRF7 wird ebenso wie IRF3 durch die Kinase TBK1 phosphoryliert und aktiviert (Sharma, TenOver et al. 2003). Eine Erklärung für das Ausbleiben der IRF7-Phosphorylierung trotz der erhöhten Aktivität von TBK1, kann in Editierungs-abhängigen Prozessen liegen. Es wurde gezeigt, dass Aminosäure-Substitutionen an wichtigen regulatorischen Domänen für die Virus-induzierte Phosphorylierung im IRF7-Molekül zu einem Abbruch dieser Phosphorylierung führen (Marie, Durbin et al. 1998; Sato, Hata et al. 1998; Marie, Smith et al. 2000). In diesem Zusammenhang ist vorstellbar, dass in ADAR1-defizienten Makrophagen eine fehlende, in Protein-kodierenden Bereichen vorkommende Editierung im IRF7-Molekül zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt, die nicht mehr die funktionale Phosphorylierungsstelle enthält. Kommt es in ADAR1-defizienten Zellen zu einer solchen Veränderung, wird eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von IRF7 vermindert. Da aber IRF3, und nicht IRF7, hauptsächlich an der initialen Typ I IFN-Induktion beteiligt ist, bleibt an dieser Stelle dennoch unverstanden, warum es

trotz erhöhter phosphorylierter IRF3-Spiegel schon in der initialen Phase nach 4 h zu einer starken Reduzierung der Typ I IFN kommt.

Um die widersprüchliche Beobachtung von erhöhter IRF3-Aktivierung aber dennoch verminderter Typ I IFN-Induktion nach TRIF-unabhängiger Stimulation aufzuklären wurde die nukleäre Translokation von IRF3 sowie von IRF7 nach Infektion mit SeV untersucht (4.2.6). Dazu wurden ADAR1-defiziente und im Vergleich ADAR1-kompetente Makrophagen mit SeV infiziert und, nach 12 h fixiert und IRF3 bzw. IRF7 mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert (4.2.6 und Abb. 4.15). Der gewählte Zeitpunkt richtete sich dabei nach der im Western Blot gezeigten Induktionsspitze von aktiviertem, phosphoryliertem IRF3 (Abb. 4.13). Wie zu erwarten, war in ADAR1-kompetenten Zellen eine intensive Translokation von IRF3 und IRF7 zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten die Fluoreszenzbilder eindrucksvoll ein völliges Fehlen der IRF3-Translokation in den Nucleus ADAR1-defizienter Zellen. Auch die IRF7-Translokation war dabei abgeschwächt, entsprechend der beschriebenen verminderten Aktivierung von IRF7. Diese Daten zeigen, dass trotz verstärkter IRF3-Aktivierung die IRF3-Translokation in den Nucleus ADAR1-defizienter Makrophagen verhindert und damit die Induktion der Typ I IFN-Antwort reduziert wird. Mögliche Ursachen für diese Beobachtung sind unter anderem in den Regulationsmechanismen der IRF3-Homöostase zu suchen. In uninfizierten Zellen verbleibt IRF3 im Zytoplasma. Dabei ist die zytoplasmatische Lokalisation abhängig von einem Kernexportsignal (NES) und wird durch einen Shuttle-Rezeptor namens CRM1 (chromosome region maintenance, auch bekannt als Exportin 1) vermittelt. Nach Infektion oder entsprechender Stimulation und spezifischer Phosphorylierung akkumuliert IRF3 im Nucleus. Die nukleäre Akkumulation wird durch eine Kern-Lokalisationssequenz (NLS) vermittelt. Diese NLS wird von bestimmten Importin- $\alpha$  Shuttle-Rezeptoren erkannt. Sowohl NLS als auch NES sind konstitutiv aktiv in uninfizierten Zellen, was zu einer ständigen IRF3-Translokation führt, wobei jedoch die zytoplasmatische Lokalisation dominant ist. Die nukleäre Akkumulation wird nach entsprechender Stimulation zum einen durch die Selektivität der Importin- $\alpha$  Shuttle-Rezeptoren und zum anderen durch die Retention von phosphoryliertem IRF3 im Nucleus aufgrund der Assoziation mit den nukleären Koaktivator-Proteinen CBP/p300 vermittelt (Kumar, McBride et al. 2000; Reich 2002). Dieses "Shuttling" ist ein stark regulierter Prozess, für den bereits einige regulierende Elemente beschrieben wurden, der aber nach wie vor noch nicht vollständig verstanden ist. So vermitteln verschiedene Moleküle die Ubiquitylierung von IRF3, führen zu dessen Degradation und limitieren schließlich damit die IRF3-Aktivität (Bibeau-Poirier, Gravel et al. 2006; Higgs, Ni Gabhann et al. 2008; Ran, Liu et al. 2011; Lei, Zhang et al. 2013). Andere Faktoren könnten dagegen die IRF3-Translokation im Sinne eines positiven Rückkopplungs-Mechanismus fördern. Die hier vorgestellten Daten lassen eine ADAR1-Funktion in einem solchen positiven Rückkopplungs-Mechanismus vermuten. In diesem Zusammenhang ist

denkbar, dass ADAR1 als IFN-induzierbares Protein zum einen die Translokation von IRF3 in den Zellkern begünstigt oder zum anderen auch die nukleäre Retention von IRF3 ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass ADAR1, als kurze ADAR1p110- und als lange, zytoplasmatisch vorkommende ADAR1p150-Form, effizient nach 12 h durch Infektion mit SeV induziert wird (Abb. 4.8). Da aber die IRF3-Translokation nicht einem generellen Defekt unterliegt, wie durch dessen effiziente Translokation zu einem frühen Zeitpunkt nach LPS-Stimulation in ADAR1-defizienten Makrophagen gezeigt wurde (Abb. 4.15), ist eine direkte Interaktion von ADAR1 mit IRF3, die dessen Translokation ermöglicht, auszuschließen. Darüber hinaus kann den unterschiedlichen Zeitpunkten, zu denen es abhängig vom Stimulus (LPS: 1 h; SeV: 12 h) zu einer effizienten IRF3-Translokation kam, eine entscheidende Bedeutung beigemessen werden. Denn, wie gezeigt, wird ADAR1 deutlich nach 12 h induziert (Abb. 4.8) (der Zeitpunkt an dem es in wildtyp Zellen nach SeV Infektion zu einer effizienten IRF3-Translokation kommt (Abb. 4.15), während die LPS-Stimulation schon nach 1 h ohne Induktion des ADAR1-Proteins (Abb. 4.8) zu einer entsprechenden Translokation führt (Abb. 4.15). In diesem Zusammenhang kann vor allem die zu späteren Zeitpunkten induzierte lange ADAR1p150-Form eine spezifische Funktion ausüben. Aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation von ADAR1p150 (Poulsen, Nilsson et al. 2001; Desterro, Keegan et al. 2003) ist eine Interaktion von ADAR1 mit zytoplasmatisch vorkommenden, induzierten Negativregulatoren von IRF3 denkbar. Diese Interaktion kann eine weitere Negativregulation von IRF3 verhindern und somit die Typ I IFN-Induktion fördern. In diesem Modell würde es in ADAR1-defizienten Zellen zu einer verstärkten Negativregulation von IRF3 kommen, was schließlich zu einer reduzierten Typ I IFN-Induktion führt. So wurde kürzlich beschrieben, dass eine Hyperphosphorylierung von IRF3 dessen nukleäre Translokation inhibieren kann (Wang, Wang et al. 2013). Möglicherweise kann ADAR1 diese Hyperphosphorylierung durch Interaktion mit einer entsprechenden Kinase limitieren. Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit der Regulation von Kernimport-Prozessen beleuchtet wurde, schließt eine Protein-Modifikation durch das Ubiquitin-ähnliche Protein ISG15 ein. Die Konjugation von ISG15 wird allgemein als ISGylierung bezeichnet. Sowohl ISG15 als auch die ISGylierungs-Maschinerie wird im Rahmen einer viralen Infektion induziert. Eine solche ISGylierung kann die Bindung bestimmter Moleküle an den Importin- $\alpha$ -Faktor und damit deren nukleäre Translokation inhibieren (Skaug and Chen 2010). Ein solcher Effekt von IRF3-ISGylierung ist zwar bisher noch nicht beschrieben, ist aber auch für IRF3 vorstellbar. Geht die induzierte, zytoplasmatische ADAR1p150-Form eine inhibitorische Interaktion mit Komponenten der ISGylierungs-Maschinerie ein, wird somit die IRF3-Translokation unterstützt, während bei ADAR1-Defizienz diese durch vermehrte ISGylierung inhibiert wird.

Außerdem kommt es im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife im Laufe der Typ I IFN-Induktion zur Expression inhibitorischer Moleküle (Hu, Chakravarty et al. 2008). In diesem Zusammenhang ist auch denkbar, dass die ADAR1-Defizienz keinen direkten Einfluss auf die Typ I IFN-Induktion in der späten Phase nimmt, sondern die per se erhöhte Expression der Signalmoleküle dann zu einer verstärkten Expression dieser Negativregulatoren führt.

Da in der zweiten Phase der Typ I IFN-Induktion auch verstärkt IRF3/IRF7-Heterodimere die entsprechenden Promotor-Regionen aktivieren (Honda, Takaoka et al. 2006; Honda and Taniguchi 2006), kann in ADAR1-defizienten Zellen auch die fehlende IRF7-Aktivierung und dadurch die abgeschwächte Bildung von aktiven IRF3/IRF7-Heterodimeren einen Beitrag zur fehlenden IRF3-Translokation leisten.

Zudem wurde im Kontext der inhibierten IRF3-Translokation durch die Microarray-Analyse der ADAR1-defizienten Makrophagen im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Zellen (4.2.4) rückblickend ein interessantes, differentiell reguliertes Molekül aufgezeigt. Trim21 (tripartite motif-containing 21) war nach SeV Infektion in ADAR1-defizienten Zellen deutlich herabreguliert, unterlag aber in unbehandelten und LPS-stimulierten Makrophagen keiner Regulation durch die ADAR1-Defizienz. Für TRIM21 wurde eine Funktion als wichtiger Regulator der IRF3-Aktivität beschrieben, wobei der Knockdown von TRIM21 die IRF3-vermittelte Genexpression stark beeinträchtigt (Yang, Shi et al. 2009). Eine durch die ADAR1-Defizienz verminderte TRIM21-Expression kann somit im viralen Kontext zur reduzierten IRF3-Translokation und der damit verbundenen reduzierten Typ I IFN-Expression beitragen.

Insgesamt beschreiben diese Daten einen deutlichen Defekt in der IRF3-Translokation nach TRIF-unabhängiger Stimulation mit SeV in ADAR1-defizienten Makrophagen, der zu einer stark reduzierten Typ I IFN-Sekretion führt. Dementsprechend zeigen pDCs, die die Induktion von Typ I IFN IRF3-unabhängig über IRF7 vermitteln (Honda, Takaoka et al. 2006; Tamura, Yanai et al. 2008), keine ADAR1-abhängigen Effekte auf die Typ I IFN-Induktion (Abb. 4.21). Diese Beobachtung unterstreicht nochmals eine spezifische, modulatorische Wirkung von ADAR1 auf IRF3, die in Abhängigkeit von dem Stimulus die Typ I IFN-Antwort reguliert. Zwar wurde in Makrophagen bei ADAR1-Defizienz auch eine Beeinträchtigung der IRF7-Phosphorylierung beobachtet, aber die nicht-beeinträchtigte Typ I IFN-Induktion in ADAR1-defizienten pDCs zeigt, dass diese Beobachtung keine Relevanz für pDCs hat. Für IRF7 sind multiple Phosphorylierungscluster beschrieben worden. Somit können in pDCs auch andere Phosphorylierungsmuster zur Aktivierung genutzt werden (Lin, Mamane et al. 2000; Caillaud, Hovanessian et al. 2005; Prakash and Levy 2006).

## 5.2. Einfluss von ADAR1 auf die Entwicklung von Immunzellen

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich, über das Typ I IFN-Aktivierungspotential hinaus, mit dem Einfluss von ADAR1 auf die Differenzierung verschiedener Immunzellen. Auf Grundlage der zuvor beschriebenen konditionellen Maussysteme (5.1) wurden verschiedene Immunzellen sowohl auf ihr Vorkommen als auch auf ihre Differenzierung in einem ADAR1-defizienten im Vergleich zu einem ADAR1-kompetenten Hintergrund untersucht. Dazu wurden zum einen Immunzellen *in vitro* mit entsprechenden Wachstumsfaktoren aus Knochenmarkszellen differenziert und zum anderen die Verteilung und Differenzierung verschiedener Immunzellen *in vivo* im Knochenmark sowie in peripheren lymphatischen Organen analysiert. Zu den *in vitro* differenzierten Immunzellen gehörten M-CSF-generierte Makrophagen, Flt3L-induzierte plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) sowie GM-CSF-generierte myeloide dendritische Zellen (mDCs). Da bei der *in vitro* Generierung der mDCs ein entscheidender Einfluss von ADAR1 auf die Differenzierungskapazität beobachtet wurde (4.3.1.3 und 5.2.1), konzentrierten sich die Untersuchungen im Weiteren auf verschiedene *in vivo* vorkommende DC-Subpopulationen im Knochenmark sowie in peripheren lymphatischen Organen.

Für einen ADAR1-vermittelten Einfluss auf die Differenzierung bestimmter Immunzellen sind, wie schon für den Einfluss auf IFN-assoziierte Signalwege ausführlich beschrieben (5.1), verschiedene Mechanismen vorstellbar.

Zum einen kann durch Editierung in Protein-kodierenden Bereichen entsprechender Transkriptionsfaktoren, die wichtig für die Differenzierung der Immunzellen sind, die Aktivität dieser verändert und die Differenzierungskapazität dadurch beeinflusst werden. Eine größere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang wahrscheinlich aber der beschriebenen Assoziation von ADAR1 mit der Prozessierung funktioneller miRNAs zu (Ota, Sakurai et al. 2013). Diesbezüglich wird im Zusammenhang mit dem auftretenden Sterben der hämatopoetischen Stammzellen im konstitutiv ADAR1-defizienten Mausmodell vermutet, dass das Fehlen der üblicherweise im Embryonalstadium auftretenden erhöhten miRNA-Prozessierung, zur Dysregulation vieler Gene führt. Es wird spekuliert, dass diese Gene normalerweise während dieses Stadiums reprimiert werden und eine normale Entwicklung des Embryos ermöglichen. Aber auch über das embryonale Stadium hinaus ist eine Beteiligung von miRNA-Prozessen an der Differenzierung von verschiedenen Immunzellen denkbar. Dabei bieten die hier verwendeten konditionellen ADAR1-defizienten Mausmodelle die Möglichkeit über einen weitumfassenden ADAR1-abhängigen Effekt hinaus einen entsprechenden ADAR1-Einfluss zelltypspezifisch zu untersuchen.

### 5.2.1. Einfluss von ADAR1 auf die Entwicklung *in vitro* differenzierter Immunzellen

Zu den im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* differenzierten Knochenmarkszellen gehörten M-CSF-generierte Makrophagen, Flt3L-induzierte pDCs sowie GM-CSF-generierte mDCs, die funktionell den konventionellen DCs (cDCs) zuzuordnen sind. Murine Makrophagen weisen sowohl eine Lysozym M- (Clausen, Burkhardt et al. 1999) als auch eine CD11c-Expression (Abb. 4.16) auf. Somit konnten ADAR1-defiziente Makrophagen zum einen aus dem ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre- und zum anderen aus dem ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Mausstamm differenziert werden. Da pDCs sowie mDCs zwar eine CD11c- (Abb. 4.17 und Abb. 4.19) aber keine Lysozym M-Expression zeigen, konnten diese Zellen ausschließlich aus dem CD11c-abhängigen, ADAR1-defizienten Mausstamm induziert werden.

Die M-CSF-Kulturen aus dem Knochenmark des ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre- sowie des ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Mausstamms zeigten in ADAR1-defizienten und ADAR1-kompetenten Zellkulturen eine vergleichbare Anreicherung an F4/80-positiven Makrophagen (Abb. 4.4). Somit ist ein genereller Einfluss von ADAR1 auf die Makrophagen-Differenzierung ausgeschlossen. Jedoch ergab die Analyse von weiteren Markern, die auch zur Charakterisierung bestimmter Makrophagen-Subpopulationen verwendet werden, eine ADAR1-abhängige Veränderung der Expressionsstärke dieser Marker. So sind ADAR1-defiziente Makrophagen durch eine erhöhte Expression von CD80 sowie CD86 charakterisiert, begleitet von einer intermediären CD206-Expression. Dagegen zeigen die Makrophagen aus den ADAR1-kompetenten Kulturen, eine für M-CSF-Kulturen typische, hohe Expression an CD206 (Abb. 4.5). Diese Expressionsprofile deuten für ADAR1-defiziente Makrophagen eine Polarisierung in Richtung der sogenannten M1-ähnlichen Makrophagen an, während ADAR1-kompetente Makrophagen durch ihr CD206-Profil einen M2-ähnlichen Makrophagen-Phänotyp aufwiesen, wie er auch für M-CSF-Kulturen beschrieben wurde (Fleetwood, Lawrence et al. 2007). ADAR1 scheint somit den M2-ähnlichen Phänotyp in M-CSF-Kulturen zu stabilisieren, während eine ADAR1-Defizienz zur Polarisierung dieser Zellen zu einem M1-ähnlichen Phänotyp führt. Die Einteilung von Makrophagen in die verschiedenen Kategorien der M1- und M2-Klassifizierung beruht auf den unterschiedlichen Induktionswegen sowie den unterschiedlichen Aktivierungspotentialen dieser Zellen. M1-Makrophagen gelten als klassisch aktivierte Zellen und stellen potente Effektorzellen gegen Mikroorganismen und Tumorzellen dar. Sie werden daher auch als inflammatorische Makrophagen bezeichnet. M2-Makrophagen dagegen gelten als alternativ aktivierte Makrophagen und spielen vor allem eine Rolle bei der Wundheilung sowie der Produktion von anti-inflammatorischen Molekülen. Sie werden daher auch als anti-inflammatorische Makrophagen bezeichnet (Liu and Yang 2013). Der M1-ähnliche Phänotyp

der ADAR1-defizienten Makrophagen korreliert mit der in diesen Zellen beobachteten erhöhten Typ I IFN-Signatur (Abb. 4.12 und Abb. 4.13). Zudem wurde für M1-ähnliche Makrophagen, im Gegensatz zu M2-ähnlichen Makrophagen, eine verstärkte Abhängigkeit des Phänotyps von der Typ I IFN-Signalgebung beschrieben (Fleetwood, Dinh et al. 2009). Diese Studie legt die in ADAR1-defizienten Makrophagen beobachtete erhöhte Typ I IFN-Signatur als Ursache für den veränderten M1-ähnlichen Makrophagen-Phänotypen nahe. Darüber hinaus werden aber auch miRNAs eine große Rolle bei der Regulation der Makrophagen-Polarisierung zugeschrieben (Liu and Abraham 2013). Da eine Assoziation von ADAR1 mit der Prozessierung funktioneller miRNAs bekannt ist (Ota, Sakurai et al. 2013), kann ADAR1 auch in diesem Zusammenhang zur Makrophagen-Polarisierung beitragen. Die Ergebnisse bezüglich der Makrophagen-Differenzierung konnten für die *in vitro* generierten Zellen sowohl aus dem ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre- als auch aus dem ADAR1<sup>f7-9</sup>/CD11cCre-Mausstamm (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. Damit wird das Ergebnis auch hier in Hinblick auf einen möglichen Mausstamm-abhängigen bzw. artifiziellen Effekt validiert, der auf die für die konditionelle ADAR1-Defizienz benötigte Promotoraktivität zurückzuführen ist.

Für die Flt3L-induzierten pDCs konnte kein ADAR1-bedingter Einfluss auf die Differenzierung beobachtet werden. Sowohl im Hinblick auf die generelle, durch die CD11c-Expression gekennzeichnete Differenzierungskapazität (Abb. 4.17) als auch im Hinblick auf die Expression verschiedener Aktivierungsmarker (CD80 und CD86, Daten nicht gezeigt) waren keine Unterschiede zwischen ADAR1-defizienten und ADAR1-kompetenten Zellen nachzuweisen. Interessanterweise zeigten die pDCs im Gegensatz zu den Makrophagen auch schon im Zusammenhang mit dem untersuchten Typ I IFN-Aktivierungspotential keine ADAR1-abhängigen Unterschiede (Abb. 4.21). Diesbezüglich wurde die fehlende IRF3-Abhängigkeit in pDCs als mögliche Ursache für die fehlende ADAR1-Abhängigkeit auf die Typ I-IFN-Induktion diskutiert (5.1.2). Möglicherweise ist auch hier eine IRF3-Abhängigkeit verantwortlich für eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern, die dann folgegemäß nicht in IRF3-unabhängigen pDCs auftritt.

Um einen weiteren Zelltyp zu untersuchen wurden mDCs *in vitro* mittels GM-CSF differenziert (4.3.1.3). Überraschenderweise konnten bei ADAR1-Defizienz keine mDCs differenziert werden, während ADAR1-kompetente Kulturen eine für mDC-Kulturen übliche Zellausbeute (Abb. 4.18) sowie ein entsprechendes Differenzierungsprofil (Abb. 4.19) aufwiesen.

Generell ist für die Differenzierung der verschiedenen dendritischen Zellpopulationen eine kombinatorische Expression vieler verschiedener Transkriptionsfaktoren notwendig (Moore and Anderson 2013). Für *in vitro* GM-CSF-generierte mDCs wurde im Gegensatz zu Flt3L-induzierten pDCs eine Abhängigkeit von IRF4 gezeigt (Tamura, Taylor et al. 2005). Wie schon in Makrophagen für die IRF3-Translokation gezeigt (5.1.2), ist in mDCs auch eine Inhibition der IRF4-Translokation bei ADAR1-Defizienz vorstellbar, die dann zu einem Block in der mDC-



Differenzierung führt. Darüber hinaus wurde von Honda et al. gezeigt, dass IRF2 essentiell und spezifisch für die Entwicklung von mDCs ist. IRF2 wirkt dabei als Negativ-Regulator der Typ I IFN-Signalgebung. Eine IRF2-Defizienz führt in diesem Zusammenhang zu einer aberranten Typ I IFN-Signalgebung, die selektiv die mDC-Entwicklung beeinflusst (Honda, Mizutani et al. 2004). In diesem Zusammenhang kann die ADAR1-Aktivität mit einer normalen IRF2-Funktion assoziiert sein, die eine entsprechende mDC-Entwicklung gewährleistet.

Ein weiterer Beitrag zur dysregulierten mDC-Entwicklung kann aber auch mit einer erhöhten Typ I IFN-Signatur, wie sie schon in Makrophagen beobachtet wurde, assoziiert sein. Da gezeigt wurde, dass auch Typ I IFN die MHCII-Expression erhöhen können (Halloran, Urmson et al. 1989), lässt die erhöhte MHCII-Expression auf den verbleibenden Zellen der ADAR1-defizienten mDC-Kultur (Abb. 4.19 B) eine erhöhte Typ I IFN-Signatur in mDC-Vorläuferzellen vermuten. Es ist bekannt, dass durch die Typ I IFN-Signalgebung apoptotische Prozesse in Gang gesetzt werden. IRF3-abhängig werden dabei pro-apoptotische Gene wie Noxa induziert (Hiscott 2007; Goubau, Romieu-Mourez et al. 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Apoptose auch durch direkte Interaktion von IRF3, über eine neu identifizierte BH3-Domäne, mit dem pro-apoptotischen Protein Bax ausgelöst werden kann. Die Interaktion von IRF3 mit Bax führt zur Ko-Translokation dieses Komplexes in Mitochondrien und aktiviert den mitochondrialen apoptotischen Signalweg (Chattopadhyay, Marques et al. 2010). pDCs, die im Gegensatz zu mDCs IRF3-unabhängig die Typ I IFN-Antwort induzieren und nur eine geringe Expression von IRF3 aufweisen, wären in diesem Modell von der IRF3-vermittelten Apoptose nicht betroffen (Honda, Takaoka et al. 2006; Tamura, Yanai et al. 2008). In der Tat waren Flt3L-induzierte pDCs weder in Bezug auf ihre Differenzierungskapazität (Abb. 4.17) noch im Hinblick auf die Zellausbeuten (Daten nicht gezeigt) von der ADAR1-Defizienz beeinflusst. Die M-CSF-generierten Makrophagen, die wie mDCs IRF3-abhängig sind, zeigten in diesem Zusammenhang jedoch keine Unterschiede. Es wurde lediglich eine um ungefähr 20% reduzierte Zellzahl in ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten Kulturen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies kann auf unterschiedliche Sensitivitäten verschiedener Zelltypen auf pro-apoptotische Stimuli, unterschiedliche Expressionsstärken des IRF3-Proteins oder auch auf die Zelltyp-abhängige kompensatorische Induktion anti-apoptotischer Moleküle zurückgeführt werden (Scaffidi, Schmitz et al. 1999; Yang, Yue et al. 2010).

In Bezug auf die Sensitivität der mDCs kann in diesen Zellen ein bestimmter Schwellenwert überschritten werden, der in Makrophagen nicht erreicht wird. Zwar ist in ADAR1-defizienten Makrophagen die IRF3-Expression erhöht, eine zusätzlich veränderte Effizienz in der IRF2-Translokation kann in mDCs jedoch zum Erreichen des Schwellenwerts führen. Wie zuvor diskutiert, ist die Entwicklung bestimmter mDC-Populationen wesentlich von IRF2 abhängig. Es wurde gezeigt, dass diese Abhängigkeit auf der Funktion von IRF2 als Negativ-Regulator der

Typ I IFN-Signalgebung beruht (Ichikawa, Hida et al. 2004). Die Kombination aus verstärkter Typ I IFN-Signalgebung, die über IRF3 apoptotische Prozesse induziert und einer Defizienz in der IRF2-Translokation, die normalerweise die Typ I IFN-Signalgebung negativ reguliert, kann damit in ADAR1-defizienten mDCs zu dem beobachteten Phänotyp führen.

Über die pro-apoptotischen Effekte hinaus ist auch denkbar, dass ein Defekt in der GM-CSF-Signalgebung vorliegt. Diese Hypothese wird im nächsten Abschnitt diskutiert (5.2.2).

### **5.2.2. Einfluss von ADAR1 auf die *in vivo* Entwicklung von Immunzellen**

DCs im Allgemeinen sind bekannt als professionelle, Antigen-präsentierende Zellen, die die Brücke zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem bilden, indem sie Antigene aufnehmen, prozessieren und präsentieren. DCs bilden aber keine einheitliche Population, sondern setzen sich aus einer heterogenen Mischung von verschiedenen Populationen zusammen. Alle DCs sind zwar in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren, weisen aber spezifische Funktionen innerhalb der jeweiligen Population auf. Diese verschiedenen DC-Populationen sind primär durch die kombinatorische Expression bestimmter Zelloberflächenmarker definiert. Sie unterscheiden sich darüber hinaus aber auch in ihrer entwicklungsgeschichtlichen Herkunft, ihrer transkriptionellen Regulation, den entsprechenden Migrations- bzw. Verteilungsmustern und ihrer anatomischen und vom Mikromillieu-abhängigen Lokalisation. DCs werden zunächst in zwei unterschiedliche Kategorien eingeteilt: Konventionelle dendritische (conventional dendritic cells; cDCs) und nicht-konventionelle DCs. cDCs zeigen die typische DC-Form und -Funktion, während nicht-konventionelle DCs weniger im "Steady State", sondern vermehrt unter inflammatorischen Bedingungen von Bedeutung sind. Zu den nicht-konventionellen DCs gehören die von Monozyten abgeleiteten DCs sowie die pDCs als spezialisierte IFN-Produzenten. GM-CSF-differenzierte mDCs stellen das entsprechende Untersuchungsmodell für cDCs *in vitro* dar. *In vivo* cDCs können weiter in migratorische bzw. nicht-lymphoide und lymphoide cDCs unterschieden werden. Die Verteilung der lymphoiden cDCs beschränkt sich auf die lymphatischen Organe wie Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Thymus, wobei sie abhängig von der Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 weiter unterteilt werden. Migratorische/nicht-lymphoide cDCs besitzen die Fähigkeit von peripheren Geweben zu lymphatischen Organen zu wandern, wie z.B. Langerhans-Zellen. Somit ist die migratorische/nicht-lymphoide cDC-Population in der Haut, Lunge, intestinalen Geweben, der Leber und der Niere zu finden. (Kushwah and Hu 2011). Die nicht-lymphoiden cDCs bestehen hauptsächlich aus zwei unterschiedlichen Populationen, den CD103- und den CD11b-positiven cDCs. Die CD103-positive Population bildet sowohl bezüglich der Herkunft als auch der Funk-

tion das Gegenstück zu den lymphoiden CD8-positiven cDCs. Sie besiedeln die meisten Bindegewebe. Ihre funktionelle Spezialisierung liegt in der Erkennung von Pathogenen und Gewebeschäden, der Aktivierung von naiven CD8- und CD4-positiven T-Zellen und einem verstärkten Potential zur Kreuzpräsentation (Merad, Sathe et al. 2013). Eine weitere Spezialisierung liegt in der Beteiligung an der Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz durch die Deletion autoreaktiver T-Zellen und der Induktion Antigen-spezifischer regulatorischer T-Zellen (Tregs) (Bedoui, Whitney et al. 2009; Henri, Poulin et al. 2012).

Um auszuschließen, dass der unter Kulturbedingungen beobachtete Einfluss von ADAR1 auf die Differenzierungskapazität der mDCs nicht nur in *in vitro* Systemen auftritt, wurde die Verteilung verschiedener dendritischer Zellpopulationen *in vivo* untersucht (4.3.3 und 4.3.4). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DC-Population im Knochenmark als zentrales lymphatisches Organ und der Lunge als peripheres Organ gliedern sich in die beschriebenen DC-Kategorien ein. Die cDCs im Knochenmark setzen sich aus den lymphoiden cDCs zusammen, während die Lunge durch nicht-lymphoide cDCs besiedelt wird. Respiratorische DCs können somit hauptsächlich in vier Klassen gegliedert werden, die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden: die nicht-konventionellen pDCs und monozytischen DCs sowie die konventionellen CD103- und CD11b-positiven DCs (Hackstein, Wachtendorf et al. 2012).

Die im Knochenmark untersuchten DC-Populationen, zu denen die IFN-produzierenden pDCs sowie die konventionellen, auf Antigen-Präsentation spezialisierten CD4- bzw. CD8-positiven und doppelt-negativen DCs gehörten, zeigten keine Unterschiede bezüglich der prozentualen Verteilung (Abb. 4.22) sowie den absoluten Zellzahlen (Daten nicht gezeigt). Dagegen deckte die Analyse der in der Lunge vorkommenden DC-Populationen einen ADAR1-abhängigen Effekt auf. Untersucht wurden hier neben den pDCs, als weitere nicht-konventionelle dendritische Zellpopulation, monozytische dendritische Zellen (MoDCs) sowie von diesen abgeleitete CD11b-positive DCs. Konventionelle, Antigen-präsentierende DCs zeichnen sich in der Lunge durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD103 aus und wurden über diesen Marker identifiziert. Während die prozentuale Verteilung (Abb. 4.23) sowie die absolute Zellzahl (Daten nicht gezeigt) der pDCs, der MoDCs und der CD11b-positiven DCs keine signifikanten, ADAR1-abhängigen Unterschiede zeigten, konnten in den konditionell ADAR1-defizienten Mäusen keine CD103-positiven DCs detektiert werden.

Entwicklungsgeschichtlich sind CD103-positive cDCs in der Lunge und CD8-positive cDCs im Knochenmark auf den denselben Vorläufer zurückzuführen. Da ein selektiver ADAR1-abhängiger Effekt auf die CD103-positiven cDCs zu beobachten war, der sich nicht auf die CD8-positiven cDCs im Knochenmark auswirkte, ist anzunehmen, dass der Defekt erst direkt bei der Differenzierung in die CD103-positive cDC-Form evident wird. Somit spielt ADAR1 für die späte Phase der DC-Differenzierung eine Rolle, während Vorläuferzellen unbetroffen bleiben.

Generell geht die DC-Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aus. Die HSCs differenzieren zu allgemeinen lymphoiden Progenitor-Zellen (CLPs) und allgemeinen myeloiden Vorläufer-Zellen (CMPs). Aus den CMPs entsteht ein Makrophagen-DC-Progenitor (MDP), der zu einem DC-limitierten Vorläufer, dem allgemeinen DC-Progenitor (CDPs), differenziert. Aus diesen CDPs gehen anschließend im Knochenmark zum einen bisher nicht charakterisierte Vorläuferzellen für die pDC-Population hervor und zum anderen sogenannte pre-DCs, die in den Blutkreislauf eintreten und zu lymphatischen Organen und den peripheren Geweben migrieren. Dort differenzieren sie zu lymphoiden, CD8-positiven bzw. -negativen oder nicht-lymphoiden, CD103-positiven Gewebe-cDCs (Kushwah and Hu 2011). Unter Beachtung dieser Entwicklungshierarchie muss der selektive Effekt der ADAR1-Defizienz direkt bei der Differenzierung der pre-DC zu der CD103-positiven Zelle stattfinden. Pre-DCs bleiben dabei unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz, da nach wie vor CD8-positive bzw. -negative cDCs im Knochenmark entstehen. Wohlgermerkt ist dieser Effekt nicht auf das respiratorische Lungengewebe beschränkt, auch in Lymphknoten und in der Haut war die CD103-positive Population reduziert, wenn auch der Effekt in der Lunge am stärksten war (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf einen Gewebe-übergreifenden, generellen Defekt in der CD103-positiven cDC-Bildung hin. Die Differenzierung und Expansion der entsprechenden DC-Linien ist weitgehend extrinsisch durch die Wirkung verschiedener hämatopoetischer Zytokine reguliert. Das Zytokin Flt3L stellt dabei ein Schlüsselmolekül der DC-Differenzierung während der Hämatopoese dar. Der Rezeptor für Flt3L, Flt3, ist auf HSCs, CLPs und einer Teilpopulation der CMPs exprimiert. Flt3 bleibt auch auf den DC-Vorläufern einschließlich der MDPs, CDPs sowie der pre-DCs und schließlich auch auf den pDCs und allen cDCs erhalten. Dort vermittelt er die DC-Entwicklung einhergehend mit der DC-Homöostase und -Expansion (Merad, Sathe et al. 2013). Der selektive Effekt auf die CD103-positive cDC-Population, der in den anderen untersuchten DC-Populationen nicht auftrat, zeigt, dass die Flt3L- bzw. Flt3-Signalgebung nicht beeinflusst ist. Dafür spricht auch, dass die *in vitro* Differenzierung der pDC mittels Flt3L unbeeinflusst von der ADAR1-Defizienz blieb (4.3.1.2). Interessanterweise wurde aber die CD103-cDC-Entwicklung bzw. Erhaltung mit der Expression von einem weiteren Zytokin bzw. Wachstumsfaktor, der als GM-CSF bekannt ist, in Verbindung gebracht. Zwar zeigen Studien, dass GM-CSF nicht die Entwicklung der lymphoiden cDCs beeinflusst, jedoch wurde eine Reduktion der Anzahl an CD103-positiven cDCs in peripheren Geweben, wie dem Darm, der Haut und der Lunge von GM-CSF-defizienten Mäusen beobachtet. Entsprechend zeigen diese Gewebe im wildtyp Status eine hohe Expression an GM-CSF (Kingston, Schmid et al. 2009; King, Kroenke et al. 2010; Greter, Helft et al. 2012). Die verbleibenden Gewebe-cDCs in GM-CSF-defizienten Mäusen zeigten pro-apoptotische Defekte (Greter, Helft et al. 2012). Diese Beobachtung weist für GM-CSF eine essentielle Regulator-Funktion für das Überleben von cDCs in nicht-lymphoiden

Gewebe auf, die aber in lymphatischen Organen keine Rolle spielt. Diese Beobachtung gibt möglicherweise einen Hinweis auf die Ursache für die Beobachtung der fehlenden CD103-positiven DC-Population in konditionell ADAR1-defizienten Mäusen. Aufgrund der selektiven Abwesenheit der CD103-positiven cDCs im ADAR1-defizienten Hintergrund ist eine Dysfunktion in der GM-CSF-Signalgebung denkbar, die sich nicht auf die cDC-Entwicklung in lymphatischen Organen auswirkt. Die Hypothese eines durch die ADAR1-Defizienz vermittelten Defekts in der GM-CSF-Signalgebung wird weiter durch die Beobachtung der gestörten *in vitro* Differenzierung der mDCs mittels GM-CSF in ADAR1-defizienten Kulturen unterstützt (4.3.1.3). Auch hier liegt eine Dysfunktion der GM-CSF-Signalgebung nahe (5.2.1). Über die Beteiligung von GM-CSF an den finalen Stadien der cDC-Reifung hinaus, wurde für GM-CSF aber auch gezeigt, dass es die CD103-Expression auf Gewebe-cDCs reguliert (Sathe, Pooley et al. 2011; Zhan, Carrington et al. 2011; Greter, Helft et al. 2012). Somit kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgeschlossen werden, dass die CD103-Expression lediglich herabreguliert wird, die Zellpopulation somit an sich noch vorhanden ist, aber unentdeckt bleibt.

Wird jedoch von einem Fehlen der CD103-positiven cDC-Population ausgegangen, ist auch hier möglicherweise eine erhöhte Expression von IRF3, wie für ADAR1-defizienten Makrophagen gezeigt (4.2.5), an dem beobachteten Phänotyp beteiligt. Wie in 5.2.1 beschrieben und als Ursache für das fehlende Differenzierungspotential der ADAR1-defizienten GM-CSF-Kulturen diskutiert, kann die IRF3-Expression pro-apoptotische Prozesse induzieren. Eine erhöhte Expression von IRF3 und der dadurch induzierten pro-apoptotischen Prozesse zusammen mit einer gestörten GM-CSF-Signalgebung und dem damit einhergehendem Fehlen von entsprechenden Überlebenssignalen kann letztlich die Apoptose und damit das Verschwinden dieser Zellpopulation induzieren.

### 5.3. Ausblick

Dieser Abschnitt soll einen Überblick bzw. Ausblick auf die zukünftigen Fragestellungen geben, die sich aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ergeben.

Zwei zentrale Aspekte wurden innerhalb dieses Projektes erarbeitet. Zum einen konnte gezeigt werden, dass ADAR1 die Typ I IFN-Antwort moduliert, indem ADAR1-abhängig vor allem die IRF3-Expression und -Translokation modifiziert wird. Eine resultierende zentrale Fragestellung, zielt auf den Mechanismus, der ADAR1-abhängig zum einen die IRF3-Expression limitiert und zum anderen bei TRIF-unabhängiger Stimulation die IRF3-Translokation ermöglicht (5.1.2). Aufgrund der Domänenstruktur und der damit verbundenen Funktionen sind mehrere Möglichkeiten eines ADAR1-Einflusses denkbar, wie z.B. über die Deaminase-Domäne-vermittelte Editierungs-abhängige und über Z-DNA- bzw. RNA-Bindedomänen-vermittelte

Editierungs-unabhängige Mechanismen. Um einen ADAR1-abhängigen Mechanismus auf eine funktionelle Domäne innerhalb dieses Proteins zurückzuführen, können verschiedene ADAR1-Plasmid-Konstrukte eingesetzt werden, die durch spezifisch eingefügte Mutationen die Funktion einzelner Domänen blockieren. Mit diesen Konstrukten können dann die primären, ADAR1-defizienten Zellen transfiziert und rekonstituiert werden. Die Analyse der rekonstituierten Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen gibt Aufschluss über die verantwortliche funktionelle Domäne und damit über den Wirkungsmechanismus von ADAR1.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob ADAR1 die IRF3-Translokation nach TRIF-unabhängiger Stimulation durch direkte Protein-Protein-Interaktion oder durch indirektere Mechanismen begünstigt. Zu diesen indirekten Mechanismen kann z.B. die Editierung von für die Translokation wichtigen Domänen innerhalb des IRF3-Moleküls oder anderer beteiligter Moleküle beitragen. Zur Untersuchung dieses Aspektes können zum einen Ko-Immünpräzipitations-Assays von IRF3 und ADAR1 durchgeführt werden, durch die eine mögliche Protein-Protein-Interaktion der beiden Kandidaten nachgewiesen werden kann. Zum anderen kann eine Ko-Immünfärbung von IRF3 und ADAR1 und die anschließende Analyse über konfokale Mikroskopie eine Ko-Lokalisation dieser Proteine untersuchen.

Ein weiterer Aspekt der Typ I IFN-modulatorischen Eigenschaften von ADAR1 wird durch das limitierende Potential von ADAR1 auf die TRIF-abhängige Typ I IFN-Induktion beschrieben (5.1.1). Wie schon in 5.1.1 diskutiert, liegt in diesem Zusammenhang eine Editierungs-abhängige Modifikation des TRIF-Proteins durch ADAR1 nahe. Eine Software-basierte Analyse zur Vorhersage möglicher Editierungspositionen wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführt, jedoch konnten diese bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein wesentlicher zukünftiger Forschungsaspekt wird sich dementsprechend mit dem Nachweis der ADAR1-abhängigen TRIF-Editierungen und einem entsprechenden funktionellen Zusammenhang mit einer erhöhten TRIF-Signalgebung beschäftigen. Zum Nachweis der ADAR1-abhängigen Editierungspositionen muss die mRNA aus den entsprechenden Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, die TRIF Sequenz spezifisch amplifiziert und schließlich in einer Sequenzanalyse im Vergleich zu entsprechenden Analysen von ADAR1-defizienten Zellen untersucht werden. Das bei der Editierungsreaktion generierte Inosin wird in der cDNA Sequenz als Guanodin anstatt als Thymin dargestellt. Somit ist durch einen Abgleich der Sequenzen aus ADAR1-kompetenten und ADAR1-defizienten Zellen eine Aussage über Editierungspositionen möglich. Sind diese Positionen identifiziert, können TRIF-Konstrukte generiert werden, welche die abweichenden TRIF-Sequenzen enthalten. Diese können dann in entsprechenden Reporter-Gen-Assays eingesetzt werden, die das Aktivierungspotential auf einen IFN $\beta$ -Promotor abbilden. Im Vergleich mit den Ergebnissen für das nicht modifizierte

TRIF-Konstrukt ist eine Aussage über die funktionellen Konsequenzen einer Editierung an den entsprechenden Positionen möglich.

Die beobachteten Effekte können aber auch auf Veränderungen in der miRNA-Prozessierung oder -Sequenz zurückzuführen sein. In zukünftigen Projekten können mit Hilfe moderner Sequenzierungsmethoden, wie dem „deep sequencing“ die Sequenzen der miRNAs in ADAR1-kompetenten im Vergleich zu ADAR1-defizienten Zellen flächendeckend analysiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen, konditionellen ADAR1-defizienten Mausmodelle ermöglichen weiterführend eine zelltypspezifische Untersuchung der miRNAs in Abhängigkeit von ADAR1.

Der zweite zentrale Aspekt innerhalb dieses Projektes beschäftigte sich mit dem Einfluss von ADAR1 auf die Differenzierung verschiedener Immunzellen (5.2). Dabei wurde für ADAR1 eine kritische Rolle bei der GM-CSF-abhängigen *in vitro* Differenzierung von mDCs (5.2.1) sowie der *in vivo* Differenzierung bzw. Bildung von nicht-lymphoiden, CD103-positiven cDCs (5.2.2) aufgezeigt. Weiterer Forschungsbedarf liegt hier in der Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus für das selektiv dysregulierte Differenzierungspotential im ADAR1-defizienten Hintergrund. Wie schon im vorherigen Abschnitt diskutiert (5.2.2), können auch Defekte in der GM-CSF-Signalgebung eine Rolle spielen. Für die GM-CSF-vermittelte *in vitro* Differenzierung ist in diesem Zusammenhang denkbar, Knochenmarkszellen während der Differenzierung mit Komponenten der GM-CSF-Signalgebung zu rekonstituieren. Lässt sich das Differenzierungspotential der mDCs in ADAR1-defizienten Kulturen durch exogen eingefügte Komponenten der GM-CSF-Signalgebung wiederherstellen, kann ein ADAR1-Einfluss auf die GM-CSF-Signalgebung verifiziert werden. In Bezug auf die *in vivo* Bildung der CD103-positiven cDCs muss vor allem untersucht werden, ob diese Population tatsächlich abwesend ist oder die CD103-Expression auf dieser Zellpopulation lediglich stark herabreguliert ist.

Letztlich muss versucht werden einen Zusammenhang zwischen der dysregulierten Typ I IFN-Signalgebung und den beobachteten selektiven Defekten in der Differenzierung der beschriebenen cDC-Populationen *in vitro* und *in vivo* herzustellen. Wie schon diskutiert, kann ein möglicher Zusammenhang in der erhöhten Expression von IRF3 bestehen, die pro-apoptotische Prozesse induzieren kann (Hiscott 2007; Goubau, Romieu-Mourez et al. 2009; Chattopadhyay, Marques et al. 2010). In diesem Kontext eröffnet eine kürzlich erschienene Studie ein weiteres Forschungsfeld. Diese Studie assoziierte Mutationen im humanen *ADAR1*-Gen mit dem Aicardi-Goutieres-Syndrom (AGS), einer schweren Autoimmunerkrankung, die ebenso wie in dem ADAR1-defizienten Knockout-Mausmodell durch eine erhöhte Typ I IFN-Signatur charakterisiert ist. Hierbei führt ein zellintrinsischer Mechanismus durch IFN-stimulierende Nukleinsäuren zur Initiation der Autoimmunreaktion. Es wird diskutiert, dass ADAR1 in diesem Kon-

text eine Rolle in der Limitierung einer zytoplasmatischen Akkumulation von dsRNAs spielt, die von genomischen, repetitiven Elementen generiert werden. (Rice, Kasher et al. 2013). Neben der beobachteten Typ I IFN-Signatur in ADAR1-defizienten Makrophagen, legen auch die Daten aus der Microarray-Analyse einen Zusammenhang mit Prozessen der Autoimmunität nahe. Viele der ADAR1-abhängig stark regulierten Gene waren assoziiert mit einer Funktion im Bereich von Zellstress und DNA-Reparatur (4.2.4). Da das AGS-Syndrom neben den beschriebenen ADAR1-Mutationen durch Mutationen in verschiedenen intrazellulären Enzymen (TREX1, SAMHD1, RNase H2), die am Nukleinsäure-Metabolismus beteiligt sind, verursacht wird (Behrendt and Roers 2013), ist die ADAR1-abhängige Regulation von Genen, die mit Zellstress und DNA Reparatur assoziiert sind, als mögliche Reaktion auf die im AGS auftretende Akkumulation der dsRNAs zu verstehen. Ein wesentlicher zukünftiger Forschungsgegenstand wird in diesem Zusammenhang in der Untersuchung von Autoimmun-Prozessen in den hier beschriebenen Mausmodellen liegen. Die konditionellen ADAR1-defizienten Mausmodelle bieten auch hier die Möglichkeit eine potentiell zelltypspezifische Beteiligung ADAR1-defizienter Zellen an autoimmunologischen Vorgängen zu verifizieren.



## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die immunregulativen Funktionen von ADAR1 charakterisiert. Die besondere Domänenstruktur sowie die IFN-Induzierbarkeit von ADAR1 lassen eine Funktion über die Editierung bekannter, neuronal spezifischer Substrate hinaus annehmen.

Durch einige Studien wurde diesbezüglich ein Zusammenhang von ADAR1 mit Typ I IFN-Signalwegen diskutiert, aber die Substrate bzw. die zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend unverstanden. Daher sollte die ADAR1-abhängige Beteiligung an der Typ I IFN-Antwort, im Kontext verschiedener PRR-Liganden und Viren, in verschiedenen Immunzellen ADAR1-defizienter Modelle untersucht und mögliche zelltypspezifische Effekte charakterisiert werden. Für die Untersuchungen wurden murine ADAR1-defiziente Makrophagen und dendritische Zellen auf Grundlage des Cre/loxP-Rekombinationssystems generiert (ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre oder CD11cCre). Für das humane System wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown in Monozyten etabliert.

Die Untersuchung des Typ I IFN-Aktivierungspotentials von ADAR1-defizienten im Vergleich zu ADAR1-kompetenten, murinen Makrophagen sowie von humanen Monozyten durch verschiedene PRR-Liganden und Viren zeigte eine stark ADAR1-abhängige, modulierte Sekretion von Typ I IFN (Abb. 6.1). Während die Stimulation mit TRIF-abhängigen PRR-Liganden zu einer verstärkten IFN $\beta$ -Freisetzung führte, war die Typ I IFN-Antwort nach Stimulation mit viralen PAMPs oder Infektion mit Viren, die die Signalgebung TRIF-unabhängig vermitteln, in ADAR1-defizienten Zellen stark reduziert. Weitere Untersuchungen der für die Typ I IFN-Signalgebung wichtigen Moleküle offenbarten eine ausgeprägte Typ I IFN-Signatur in ADAR1-defizienten Zellen nach TRIF-abhängiger Stimulation entsprechend den beobachteten erhöhten IFN $\beta$ -Spiegeln. Überraschenderweise wurde auch im Kontext TRIF-unabhängiger Stimulation die Typ I IFN-Signatur durch die ADAR1-Defizienz erhöht, während aber die Typ I IFN-Freisetzung stark reduziert war. Besonders die Expression von IRF3 sowie der aktivierten, phosphorylierten Form war sowohl nach TRIF-abhängiger als auch nach TRIF-unabhängiger Stimulation erhöht. Immunfluoreszenz-Daten zeigten, dass im Kontext TRIF-unabhängiger Stimulation trotz der erhöhten IRF3-Expression, die nukleäre Translokation in ADAR1-defizienten Makrophagen ausblieb, während die TRIF-abhängige Stimulation eine effiziente IRF3-Translokation vermittelte. Diese Daten weisen ADAR1 eine bisher unbekannte Funktion als wichtigen Modulator der IRF3-vermittelten Typ I IFN-Antwort zu. In diesem Zusammenhang übt ADAR1 zum einen eine inhibitorische Funktion auf die TRIF-IRF3-Achse der Typ I IFN-Induktion aus. Zum anderen wird die IRF3-Translokation über die TRIF-unabhängige Signalgebung durch ADAR1 begünstigt, womit sich ADAR1 hier als Aktivator der IRF3-vermittelten Typ I IFN-Antwort zeigt. Folgerichtig

konnte kein signifikanter, ADAR1-abhängiger Effekt auf das Typ I IFN-Aktivierungspotential von pDCs beobachtet werden, die als auf IFN-Produktion spezialisierte Zellen die Typ I IFN-Antwort unabhängig von IRF3 induzieren. Zukünftige Untersuchungen werden die zugrundeliegenden Mechanismen der modulatorischen Funktionen von ADAR1 auf die IRF3-Translokation sowie auf die TRIF-Aktivität klären müssen.

Im Zuge der Untersuchung verschiedener ADAR1-defizienter Immunzellen wurde über den modulatorischen Effekt auf die Typ I IFN-Antwort hinaus, eine kritische Rolle der ADAR1-Funktion auf die Differenzierung von bestimmten cDCs *in vitro* sowie *in vivo* aufgezeigt. *In vitro* blieb in ADAR1-defizienten GM-CSF-Kulturen die Differenzierung zu mDCs vollständig aus, während *in vivo* die CD103-positive cDC-Zellpopulation in verschiedenen peripheren Organen konditionell ADAR1-defizienter Mäuse nicht detektiert werden konnte. Da sowohl die *in vitro* generierten mDCs als auch die CD103-positiven cDC-Population *in vivo* in Abhängigkeit von der GM-CSF-Signalgebung stehen, liegt ein durch die ADAR1-Defizienz-vermittelter Defekt dieser Signalgebung nahe. Weiterführende Experimente werden dies sowie einen möglichen Zusammenhang der dysregulierten cDC-Differenzierung mit den in Makrophagen beobachteten erhöhten Typ I IFN-Signatur klären müssen.

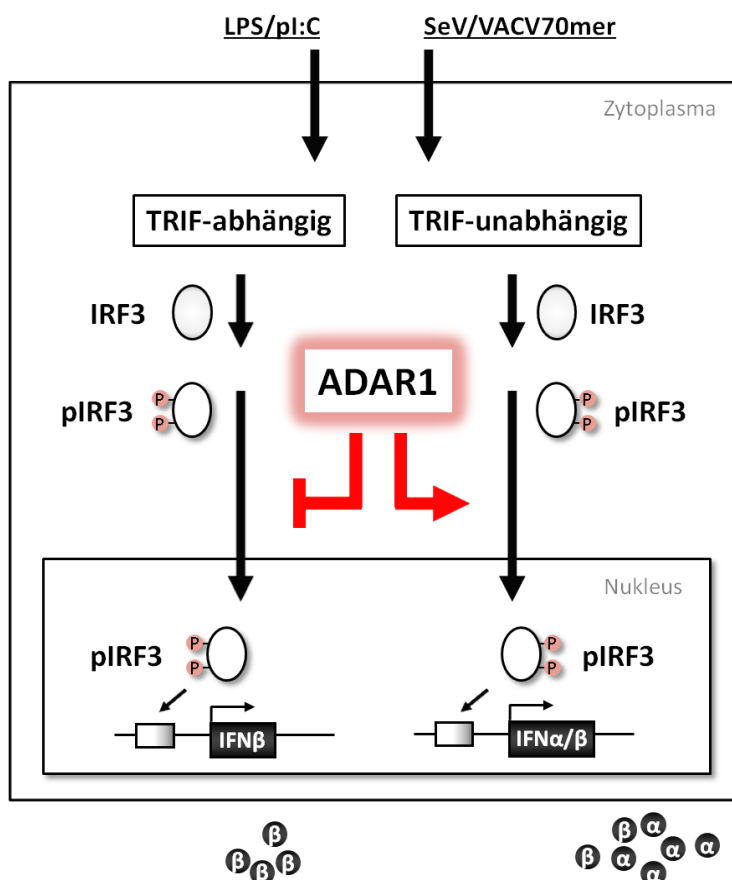


Abb. 6.1 ADAR1 als Typ I IFN-Modulator.

**Schlüsselwörter:** ADAR1, Typ I Interferon, TRIF, IRF3, Makrophagen, dendritische Zellen, Differenzierung, Editierung

## 6.1. Summary

Goal of this study was to characterize the immunoregulatory functions of ADAR1. The special domain structure as well as the IFN inducibility of ADAR1 supposes a function beyond the editing of known neuronal specific substrates. Some studies already associated ADAR1 with signaling processes within the type I IFN response, but the underlying mechanisms are largely unknown. Therefore the ADAR1-dependent involvement in the type I IFN response in the context of contact with various PRR ligands and viruses was investigated and potential cell type specific effects were characterized. For this purpose murine ADAR1-deficient macrophages and dendritic cells were established using the Cre/loxP recombination system (ADAR1<sup>f7-9</sup>/LysMCre or CD11cCre). For the human system an ADAR1 knockdown in human monocytes was developed by the use of siRNAs.

The analysis of the type I IFN activation potential by different PRR ligands and viruses showed in ADAR1-deficient in comparison to ADAR1-competent murine macrophages as well as in human monocytes a strongly modified release of type I IFNs in dependency on ADAR1. While stimulation with TRIF-dependent PRR ligands led to an increased IFN $\beta$  release, type I IFN response upon stimulation with viral PAMPs or infection with viruses, that trigger the signaling pathway in a TRIF-independent manner, was strongly decreased. Further investigations of signaling molecules, important for the induction of type I IFNs, revealed a remarkable pronounced type I IFN signature in ADAR1-deficient macrophages upon TRIF-dependent stimulation consistent with the increased IFN $\beta$  levels. Surprisingly ADAR1 deficiency increased even in context of TRIF-independent stimulation the type I IFN signature, however secretion of type I IFNs was strongly decreased. Notably IRF3 as well as the activated phosphorylated form were increased upon TRIF-dependent as well as TRIF-independent stimulation. Immunofluorescence data showed that in case of TRIF-independent signaling despite elevated IRF3 level the nuclear translocation of IRF3 was abolished in ADAR1-deficient macrophages, while TRIF-dependent stimulation still led to an efficient IRF3 translocalization. These findings indicate for ADAR1 a newly so far unknown function as an important modulator of type I IFN responses to PRR ligands and viral infections. In this context ADAR1 exerted on the one hand inhibitory functions on the TRIF-IRF3 axis in the type I IFN induction pathway, while in contrast to that IRF3 translocation downstream of TRIF independent signaling was strongly promoted by ADAR1 and hence revealed for ADAR1 in this case an activator function in IRF3-dependent type I IFN response. Consistently a significant ADAR1 dependent effect on the type I IFN activation potential of pDCs, which trigger the type I IFN response independently of IRF3, could not be observed. Further experiments have to elucidate the underlying mechanisms of the modulatory functions of ADAR1 on the IRF3 translocation as well as on the TRIF activity.

Additionally in the course of the analyses of different ADAR1 deficient immune cells a critical role for ADAR1 function in the differentiation of certain cDC populations was observed *in vitro* as well as *in vivo*. The *in vitro* differentiation of mDCs in ADAR1-deficient cultures was completely lost, while *in vivo* the CD103-positive cDC population in different peripheral organs of conditionally ADAR1-deficient mice was not detectable. Since *in vitro* generated cDCs as well as the CD103-positive cDC population *in vivo* show a dependency on GM-CSF signaling, a defect in this signaling pathway mediated by the ADAR1 deficiency suggested itself. Further investigations will clarify this issue and moreover a potential functional relation between the dysregulated cDC differentiation and a possibly increased type I IFN signature.

**Keywords:** ADAR1, type I interferon, TRIF, IRF3, macrophages, dendritic cells, differentiation, editing

### III. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdelsadik, A. and A. Trad (2011). "Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity." Human Immunology **72**(12): 1188-1193.
- Agranat, L., O. Raitskin, et al. (2008). "The editing enzyme ADAR1 and the mRNA surveillance protein hUpf1 interact in the cell nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5028-33.
- Ahmed, S., A. Maratha, et al. (2013). "TRIF-mediated TLR3 and TLR4 signaling is negatively regulated by ADAM15." J Immunol **190**(5): 2217-28.
- Akira, S. (2009). "Pathogen recognition by innate immunity and its signaling." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **85**(4): 143-56.
- Akira, S. (2011). "Innate immunity and adjuvants." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **366**(1579): 2748-55.
- Akira, S., H. Isshiki, et al. (1992). "Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6." Ciba Found Symp **167**: 47-62; discussion 62-7.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Akiyama, M. K. a. M. (2013). "Dyschromatosis Symmetrica Hereditaria and RNA Editing Enzyme." Current Genetics in Dermatology.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.
- An, H., W. Zhao, et al. (2006). "SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production." Immunity **25**(6): 919-28.
- Athanasidis, A., D. Placido, et al. (2005). "The crystal structure of the Zbeta domain of the RNA-editing enzyme ADAR1 reveals distinct conserved surfaces among Z-domains." J Mol Biol **351**(3): 496-507.
- Athanasidis, A., A. Rich, et al. (2004). "Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome." PLoS Biol **2**(12): e391.
- Au, W. C., P. A. Moore, et al. (1995). "Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11657-61.
- Bahn, J. H., J. H. Lee, et al. (2011). "Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing." Genome Res **22**(1): 142-50.

- Barraud, P. and F. H. Allain (2011). "ADAR proteins: double-stranded RNA and Z-DNA binding domains." Curr Top Microbiol Immunol **353**: 35-60.
- Bartlett, D. W. and M. E. Davis (2006). "Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging." Nucleic Acids Research **34**(1): 322-333.
- Bass, B. L. (2002). "RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA." Annu Rev Biochem **71**: 817-46.
- Bass, B. L. and H. Weintraub (1987). "A developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes." Cell **48**(4): 607-13.
- Bass, B. L. and H. Weintraub (1988). "An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate." Cell **55**(6): 1089-98.
- Bauer, S., C. J. Kirschning, et al. (2001). "Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9237-42.
- Bauer, S., S. Pigisch, et al. (2008). "Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9." Immunobiology **213**(3-4): 315-28.
- Bedoui, S., P. G. Whitney, et al. (2009). "Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells." Nat Immunol **10**(5): 488-95.
- Beghini, A., C. B. Ripamonti, et al. (2000). "RNA hyperediting and alternative splicing of hematopoietic cell phosphatase (PTPN6) gene in acute myeloid leukemia." Hum Mol Genet **9**(15): 2297-304.
- Behrendt, R. and A. Roers (2013). "Mouse models for Aicardi-Goutieres syndrome provide clues to the molecular pathogenesis of systemic autoimmunity." Clin Exp Immunol.
- Bibeau-Poirier, A., S. P. Gravel, et al. (2006). "Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation." J Immunol **177**(8): 5059-67.
- Blow, M., P. A. Futreal, et al. (2004). "A survey of RNA editing in human brain." Genome Res **14**(12): 2379-87.
- Blow, M. J., R. J. Grocock, et al. (2006). "RNA editing of human microRNAs." Genome Biol **7**(4): R27.
- Brasel, K., T. De Smedt, et al. (2000). "Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures." Blood **96**(9): 3029-39.
- Brawand, P., D. R. Fitzpatrick, et al. (2002). "Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs." J Immunol **169**(12): 6711-9.

- Brown, B. A., 2nd, K. Lowenhaupt, et al. (2000). "The alpha domain of the editing enzyme dsRNA adenosine deaminase binds left-handed Z-RNA as well as Z-DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13532-6.
- Brownell, J., J. Wagoner, et al. (2013). "Independent, parallel pathways to CXCL10 induction in HCV-infected hepatocytes." J Hepatol.
- Bryant, C. E. and T. P. Monie (2012). "Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity." Open Biol **2**(4): 120015.
- Burns, C. M., H. Chu, et al. (1997). "Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing." Nature **387**(6630): 303-8.
- Cabanas, C. and F. Sanchez-Madrid (1999). "CD11c (leukocyte integrin CR4 alpha subunit)." J Biol Regul Homeost Agents **13**(2): 134-6.
- Caillaud, A., A. G. Hovanessian, et al. (2005). "Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7." J Biol Chem **280**(18): 17671-7.
- Carpenter, S. and L. A. O'Neill (2009). "Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins." Biochem J **422**(1): 1-10.
- Carty, M., R. Goodbody, et al. (2006). "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." Nat Immunol **7**(10): 1074-81.
- Caton, M. L., M. R. Smith-Raska, et al. (2007). "Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen." J Exp Med **204**(7): 1653-64.
- Cavlar, T., A. Ablasser, et al. (2012). "Induction of type I IFNs by intracellular DNA-sensing pathways." Immunol Cell Biol **90**(5): 474-82.
- Cenci, C., R. Barzotti, et al. (2008). "Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation." J Biol Chem **283**(11): 7251-60.
- Cervantes, J. L., B. Weinerman, et al. (2012). "TLR8: the forgotten relative revindicated." Cell Mol Immunol **9**(6): 434-8.
- Chattopadhyay, S., J. T. Marques, et al. (2010). "Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax." Embo J **29**(10): 1762-73.
- Chen, C. X., D. S. Cho, et al. (2000). "A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains." Rna **6**(5): 755-67.
- Chen, L., Y. Li, et al. (2013). "Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma." Nat Med **19**(2): 209-16.

- Chilibeck, K. A., T. Wu, et al. (2006). "FRET analysis of in vivo dimerization by RNA-editing enzymes." J Biol Chem **281**(24): 16530-5.
- Cho, D. S., W. Yang, et al. (2003). "Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA." J Biol Chem **278**(19): 17093-102.
- Clausen, B. E., C. Burkhardt, et al. (1999). "Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice." Transgenic Res **8**(4): 265-77.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
- Das, A. K. and G. G. Carmichael (2007). "ADAR editing wobbles the microRNA world." ACS Chem Biol **2**(4): 217-20.
- Decker, T., M. Muller, et al. (2005). "The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection." Nat Rev Immunol **5**(9): 675-87.
- Desterro, J. M., L. P. Keegan, et al. (2005). "SUMO-1 modification alters ADAR1 editing activity." Mol Biol Cell **16**(11): 5115-26.
- Desterro, J. M., L. P. Keegan, et al. (2003). "Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus." J Cell Sci **116**(Pt 9): 1805-18.
- Doe, C. M., D. Relkovic, et al. (2009). "Loss of the imprinted snoRNA mbii-52 leads to increased 5htr2c pre-RNA editing and altered 5HT2CR-mediated behaviour." Hum Mol Genet **18**(12): 2140-8.
- Durbin, J. E., R. Hackenmiller, et al. (1996). "Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease." Cell **84**(3): 443-50.
- Eggington, J. M., T. Greene, et al. (2011). "Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA." Nat Commun **2**: 319.
- Elco, C. P., J. M. Guenther, et al. (2005). "Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3." J Virol **79**(7): 3920-9.
- Enstero, M., C. Daniel, et al. (2009). "Recognition and coupling of A-to-I edited sites are determined by the tertiary structure of the RNA." Nucleic Acids Res **37**(20): 6916-26.
- Field, A. K., A. A. Tytell, et al. (1967). "Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(3): 1004-10.
- Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, et al. (2003). "IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway." Nat Immunol **4**(5): 491-6.



- Fleetwood, A. J., H. Dinh, et al. (2009). "GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling." J Leukoc Biol **86**(2): 411-21.
- Fleetwood, A. J., T. Lawrence, et al. (2007). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation." J Immunol **178**(8): 5245-52.
- Fritz, J., A. Strehblow, et al. (2009). "RNA-regulated interaction of transportin-1 and exportin-5 with the double-stranded RNA-binding domain regulates nucleocytoplasmic shuttling of ADAR1." Mol Cell Biol **29**(6): 1487-97.
- Gallo, A., L. P. Keegan, et al. (2003). "An ADAR that edits transcripts encoding ion channel subunits functions as a dimer." Embo J **22**(13): 3421-30.
- George, C. X., S. Das, et al. (2008). "Organization of the mouse RNA-specific adenosine deaminase Adar1 gene 5'-region and demonstration of STAT1-independent, STAT2-dependent transcriptional activation by interferon." Virology **380**(2): 338-43.
- George, C. X., Z. Gan, et al. (2011). "Adenosine deaminases acting on RNA, RNA editing, and interferon action." J Interferon Cytokine Res **31**(1): 99-117.
- George, C. X. and C. E. Samuel (1999). "Characterization of the 5'-flanking region of the human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 gene and identification of an interferon-inducible ADAR1 promoter." Gene **229**(1-2): 203-13.
- George, C. X. and C. E. Samuel (1999). "Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4621-6.
- George, C. X., M. V. Wagner, et al. (2005). "Expression of interferon-inducible RNA adenosine deaminase ADAR1 during pathogen infection and mouse embryo development involves tissue-selective promoter utilization and alternative splicing." J Biol Chem **280**(15): 15020-8.
- Gerber, A., M. A. O'Connell, et al. (1997). "Two forms of human double-stranded RNA-specific editase 1 (hRED1) generated by the insertion of an Alu cassette." Rna **3**(5): 453-63.
- Gil, J. and M. Esteban (2000). "Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action." Apoptosis **5**(2): 107-14.
- Goubau, D., R. Romieu-Mourez, et al. (2009). "Transcriptional re-programming of primary macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7." Eur J Immunol **39**(2): 527-40.
- Greter, M., J. Helft, et al. (2012). "GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells." Immunity **36**(6): 1031-46.

- Guo, J. J., Q. L. Li, et al. (2006). "Histone deacetylation is involved in activation of CXCL10 upon IFN $\gamma$  stimulation." Mol Cells **22**(2): 163-7.
- Ha, S. C., J. Choi, et al. (2009). "The structures of non-CG-repeat Z-DNAs co-crystallized with the Z-DNA-binding domain, hZ alpha(ADAR1)." Nucleic Acids Res **37**(2): 629-37.
- Haas, T., J. Metzger, et al. (2008). "The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation." Immunity **28**(3): 315-23.
- Hackstein, H., A. Wachtendorf, et al. (2012). "Heterogeneity of respiratory dendritic cell subsets and lymphocyte populations in inbred mouse strains." Respir Res **13**: 94.
- Halloran, P. F., J. Urmson, et al. (1989). "Regulation of MHC expression in vivo. II. IFN-alpha/beta inducers and recombinant IFN-alpha modulate MHC antigen expression in mouse tissues." J Immunol **142**(12): 4241-7.
- Hamm, S., E. Latz, et al. (2010). "Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist." Immunobiology **215**(7): 559-69.
- Hansen, J. D., L. N. Vojtech, et al. (2011). "Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins." Dev Comp Immunol **35**(9): 886-97.
- Hartner, J. C., C. Schmittwolf, et al. (2004). "Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1." J Biol Chem **279**(6): 4894-902.
- Hartner, J. C., C. R. Walkley, et al. (2009). "ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling." Nat Immunol **10**(1): 109-15.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.
- Henri, S., L. F. Poulin, et al. (2012). "CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells." J Exp Med **207**(1): 189-206.
- Herbert, A., J. Alfken, et al. (1997). "A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8421-6.
- Hertzog, P. J. (2012). "Overview. Type I interferons as primers, activators and inhibitors of innate and adaptive immune responses." Immunol Cell Biol **90**(5): 471-3.
- Higgs, R., J. Ni Gabhann, et al. (2008). "The E3 ubiquitin ligase Ro52 negatively regulates IFN-beta production post-pathogen recognition by polyubiquitin-mediated degradation of IRF3." J Immunol **181**(3): 1780-6.
- Higuchi, M., S. Maas, et al. (2000). "Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2." Nature **406**(6791): 78-81.

- Higuchi, M., F. N. Single, et al. (1993). "RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency." Cell **75**(7): 1361-70.
- Hiscott, J. (2007). "Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation." J Biol Chem **282**(21): 15325-9.
- Hoebe, K., X. Du, et al. (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." Nature **424**(6950): 743-8.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, et al. (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-8.
- Holmes, C. and W. L. Stanford (2007). "Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma." Stem Cells **25**(6): 1339-47.
- Honda, K., T. Mizutani, et al. (2004). "Negative regulation of IFN-alpha/beta signaling by IFN regulatory factor 2 for homeostatic development of dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2416-21.
- Honda, K., A. Takaoka, et al. (2006). "Type I Inteferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors." Immunity **25**(3): 349-360.
- Honda, K. and T. Taniguchi (2006). "IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors." Nat Rev Immunol **6**(9): 644-58.
- Hoopengardner, B., T. Bhalla, et al. (2003). "Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics." Science **301**(5634): 832-6.
- Hsieh, C. S., H. M. Lee, et al. (2012). "Selection of regulatory T cells in the thymus." Nat Rev Immunol **12**(3): 157-67.
- Hu, X., S. D. Chakravarty, et al. (2008). "Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms." Immunol Rev **226**: 41-56.
- Ichikawa, E., S. Hida, et al. (2004). "Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(11): 3909-14.
- Iizasa, H. and K. Nishikura (2009). "A new function for the RNA-editing enzyme ADAR1." Nat Immunol **10**(1): 16-8.
- Iizasa, H., B. E. Wulff, et al. (2010). "Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency." J Biol Chem **285**(43): 33358-70.
- Inaba, K., M. Inaba, et al. (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **176**(6): 1693-702.

- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-67.
- Ishii, K. J., S. Koyama, et al. (2008). "Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections." Cell Host Microbe **3**(6): 352-63.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jiang, Q., L. A. Crews, et al. (2012). "ADAR1 promotes malignant progenitor reprogramming in chronic myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(3): 1041-6.
- Jiang, Q., L. A. Crews, et al. (2013). "ADAR1 promotes malignant progenitor reprogramming in chronic myeloid leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(3): 1041-6.
- Jiang, Z., T. W. Mak, et al. (2004). "Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3533-8.
- Jin, Y., W. Zhang, et al. (2009). "Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing." IUBMB Life **61**(6): 572-8.
- Kagan, J. C. (2012). "Defining the subcellular sites of innate immune signal transduction." Trends Immunol **33**(9): 442-8.
- Kagan, J. C., T. Su, et al. (2008). "TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta." Nat Immunol **9**(4): 361-8.
- Kaiser, W. J. and M. K. Offermann (2005). "Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif." J Immunol **174**(8): 4942-52.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (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): 1601-10.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." Nature **441**(7089): 101-5.
- Kawahara, Y., M. Megraw, et al. (2008). "Frequency and fate of microRNA editing in human brain." Nucleic Acids Res **36**(16): 5270-80.
- Kawahara, Y., B. Zinshteyn, et al. (2007). "RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex." EMBO Rep **8**(8): 763-9.
- Kawahara, Y., B. Zinshteyn, et al. (2007). "Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs." Science **315**(5815): 1137-40.

- Kawai, T. and S. Akira (2009). "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition." Int Immunol **21**(4): 317-37.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-84.
- Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity." Immunity **34**(5): 637-650.
- Keller, E. T., J. Wanagat, et al. (1996). "Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor." Front Biosci **1**: d340-57.
- Kim, D. D., T. T. Kim, et al. (2004). "Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome." Genome Res **14**(9): 1719-25.
- Kim, U., T. L. Garner, et al. (1994). "Purification and characterization of double-stranded RNA adenosine deaminase from bovine nuclear extracts." J Biol Chem **269**(18): 13480-9.
- Kim, U., Y. Wang, et al. (1994). "Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11457-61.
- Kim, V. N. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 376-85.
- King, I. L., M. A. Kroenke, et al. (2010). "GM-CSF-dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization." J Exp Med **207**(5): 953-61.
- Kingston, D., M. A. Schmid, et al. (2009). "The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis." Blood **114**(4): 835-43.
- Kishore, N., Q. K. Huynh, et al. (2002). "IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2." J Biol Chem **277**(16): 13840-7.
- Klein, L., M. Hinterberger, et al. (2009). "Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction." Nat Rev Immunol **9**(12): 833-44.
- Koblansky, A. A., D. Jankovic, et al. (2013). "Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*." Immunity **38**(1): 119-30.
- Koeris, M., L. Funke, et al. (2005). "Modulation of ADAR1 editing activity by Z-RNA in vitro." Nucleic Acids Res **33**(16): 5362-70.
- Koj, A. (1996). "Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines." Biochim Biophys Acta **1317**(2): 84-94.

- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." Int Rev Immunol **30**(1): 16-34.
- Kumar, K. P., K. M. McBride, et al. (2000). "Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1." Mol Cell Biol **20**(11): 4159-68.
- Kushwah, R. and J. Hu (2011). "Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system." Immunology **133**(4): 409-19.
- Lai, F., C. X. Chen, et al. (1997). "Editing of glutamate receptor B subunit ion channel RNAs by four alternatively spliced DRADA2 double-stranded RNA adenosine deaminases." Mol Cell Biol **17**(5): 2413-24.
- Lee, M. S. and Y. J. Kim (2007). "Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk." Annu Rev Biochem **76**: 447-80.
- Lehmann, K. A. and B. L. Bass (1999). "The importance of internal loops within RNA substrates of ADAR1." J Mol Biol **291**(1): 1-13.
- Lei, C. Q., Y. Zhang, et al. (2013). "FoxO1 negatively regulates cellular antiviral response by promoting degradation of IRF3." J Biol Chem **288**(18): 12596-604.
- Lei, M., Y. Liu, et al. (1998). "Adenovirus VAI RNA antagonizes the RNA-editing activity of the ADAR adenosine deaminase." Virology **245**(2): 188-96.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults." Cell **86**(6): 973-83.
- Levanon, E. Y., E. Eisenberg, et al. (2004). "Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome." Nat Biotechnol **22**(8): 1001-5.
- Levy, D. E., I. J. Marie, et al. (2011). "Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection." Curr Opin Virol **1**(6): 476-86.
- Li, J. B., E. Y. Levanon, et al. (2009). "Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing." Science **324**(5931): 1210-3.
- Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature **433**(7027): 769-73.
- Lin, R., C. Heylbroeck, et al. (1998). "Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation." Mol Cell Biol **18**(5): 2986-96.
- Lin, R., Y. Mamane, et al. (2000). "Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection." J Biol Chem **275**(44): 34320-7.

- Liu, G. and E. Abraham (2013). "MicroRNAs in immune response and macrophage polarization." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(2): 170-7.
- Liu, G. and H. Yang (2013). "Modulation of macrophage activation and programming in immunity." J Cell Physiol **228**(3): 502-12.
- Liu, Y., C. X. George, et al. (1997). "Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase." J Biol Chem **272**(7): 4419-28.
- Liu, Y. and C. E. Samuel (1999). "Editing of glutamate receptor subunit B pre-mRNA by splice-site variants of interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase ADAR1." J Biol Chem **274**(8): 5070-7.
- Luciano, D. J., H. Mirsky, et al. (2004). "RNA editing of a miRNA precursor." Rna **10**(8): 1174-7.
- Marcucci, R., J. Brindle, et al. (2011). "Pin1 and WWP2 regulate GluR2 Q/R site RNA editing by ADAR2 with opposing effects." Embo J **30**(20): 4211-22.
- Marie, I., J. E. Durbin, et al. (1998). "Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7." Embo J **17**(22): 6660-9.
- Marie, I., E. Smith, et al. (2000). "Phosphorylation-induced dimerization of interferon regulatory factor 7 unmasks DNA binding and a bipartite transactivation domain." Mol Cell Biol **20**(23): 8803-14.
- Matsumoto, M., S. Kikkawa, et al. (2002). "Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling." Biochem Biophys Res Commun **293**(5): 1364-9.
- Matsusaka, T., K. Fujikawa, et al. (1993). "Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10193-7.
- McAllister, C. S. and C. E. Samuel (2009). "The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon-beta and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors." J Biol Chem **284**(3): 1644-51.
- McAllister, C. S., A. M. Toth, et al. (2010). "Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus." J Virol **84**(1): 380-6.
- McCoy, C. E., S. Carpenter, et al. (2008). "Glucocorticoids inhibit IRF3 phosphorylation in response to Toll-like receptor-3 and -4 by targeting TBK1 activation." J Biol Chem **283**(21): 14277-85.
- Melcher, T., S. Maas, et al. (1996). "RED2, a brain-specific member of the RNA-specific adenosine deaminase family." J Biol Chem **271**(50): 31795-8.

- Melcher, T., S. Maas, et al. (1996). "A mammalian RNA editing enzyme." Nature **379**(6564): 460-4.
- Merad, M., P. Sathe, et al. (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." Annu Rev Immunol **31**: 563-604.
- Meraz, M. A., J. M. White, et al. (1996). "Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway." Cell **84**(3): 431-42.
- Mombereau, C., Y. Kawahara, et al. (2009). "Functional relevance of serotonin 2C receptor mRNA editing in antidepressant- and anxiety-like behaviors." Neuropharmacology **59**(6): 468-73.
- Moore, A. J. and M. K. Anderson (2013). "Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story." Adv Hematol **2013**: 949513.
- Murphy, K. (2011). Janeway's Immunobiology. New York, Garland Science Taylor & Francis Group.
- Netea, M. G., C. Wijmenga, et al. (2012). "Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility." Nat Immunol **13**(6): 535-42.
- Newton, K. and V. M. Dixit (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(3).
- Nie, Y., L. Ding, et al. (2005). "ADAR1 interacts with NF90 through double-stranded RNA and regulates NF90-mediated gene expression independently of RNA editing." Mol Cell Biol **25**(16): 6956-63.
- Nishikura, K. (2006). "Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 919-31.
- Nishikura, K. (2010). "Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases." Annu Rev Biochem **79**: 321-49.
- Nishikura, K., C. Yoo, et al. (1991). "Substrate specificity of the dsRNA unwinding/modifying activity." Embo J **10**(11): 3523-32.
- O'Connell, M. A., S. Krause, et al. (1995). "Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase." Mol Cell Biol **15**(3): 1389-97.
- Oldenburg, M., A. Kruger, et al. (2012). "TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification." Science **337**(6098): 1111-5.
- Orlandi, C., A. Barbon, et al. (2012). "Activity regulation of adenosine deaminases acting on RNA (ADARs)." Mol Neurobiol **45**(1): 61-75.



- Ota, H., M. Sakurai, et al. (2013). "ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing." Cell **153**(3): 575-89.
- Pandey, A. K., Y. Yang, et al. (2009). "NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis." PLoS Pathog **5**(7): e1000500.
- Patterson, J. B. and C. E. Samuel (1995). "Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase." Mol Cell Biol **15**(10): 5376-88.
- Paz, N., E. Y. Levanon, et al. (2007). "Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer." Genome Res **17**(11): 1586-95.
- Peng, P. L., X. Zhong, et al. (2006). "ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia." Neuron **49**(5): 719-33.
- Pfaller, C. K., Z. Li, et al. (2011). "Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response." Curr Opin Immunol **23**(5): 573-82.
- Polson, A. G., B. L. Bass, et al. (1996). "RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase." Nature **380**(6573): 454-6.
- Poulsen, H., J. Nilsson, et al. (2001). "CRM1 mediates the export of ADAR1 through a nuclear export signal within the Z-DNA binding domain." Mol Cell Biol **21**(22): 7862-71.
- Prakash, A. and D. E. Levy (2006). "Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability." Biochem Biophys Res Commun **342**(1): 50-6.
- Qian, C. and X. Cao (2012). "Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses." Ann N Y Acad Sci **1283**: 67-74.
- Raitskin, O., D. S. Cho, et al. (2001). "RNA editing activity is associated with splicing factors in InRNP particles: The nuclear pre-mRNA processing machinery." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6571-6.
- Ran, Y., T. T. Liu, et al. (2011). "SEN2 negatively regulates cellular antiviral response by deSUMOylating IRF3 and conditioning it for ubiquitination and degradation." J Mol Cell Biol **3**(5): 283-92.
- Rebagliati, M. R. and D. A. Melton (1987). "Antisense RNA injections in fertilized frog eggs reveal an RNA duplex unwinding activity." Cell **48**(4): 599-605.
- Reenan, R. A., C. J. Hanrahan, et al. (2000). "The mle(napts) RNA helicase mutation in drosophila results in a splicing catastrophe of the para Na<sup>+</sup> channel transcript in a region of RNA editing." Neuron **25**(1): 139-49.

- Reich, N. C. (2002). "Nuclear/cytoplasmic localization of IRFs in response to viral infection or interferon stimulation." J Interferon Cytokine Res **22**(1): 103-9.
- Rice, G. I., P. R. Kasher, et al. (2013). "Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature." Nat Genet **44**(11): 1243-8.
- Rula, E. Y., A. H. Lagrange, et al. (2008). "Developmental modulation of GABA(A) receptor function by RNA editing." J Neurosci **28**(24): 6196-201.
- Sakaguchi, S., H. Negishi, et al. (2003). "Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock." Biochem Biophys Res Commun **306**(4): 860-6.
- Samuel, C. E. (1993). "The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans." J Biol Chem **268**(11): 7603-6.
- Samuel, C. E. (2011). "ADARs: viruses and innate immunity." Curr Top Microbiol Immunol **353**: 163-95.
- Samuel, C. E. (2011). "Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral." Virology **411**(2): 180-193.
- Sathe, P., J. Pooley, et al. (2011). "The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells." J Immunol **186**(9): 5184-92.
- Sato, M., N. Hata, et al. (1998). "Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7." FEBS Lett **441**(1): 106-10.
- Sato, M., H. Suemori, et al. (2000). "Distinct and Essential Roles of Transcription Factors IRF-3 and IRF-7 in Response to Viruses for IFN- $\beta$ /IFN- $\gamma$  Gene Induction." Immunity **13**(4): 539-548.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-70.
- Scadden, A. D. and C. W. Smith (2001). "RNAi is antagonized by A-to-I hyper-editing." EMBO Rep **2**(12): 1107-11.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells." J Biol Chem **274**(32): 22532-8.
- Schindler, C., X. Y. Fu, et al. (1992). "Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7836-9.
- Sedger, L. M. (2013). "microRNA control of interferons and interferon induced anti-viral activity." Mol Immunol **56**(4): 781-793.

- Servant, M. J., B. Tenover, et al. (2002). "Overlapping and distinct mechanisms regulating IRF-3 and IRF-7 function." J Interferon Cytokine Res **22**(1): 49-58.
- Sharma, S., B. R. tenOver, et al. (2003). "Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway." Science **300**(5622): 1148-51.
- Shimokawa, T., M. F. Rahman, et al. (2013). "RNA editing of the GLI1 transcription factor modulates the output of Hedgehog signaling." RNA Biol **10**(2): 321-33.
- Shtrichman, R., I. Germanguz, et al. (2012). "Altered A-to-I RNA editing in human embryogenesis." PLoS One **7**(7): e41576.
- Shtrichman, R., D. M. Heithoff, et al. (2002). "Tissue selectivity of interferon-stimulated gene expression in mice infected with Dam(+) versus Dam(-) Salmonella enterica serovar Typhimurium strains." Infect Immun **70**(10): 5579-88.
- Skaug, B. and Z. J. Chen (2010). "Emerging role of ISG15 in antiviral immunity." Cell **143**(2): 187-90.
- Smale, S. T. (2012). "Transcriptional regulation in the innate immune system." Curr Opin Immunol **24**(1): 51-7.
- Solomon, O., S. Oren, et al. (2013). "Global regulation of alternative splicing by adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)." Rna **19**(5): 591-604.
- Stanley, E. R., D. M. Chen, et al. (1978). "Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor." Nature **274**(5667): 168-70.
- Steele, E. J. (2009). "Mechanism of somatic hypermutation: critical analysis of strand biased mutation signatures at A:T and G:C base pairs." Mol Immunol **46**(3): 305-20.
- Stefl, R., M. Xu, et al. (2006). "Structure and specific RNA binding of ADAR2 double-stranded RNA binding motifs." Structure **14**(2): 345-55.
- Steinman, R. A., Q. Yang, et al. (2012). "Deletion of the RNA-editing enzyme ADAR1 causes regression of established chronic myelogenous leukemia in mice." Int J Cancer **132**(8): 1741-50.
- Strahle, L., D. Garcin, et al. (2006). "Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta." Virology **351**(1): 101-11.
- Suhara, W., M. Yoneyama, et al. (2000). "Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300." J Biochem **128**(2): 301-7.
- Sun, L., J. Wu, et al. (2013). "Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway." Science **339**(6121): 786-91.

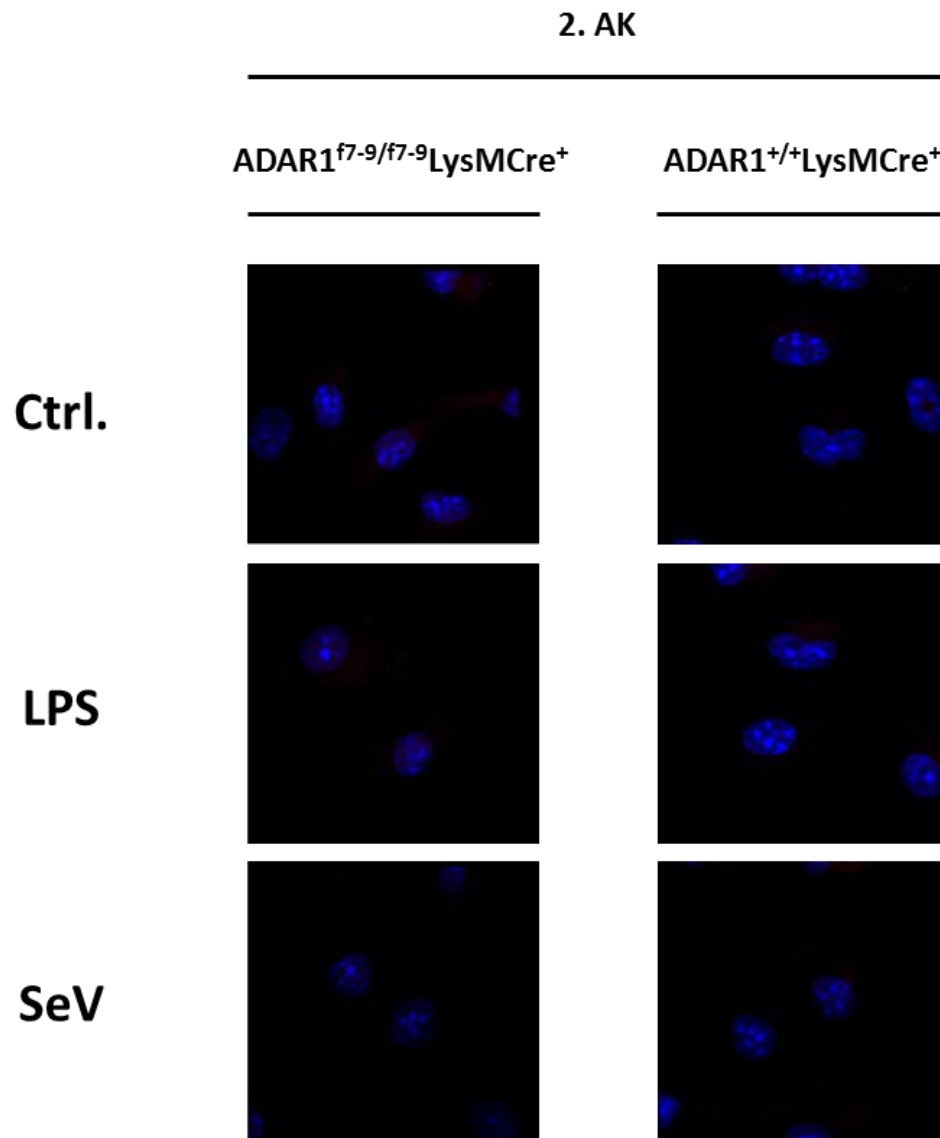
- Takahashi, M., T. Yoshimoto, et al. (2006). "Loss of function of the candidate tumor suppressor prox1 by RNA mutation in human cancer cells." Neoplasia **8**(12): 1003-10.
- Tamassia, N., F. Calzetti, et al. (2007). "Molecular mechanisms underlying the synergistic induction of CXCL10 by LPS and IFN-gamma in human neutrophils." Eur J Immunol **37**(9): 2627-34.
- Tamura, T., P. Taylor, et al. (2005). "IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity." J Immunol **174**(5): 2573-81.
- Tamura, T., H. Yanai, et al. (2008). "The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis." Annu Rev Immunol **26**: 535-84.
- Tan, B. Z., H. Huang, et al. (2009). "Dynamic regulation of RNA editing of ion channels and receptors in the mammalian nervous system." Mol Brain **2**: 13.
- Trinchieri, G. (2010). "Type I interferon: friend or foe?" J Exp Med **207**(10): 2053-63.
- Unterholzner, L., S. E. Keating, et al. (2010). "IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA." Nat Immunol **11**(11): 997-1004.
- Valente, L. and K. Nishikura (2007). "RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions." J Biol Chem **282**(22): 16054-61.
- Vitali, P. and A. D. Scadden (2010). "Double-stranded RNAs containing multiple IU pairs are sufficient to suppress interferon induction and apoptosis." Nat Struct Mol Biol **17**(9): 1043-50.
- Volz, T., S. Kaesler, et al. (2012). "Innate immune sensing 2.0 - from linear activation pathways to fine tuned and regulated innate immune networks." Exp Dermatol **21**(1): 61-9.
- Wagner, R. W., J. E. Smith, et al. (1989). "A double-stranded RNA unwinding activity introduces structural alterations by means of adenosine to inosine conversions in mammalian cells and Xenopus eggs." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2647-51.
- Wahlstedt, H., C. Daniel, et al. (2009). "Large-scale mRNA sequencing determines global regulation of RNA editing during brain development." Genome Res **19**(6): 978-86.
- Wang, Q. (2011). "RNA editing catalyzed by ADAR1 and its function in mammalian cells." Biochemistry (Mosc) **76**(8): 900-11.
- Wang, Q., J. Khillan, et al. (2000). "Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis." Science **290**(5497): 1765-8.
- Wang, Q., M. Miyakoda, et al. (2004). "Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene." J Biol Chem **279**(6): 4952-61.

- Wang, S., K. Wang, et al. (2013). "HSV-1 Serine/Threonine Kinase US3 Hyperphosphorylates IRF3 and Inhibits the IFN-beta production." J Virol.
- Watanabe, T., N. Asano, et al. (2010). "NOD1 contributes to mouse host defense against Helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway." J Clin Invest **120**(5): 1645-62.
- Wen, Z., Z. Zhong, et al. (1995). "Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-250.
- Werry, T. D., R. Loiacono, et al. (2008). "RNA editing of the serotonin 5HT2C receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function." Pharmacol Ther **119**(1): 7-23.
- Wu, J., L. Sun, et al. (2013). "Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA." Science **339**(6121): 826-30.
- XuFeng, R., M. J. Boyer, et al. (2009). "ADAR1 is required for hematopoietic progenitor cell survival via RNA editing." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17763-8.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.
- Yang, C. H., J. Yue, et al. (2010). "IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis." Cancer Res **70**(20): 8108-16.
- Yang, H., C. H. Lin, et al. (2003). "Interferon regulatory factor-7 synergizes with other transcription factors through multiple interactions with p300/CBP coactivators." J Biol Chem **278**(18): 15495-504.
- Yang, K., H. X. Shi, et al. (2009). "TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response." J Immunol **182**(6): 3782-92.
- Yang, W., T. P. Chendrimada, et al. (2006). "Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 13-21.
- Yang, W., Q. Wang, et al. (2005). "ADAR1 RNA deaminase limits short interfering RNA efficacy in mammalian cells." J Biol Chem **280**(5): 3946-53.
- Zhan, Y., E. M. Carrington, et al. (2011). "GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8(+) spleen dendritic cells." Eur J Immunol **41**(9): 2585-95.
- Zhang, Q., C. M. Zmasek, et al. (2010). "Domain architecture evolution of pattern-recognition receptors." Immunogenetics **62**(5): 263-72.

Zhang, Z. and G. G. Carmichael (2001). "The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs." Cell **106**(4): 465-75.

Ziegler-Heitbrock, H. W. (1995). "Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide." J Inflamm **45**(1): 13-26.

## IV. ANHANG



**Abb. IV.1** Sekundärantikörper-Kontrollen für Immunfluoreszenz-Färbungen von IRF3 und IRF7 in Makrophagen nach Stimulation mit LPS oder SeV. ADAR1-defiziente (ADAR1<sup>f7-9/f7-9</sup>LysMCre<sup>+</sup>) oder ADAR1-kompetente (ADAR1<sup>+/+</sup>LysMCre<sup>+</sup>) M-CSF-generierte Makrophagen wurden mit LPS [1 µg/ml] stimuliert, mit Sendai Virus (SeV) [2 MOI] infiziert oder unbehandelt belassen (Ctrl). Die Zellen wurden nur mit dem Fluoreszenz-markierten, sekundären Antikörper inkubiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Die Immunfluoreszenzen wurden mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Die Sekundärantikörper-Kontrollen (2.AK) zeigten keine unspezifische Färbung. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

## V. LISTE DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Bauer S., Bauer U., Becker, Bette, Brehm, Bröring, Burchert, Cordes, Daut, Del Rey, Eilers, Elsässer, Feuser, Garten, Garn, Glorius, Gudermann, Hasilik, Hassel, Hertl, Homberg, Huber, Jacob, Jungclas, Kirchner, Klenk, Knöllner, Krebber, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Matrosovich, Moll, Mühlberger, Müller, Müller-Brüsselbach, Novak, Renz, Roeper, Röhm, Schäfer, Schütz, Schwarz, Suske, Voigt, Weihe, Westermann.



## VI. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Bauer danke ich zunächst für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an diesem Institut durchzuführen und für die Bereitstellung eines spannenden Themas, das mir viel Raum der gedanklichen und praktischen Auseinandersetzung geboten hat ebenso wie für die wissenschaftliche Begleitung durch die vergangenen Jahre. Darüber hinaus konnte ich meinen wissenschaftlichen Horizont stets durch die Beteiligung an so manchen Kooperationen erweitern. Diese Kooperationen haben dieses Projekt sehr bereichert und ich möchte mich für die Möglichkeit und die Unterstützung dieser Kooperationen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Andreas Kaufmann, der diese Arbeit so wunderbar betreut hat, immer ein offenes Ohr für praktische und fachliche Probleme hatte und mich unterstützt hat, wo er konnte. Viele interessante Diskussionen haben diese Zeit sehr lehrreich gemacht und fachlich wie persönlich eine tolle Arbeitsatmosphäre geschaffen. Die vergangenen Jahre, in denen du mich nicht nur durch die Doktorarbeit, sondern zuvor auch schon durch Praktikum und Diplomarbeit begleitet hast, haben mich sehr geprägt und mich für die Zukunft ausgerüstet...kaum vorstellbar, dass jetzt ein neues Kapitel anfängt. Ich danke dir auch für das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit und die hilfreichen Anmerkungen. Ich weiß, der eine oder andere Satz war echt ne harte Nuss. An dieser Stelle möchte ich ebenso Gundi danken, die mich immer unterstützt hat und auch für die ein oder anderen geselligen Runden außerhalb des Laboralltags gesorgt hat. Ich danke dir für dein offenes Ohr, für die guten Ratschläge und deine Freundschaft.

Marion, dir sei gedankt für deine gute Seele und den ganzen Papierkram, den du immer für uns erledigt hast. Ebenso, möchte ich mich bei Henriette bedanken, dafür, dass du mich auf großartige Weise bei der ganzen Maus-Organisation unterstützt hast. Der kleinen Büro-WG sei herzlich für die diskussionsreichen, hilfreichen und lustigen Momente gedankt. Vicky, Hannah und Steffi, euch danke ich sehr für eure helfenden Hände. Egal ob es um ELISAs, Immunfärbungen oder um eine Pipettierhilfe ging, weil ich mir die Hand verletzt hatte, ihr seid immer zur Stelle gewesen. Eva, dir danke ich sehr für deine Freundschaft, dein gutes Zureden, dafür, dass du immer wieder Poster, Abstracts und Vorträge Korrektur gelesen hast, dass du dir den ein oder anderen Vortrag wahrscheinlich mehr als einmal angehört hast und für deine Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen. Ein großer Dank gilt auch meinen Helfern, die mir bei der Endkorrektur dieser Arbeit geholfen haben. Basti und Charlotte, ich danke euch für eure Zeit und das genaue Hinschauen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Besonders meinen Eltern und Basti danke ich für einen Platz, an den ich immer heimkehren und gestärkt nach vorne schauen kann.

## VII. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Die immunregulativen Funktionen von Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR1)*“ im Institut für Immunologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Stefan Bauer mit Unterstützung durch Andreas Kaufmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde im Rahmen von Kongressen als Poster oder Vortrag veröffentlicht:

### Poster

**J. Großmann**, C. Gürtler, A. Kaufmann, B. Opitz, S. Bauer (2013).  
*Analysis of the immunoregulatory function of ADAR1*  
43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI),  
Mainz

**J. Großmann**, C. Gürtler, B. Opitz, A. Kaufmann, S. Bauer (2012)  
*The immunoregulative role of Adenosine Deaminase acting on RNA 1*  
International Conference: Innate immunity of the lung - Improving  
pneumonia outcome, Berlin

**J. Großmann**, C. Gürtler, A. Kaufmann, S. Bauer (2011)  
*Analysis of the immunoregulative function of ADAR1*  
2011 Annual Joint Meeting the Italian Society for Immunology (SIICA)  
and the German Society for Immunology (DGfI), Riccione, Italien

### Vorträge

**J. Großmann**, C. Gürtler, A. Kaufmann, B. Opitz, Stefan Bauer(2013).  
*Analysis of the immunoregulative function of ADAR1*  
43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI),  
Mainz

---

Ort, Datum, Unterschrift (Jenny Großmann)