

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Charakterisierung der Liganden von  
*retinoic acid-inducible gene 1* in Vesicular-stomatitis-Virus-  
infizierten Zellen**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Andreas Linder

aus München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Adler

Priv. Doz. Dr. Dr. Albrecht von Brunn

Priv. Doz. Dr. Heike Pohla

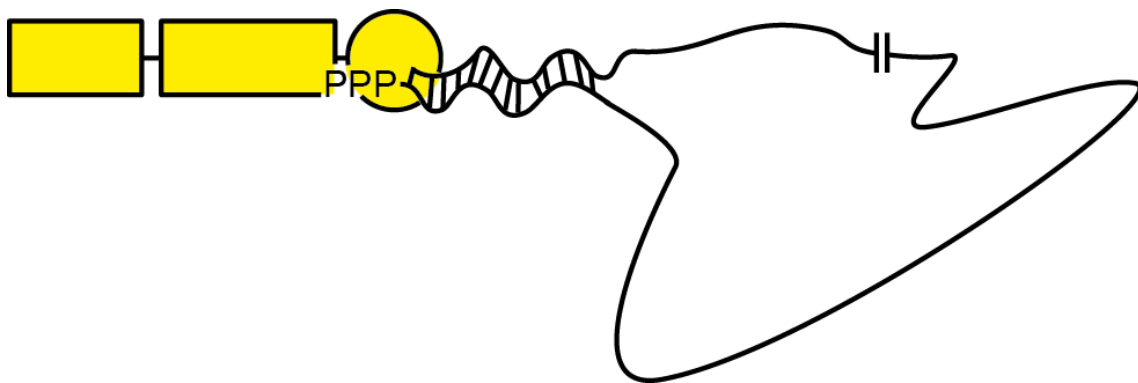
Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Andreas Schmidt

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2017

*Meinen Eltern, Nicolas, Anna und Manuela*



# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ebola, Impfungen und das angeborene Immunsystem.....	1
1.2 Mustererkennung durch die RIG-I- <i>like</i> -Helikasen.....	3
1.3 Virale Nukleinsäuren im Lebenszyklus der <i>Mononegavirales</i> .....	5
1.3.1 Eintritt .....	6
1.3.2 Transkription .....	7
1.3.3 Replikation .....	9
1.3.4 <i>Trailer</i> -RNA .....	9
1.3.5 <i>Defective-interfering</i> -Genome.....	10
1.4 Mögliche Liganden der RIG-I- <i>like</i> -Helikasen .....	11
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Materialien</b> .....	<b>16</b>
3.1 Reagenziensätze.....	16
3.2 Chemikalien.....	16
3.2.1 Chemikalien für den Umgang mit Proteinen.....	16
3.2.2 Zellkultur.....	17
3.2.3 Immunpräzipitation.....	17
3.2.4 Transfektion .....	18
3.2.5 Enzyme .....	18
3.3 Puffer und Lösungen .....	18
3.3.1 Lyse- und Enzympuffer .....	18
3.3.2 Immunpräzipitation.....	19
3.3.3 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	19
3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	19
3.3.5 <i>Western blot</i> .....	20
3.3.6 Medium für die Zellkultur .....	20
3.4 Verbrauchsmittel.....	20
3.5 Geräte.....	21
3.6 Software.....	21
<b>4. Methoden</b> .....	<b>22</b>
4.1 Zellkultur .....	22
4.1.1 Tetrazyklininduktion des FLAG-RIG-I-Promotors.....	22
4.1.2 Virusinfektion und Lyse.....	22
4.1.3 Cycloheximid-Behandlung von Zellen .....	23

4.2	Immunpräzipitation von RIG-I-RNA-Komplexen in FLAG-RIG-I-exprimierenden Zellen .....	24
4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western blot .....	25
4.4	RNA-Isolation .....	26
4.5	Reverse Transkription .....	27
4.6	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR .....	28
4.7	RNA-Sequenzierung mittels <i>next generation sequencing</i> .....	31
4.7.1	Erstellen einer cDNA- <i>library</i> .....	31
4.7.2	<i>Next generation sequencing</i> .....	35
4.7.3	Analyse der <i>Next-generation-sequencing</i> -Ergebnisse .....	35
4.8	Transfektion .....	37
4.9	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	38
4.10	Enzymatischer Verdau von RNA .....	40
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
5.1	Kinetik viraler RNAs in VSV-infizierten Zellen .....	41
5.2	Kinetik immunstimulatorischer RNA in VSV-infizierten Zellen .....	43
5.3	Die Entstehung immunstimulatorischer RNA in VSV-infizierten Zellen hängt von einer intakten Translation ab .....	45
5.4	Die Immunpräzipitation von FLAG-RIG-I ermöglicht die Aufreinigung immunstimulatorischer RNA .....	49
5.5	RIG-I bindet doppelsträngige 5'-Triphosphat-RNA in VSV-infizierten Zellen ..	51
5.6	Der größte Anteil mittels <i>next generation sequencing</i> detektierter RNA aus der Immunpräzipitation von RIG-I bindet unspezifisch an die <i>beads</i> .....	53
5.7	Der überwiegende Anteil viraler RNAs in der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen entspricht viralen mRNAs .....	55
5.8	Ein 4719 Nukleotide langes <i>Panhandle-defective-interfering</i> -Genom bindet an RIG-I .....	58
5.9	<i>Breakpoint</i> -Sequenzen bestätigen ein <i>Panhandle-defective-interfering</i> -Genom als Liganden von RIG-I .....	63
5.10	Sowohl antigenomische als auch genomische <i>Defective-interfering</i> -Genome binden an RIG-I .....	64
5.11	Das VSV-Volllängen-Genom bindet an RIG-I .....	67
5.12	Die spezifische Anreicherung viraler RNA-Sequenzen in der qRT-PCR bestätigt die <i>Next-generation-sequencing</i> -Ergebnisse .....	68
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
6.1	Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse .....	71

6.2	Folgedaten im Promotionsprojekt von Viktoria Bothe .....	72
6.3	Problematik der unspezifischen RNA-Bindung in RIG-I-Immünpräzipitationen	73
6.4	Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur .....	75
6.4.1	Der RIG-I-Ligand in VSV-infizierten Zellen erfüllt die in der Literatur beschriebenen strukturellen Charakteristika eines RIG-I-Liganden: Doppelsträngigkeit und 5'-Triphosphat .....	75
6.4.2	Replizierende <i>Defective-interfering</i> -Genome werden von RIG-I erkannt...	77
6.4.3	Die Proteinverpackung von Genomen und <i>Defective-interfering</i> -Genomen als Hindernis für die Erkennung durch RIG-I .....	82
6.4.4	Die Bedeutung der <i>Leader</i> - und <i>Trailer</i> -Region in der Ausbildung doppelsträngiger Bereiche im Genom.....	85
6.4.5	<i>Leader-N-read-through</i> -RNA als Bestandteil von RIG-I-Liganden .....	86
6.4.6	Die physiologische Bedeutung von <i>Defective-interfering</i> -Genomen .....	89
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>102</b>
<b>11.</b>	<b>Wissenschaftliche Beiträge .....</b>	<b>103</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Ebola, Impfungen und das angeborene Immunsystem

Der Ebola-Ausbruch 2015 in West-Afrika forderte über 11.000 Tote (Martinez et al. 2015). Das dafür verantwortliche Ebolavirus gehört zu den einzelsträngigen Negativstrang-RNA-Viren, den *Mononegavirales*. Diesen gehören eine Vielzahl humanpathogener Viren an, die große Bedeutung für die Weltgesundheit haben, so zum Beispiel Masernvirus, Mumpsvirus, *respiratory syncytial virus* (RSV), Tollwutvirus, Ebola- und Marburgvirus. Man geht davon aus, dass auch in Zukunft zahlreiche neue Krankheitserreger (sog. *emerging pathogens*) aus dieser Ordnung von Viren stammen werden. Sie sind aufgrund ihrer fehleranfälligen Polymerasen und der dadurch bedingten hohen Mutationsrate sehr anpassungsfähig, was ihnen den Sprung über Spezies-Grenzen ermöglicht.

Normalerweise schützt das Immunsystem den Menschen vor dem tödlichen Ausgang einer viralen Infektion. Dieses biologische Abwehrsystem gliedert sich dabei in zwei Verteidigungslinien. Die erste ist das angeborene Immunsystem. Es reagiert schnell auf eine Vielzahl von Pathogenen. Bei einer Virusinfektion kommt dabei dem Interferonsystem eine besondere Rolle zu. Interferone induzieren in infizierten Zellen ein antivirales Genprogramm, das die Vermehrung eines Virus in der Zelle erschwert, schützen benachbarte Zellen und rekrutieren Abwehrzellen, die die Infektion eindämmen und die Antwort der adaptiven Immunität einleiten. Diese stellt die zweite Verteidigungslinie des Immunsystems dar. Sie ist notwendig, um einen Erreger endgültig zu eliminieren und ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, das bei erneuter Exposition mit dem Pathogen vor der Erkrankung schützt.

Auch Impfungen machen sich die adaptive Immunität zu Nutze. Jedoch erfolgt der erste Kontakt des Immunsystem bei der Impfung nicht mit dem infektiösen Pathogen selbst, sondern mit einer attenuierten Variante, einem abgetöteten Pathogen oder nur einem Teil des Pathogens. Für eine erfolgreiche Impfung bedarf es neben dem Antigen, gegen das immunisiert werden soll, immer auch eines Stimulus für das angeborene Immunsystem, der diesem erlaubt, das Antigen als *fremd* zu klassifizieren. Auch für den



Schutz gegenüber Negativstrang-RNA-Viren bleibt die Impfung das erfolgreichste Konzept. So hat der Ebola-Ausbruch zu verstärkten internationalen Bemühungen um einen Impfstoff geführt. Der vielversprechendste Kandidat ist ein Impfstoff, der auf dem rekombinant veränderten *Vesicular-stomatitis-Virus* (VSV) beruht, der das Ebolavirus-Glykoprotein auf seiner Oberfläche trägt (rVSV/ZEBOV-GP oder VSV-EBOV). Ziel der Impfung ist eine Immunisierung gegen das von Ebola stammende Glykoprotein ohne das Risiko einer Ebola-Erkrankung durch das Impfvirus. Das als Träger verwendete VSV gehört ebenfalls zu den *Mononegavirales*, ist jedoch nicht humanpathogen. Es dient zum einen als Transportmittel für das Antigen, zum anderen als unerlässlicher Stimulus für das angeborene Immunsystem. In Guinea und Sierra Leone wurde der Impfstoff in Ringimpfungen erprobt. Dabei werden alle Kontaktpersonen eines Indexfalles geimpft. In der Kontrollgruppe werden alle Kontaktpersonen erst drei Wochen nach dem Indexfall geimpft. Mit diesem Studien-Design wird gewährleistet, dass im Gegensatz zu einer Placebo-kontrollierten Studie keinem der unter Risiko stehenden Probanden der Impfstoff verwehrt bleibt. Erste Ergebnisse sind vielversprechend: in der Kontrollgruppe traten nach verzögerter Impfung sechszehn Ebola-Fälle auf, in der sofort geimpften Kohorte kein einziger (Henao-Restrepo et al. 2015).

Der Impferfolg beruht vor allem auf der Bildung von neutralisierenden Antikörpern (Marzi et al. 2013). Jedoch zeigte ein Versuch an Makaken, dass auch eine Impfung sieben Tage vor Exposition mit dem Ebolavirus vor der Erkrankung schützt, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine Antikörper nachweisbar sind (Marzi et al. 2015). Die Autoren dieser Studie gehen davon aus, dass das angeborene Immunsystem die Infektion zu diesem frühen Zeitpunkt kontrolliert.

Für den Impferfolg scheint es dabei nicht unerheblich zu sein, dass VSV und Ebolavirus das angeborene Immunsystem über die gleiche Achse aktivieren. Unklar bleibt bislang welcher Teil von VSV dabei genau als Stimulus dient. Diese Frage ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Auch wenn die Details noch unbekannt sind, weiß man, dass VSV anhand seiner Ribonukleinsäure (RNA) erkannt wird. Das Wächtermolekül, das auf Seiten der infizierten Wirtszelle die Anwesenheit von VSV detektiert ist der Mustererkennungsrezeptor *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) (Yoneyama et al. 2004; Kato et al. 2006).

## 1.2 Mustererkennung durch die RIG-I-like-Helikasen

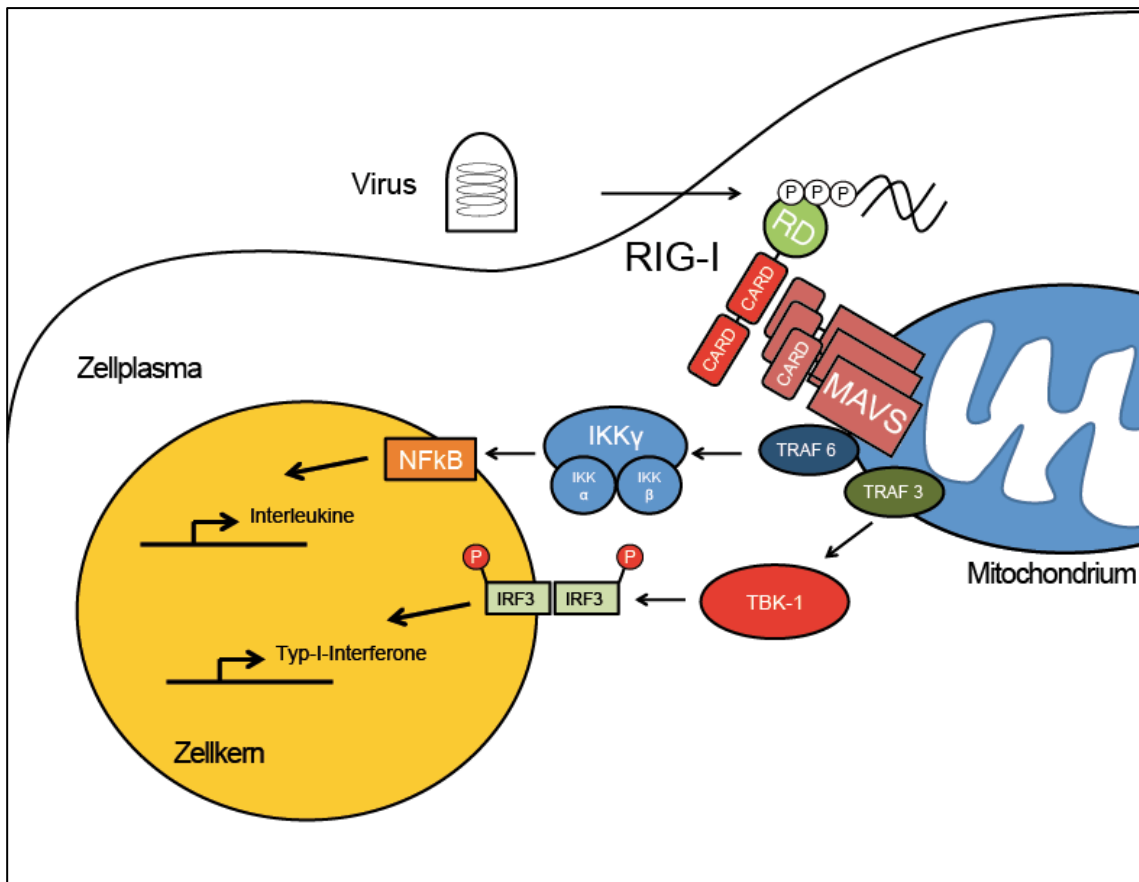


Abbildung 1 - Der RIG-I-Signalweg

Erläuterungen im Text

RIG-I ist namensgebendes Mitglied der Proteinfamilie der RIG-I-like-Helikasen (RLH). Weitere Mitglieder sind *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP-2). Diese Proteinfamilie gehört zu den Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems. Sie dienen der Perzeption fremder, mit Krankheitserregern (engl. *pathogen*) assoziierten Strukturen, sogenannter *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Ein PAMP kann im Prinzip jedes erdenkliche Molekül sein, sofern es folgende zwei entscheidende Eigenschaften aufweist: Erstens muss es die Struktur ermöglichen zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden und zweitens muss die Struktur für den pathogenen Organismus so elementar sein, dass er im Laufe der Evolution auch unter Selektionsdruck nicht auf sie zu verzichten gelernt hat. Das führt dazu, dass PAMPs

häufig konservierte Strukturen sind, die von mehreren Pathogenen geteilt werden. Das ermöglicht es dem Immunsystem, mit einem begrenzten Repertoire an Keimbahn-kodierten Rezeptoren eine Vielzahl an Pathogenen zu erkennen.

Bei Infektionen mit RNA-Viren gewährleisten die Aufgabe der Perzeption unter anderem RIG-I und seine Schwestermoleküle MDA5 und LGP-2. Im Fall der RLHs stellt die virale RNA den aktivierenden PAMP dar. Durch eine Infektion mit Viren gelangt deren RNA in die Zelle. RIG-I bindet an die RNA und aktiviert einen komplexen Signalwegs (siehe dazu Abbildung 1). Nach dem derzeitigen Modell kommt es nach Bindung der carboxyterminal gelegenen regulatorischen Domäne (RD-Domäne) und der Helikase-Domäne von RIG-I an eine als fremd klassifizierte RNA zu einer ATP-verbrauchenden Konformationsänderung (Kowalinski et al. 2011; Luo et al. 2011; Ng et al. 2012).

RIG-I wird daraufhin in Abhängigkeit von *tripartite motif containing 25* (TRIM25) ubiquitinyliert. Dann polymerisiert RIG-I und exponiert seine zwei aminoterminalen *caspase recruitment domains* (CARD-Domänen), um mit dem in der Signalkaskade nachgeschalteten *mitochondrial anti-viral signalling protein* (MAVS) über eine CARD-CARD-Interaktion zu kommunizieren (Kawai et al. 2005; Meylan et al. 2005; Seth et al. 2005; Xu et al. 2005). Das überwiegend auf der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisierte MAVS polymerisiert daraufhin ebenfalls und leitet das Signal unter Rekrutierung von Adapterproteinen weiter (Hou et al. 2011).

Der Adapter *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF) 6 übermittelt das Signal an den *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B)-Komplex, der Adapter TRAF 3 an das Protein *TANK-binding kinase 1* (TBK1). TBK1 phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren *interferon-regulatory factor* (IRF) 3 und IRF7. IRF3 bildet daraufhin einen Homodimer oder einen Heterodimer mit IRF7 und transloziert in den Zellkern. Das IRF3-Dimer bildet zusammen mit dem NF- $\kappa$ B-Komplex und weiteren Kofaktoren das *enhanceosome*. Dieses bindet und aktiviert den Interferon- (IFN)  $\beta$ - und den IFN- $\alpha_1$ -Promotor. Neben IFN- $\beta$  und IFN- $\alpha_1$  werden auch andere antivirale Proteine, sowie proinflammatorische Zytokine, wie *tumor necrosis factor* (TNF), Interleukin (IL)-1 $\beta$  und IL-6 induziert (Fitzgerald et al. 2003; Sharma et al. 2003).

Zu den Typ-1-Interferonen (IFN- $\alpha$ / $\beta$ ) werden die IFN- $\alpha$ -Proteinfamilie und das von einem einzigen Gen kodierte IFN- $\beta$  gezählt. Sie sind Botenstoffe, die autokrin

und parakrin die Anwesenheit eines Virus signalisieren.

IFN- $\alpha$ / $\beta$  vermitteln ihre Wirkung über den IFN-Rezeptor (IFNAR) und den nachgeschalteten *janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT)-Signalweg. Dieser mündet in der Aktivierung eines transkriptionellen Programms zur Virusabwehr, bei dem gleichzeitig einige hundert antivirale Proteine vermehrt exprimiert werden, die man unter dem Begriff der *interferon-stimulated genes* (ISGs) zusammenfasst (Schoggins et al. 2011). Die ISGs üben verschiedene Effektor-Funktionen aus: IFN- $\alpha$ / $\beta$ -stimulierte Zellen verändern durch Aktivierung der ISGs ihren Stoffwechsel, um eine anstehende oder bereits stattgefundenen Virusinfektion abzuwehren. Gleichzeitig leitet die Hochregulation der mit Virus-Epitopen beladenen *major histocompatibility-complex* (MHC)-Moleküle die adaptive Immunantwort ein. IFN- $\alpha$ / $\beta$  wiederum führt in einer positiven Rückkopplung zur vermehrten Bildung des antiviralen Proteins RIG-I.

Entscheidend für das Auslösen dieses Signalwegs bleibt jedoch sein Anfang: Die Interaktion von RIG-I mit seinem Liganden. Denn hier findet die Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst statt. Auch wenn einige essentielle Eigenschaften von RIG-I-Liganden entschlüsselt wurden, so zeichnet die Suche nach dem physiologischen PAMP im Rahmen viraler Infektionen kein einheitliches Bild. Insbesondere der RIG-I-Ligand während der Infektion mit VSV ist in der bisherigen Literatur noch nicht genau charakterisiert worden.

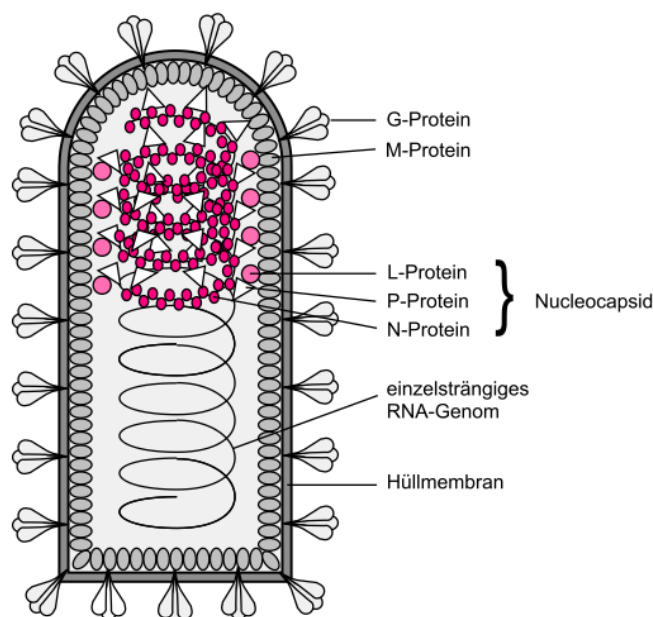
### **1.3 Virale Nukleinsäuren im Lebenszyklus der *Mononegavirales***

Das *Vesicular-stomatitis-Virus* (VSV) gehört zur Familie der *Rhabdoviridae* und der Ordnung der *Mononegavirales*. Es ist damit ein einzelsträngiges Negativ-Strang-RNA-Virus und in der Wissenschaft weit verbreitet als Infektionsmodell für diese Ordnung von Viren. Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm von VSV ist das *Vesicular-stomatitis-Indiana-Virus* (VSIV). VSV ist eng verwandt mit dem humanpathogenen Tollwutvirus. VSV kommt eine Bedeutung in der Veterinärmedizin zu. Die Symptome von infizierten Rindern ähneln denen der Maul- und Klauenseuche (Cargnelutti et al.

2014). Im Folgenden soll der Lebenszyklus der *Mononegavirales* anhand von VSV erläutert werden.

### 1.3.1 Eintritt

VSV bindet mit seinem hochaffinen Glykoprotein (G-Protein) an die Oberfläche von Zellen und gelangt von dort durch Endozytose in das Innere der Zelle.



**Abbildung 2 - Aufbau des VSV-Virion**

Das VSV-Virion ist 180 x 70 nm groß. Es ist behüllt und nicht bekapselt. In der Hüllmembran findet sich das Glykoprotein (G-Protein). An der Innenseite der Hüllmembran, wird das Virion durch das Matrix-Protein (M-Protein) stabilisiert. Das im Inneren befindliche RNA-Genom ist einzelsträngig und wird vom Nucleoprotein (N-Protein) und vom Phosphoprotein (P-Protein) umhüllt. Die als *large* Protein (L-Protein) bezeichnete Polymerase ist ebenfalls an das Genom assoziiert. Der Komplex aus RNA, dem N-, dem P- und dem L-Protein wird auch als Nucleokapsid oder Ribonucleoprotein bezeichnet. Abbildung aus (Modrow et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass der Eintritt von VSV in frühe Endosomen über Einschnürung von Clathrin-umhüllten Vesikeln geschieht. Hierfür wird das Aktin-System rekrutiert. VSV ist mit einer Größe von 180x70 nm relativ groß. Im Gegensatz

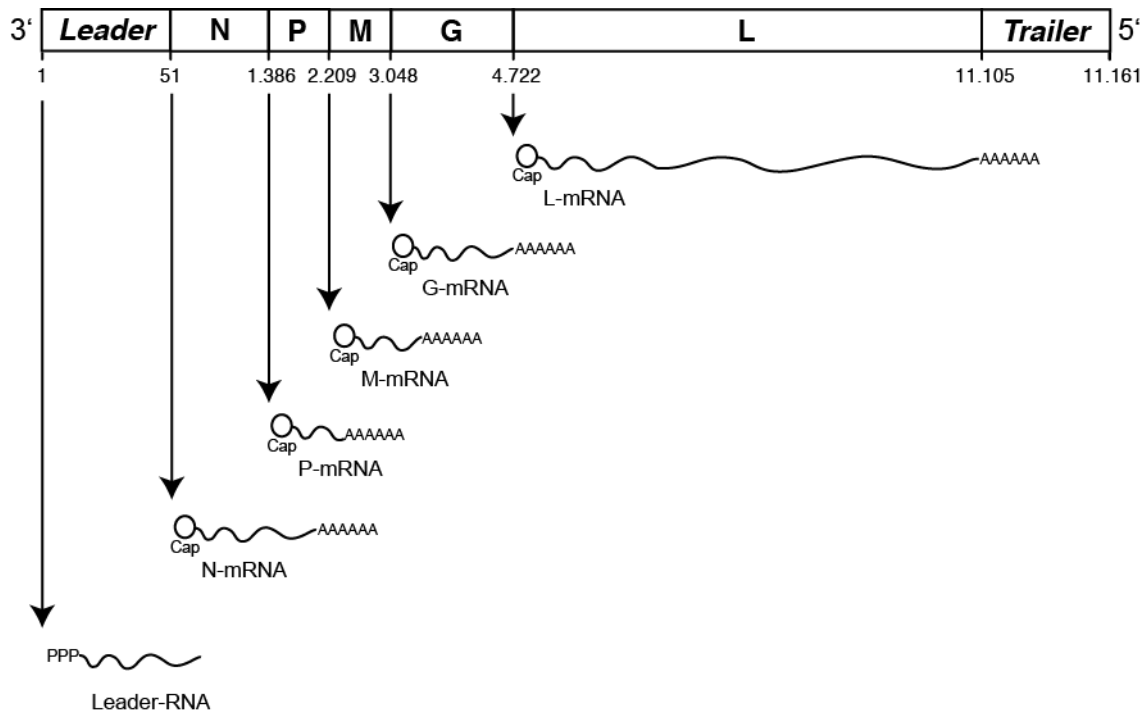
etwa zu den kleineren *Low-density*-Lipoprotein-Partikeln wird VSV deshalb bei der Endozytose nur unvollständig mit Clathrin umhüllt. Die Partikelgröße erklärt auch Unterschiede im Eintrittsmechanismus des Viruspartikels (*Syn. Virion*) in Abhängigkeit davon, ob es ein vollständiges Genom oder nur ein verkürztes Replikationsprodukt, ein sogenanntes *Defective-interfering* (DI)-Genom, enthält (Cureton et al. 2009; Cureton et al. 2010).

Durch eine pH-abhängige Fusion der viralen Membran mit der Vesikelmembran entlässt das Virus sein RNA-Genom in das Zytoplasma. An dieses assoziiert finden sich das Nukleoprotein (N-Protein) und das Phosphoprotein (P-Protein), wobei ein N-Protein immer ca. neun Nukleotide (nt) abdeckt (Thomas et al. 1985; Green et al. 2006). Zudem gelangt mit der Infektion die virale Polymerase in die Zelle, die auch *large protein* (L-Protein) genannt wird. Die Polymerase ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (*engl. RNA-dependent RNA polymerase, RdRp*). Der Komplex aus Proteinen und Genom wird als Ribonukleoprotein (RNP) oder Nukleokapsid bezeichnet. Das Genom, gemäß der Definition der Negativstrang-RNA-Viren, kann nicht als direkte Matrize für die Proteintranslation am Ribosom der Wirtszelle dienen. Die genetische Information muss zunächst in mRNA umgesetzt werden. Im Gegensatz zur üblichen Schreibweise von Nukleinsäuresequenzen wird nach der Konvention die Sequenz eines negativ orientierten Genoms vom 3'- zum 5'-Ende notiert.

### 1.3.2 Transkription

Das Genom von VSV kodiert für fünf Proteine. An seinen Enden liegen zwei nicht für Proteine kodierende Regionen. Das Genom dient als Vorlage für die Transkription der viralen *Messenger-RNAs* (mRNAs), die man wiederum als Positivstrang-RNA bezeichnet. Abbildung 3 zeigt einen Überblick über den Aufbau des Genoms und der primären Transkripte. Der Promotor für den Beginn der Transkription der viralen mRNAs und später des Antigenoms befindet sich im 3'-terminalen Teil des Genoms, der sogenannten *Leader*-Sequenz. Von dieser wird auch das erste entstehende Transkript abgelesen, die *Leader*-RNA (Leppert et al. 1979). Des Weiteren entstehen

*Read-through*-Produkte zwischen der *Leader*-Sequenz und dem darauffolgenden N-Gen (Herman et Lazzarini 1981). Es folgt die Synthese der monocistronischen, das heißt für je ein Protein kodierenden, mRNAs. Diese werden von der Polymerase mit einer 5'-*Cap*-Struktur versehen und an ihrem 3'-Ende polyadenyliert (Abraham et al. 1975).



**Abbildung 3 - Aufbau des VSV-Genoms und Darstellung der primären Transkripte**

Das Genom von VSV ist 11.161 Nukleotide lang. Es kodiert für fünf Gene und zwei nicht Protein-kodierende Abschnitte an den Enden. Diese werden als *leader* und *trailer* bezeichnet. Die Transkription der RNAs erfolgt vom 3'- zum 5'-Ende. Die *Leader*- und die *Trailer*-Region sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Darstellung wurde adaptiert von: [http://education.expasy.org/images/Rhabdoviridae\\_genome.jpg](http://education.expasy.org/images/Rhabdoviridae_genome.jpg)

Die mRNAs kodieren für folgende Proteine und werden in der Reihenfolge ihrer Anordnung im Genom von der viralen Polymerase synthetisiert: Nukleoprotein (N-Protein), Phosphoprotein (P-Protein), Matrixprotein (M-Protein), Glykoprotein (G-Protein), und die auch als *large* Protein (L-Protein) bezeichnete Polymerase (Ball et White 1976). Durch sinkende Effizienz des Abschriebs kommt es zu einer absteigenden Häufigkeitsverteilung der viralen mRNAs:  $N > P > M > G > L$  (Villarreal et al. 1976; Iverson et Rose 1981). Durch fortschreitende Translation akkumuliert das N-Protein. Dies führt zum Wechsel von Transkription zur Replikation (Blumberg et al. 1981).

### 1.3.3 Replikation

Erneut ausgehend vom Promotor im Bereich der *Leader*-Sequenz wird das Antigenom gebildet, welches eine positive Orientierung und eine dichte Verpackung durch das Nukleokapsid aufweist. Mit dem Antigenom entsteht die Vorlage für die Replikation des Genoms. Das Genom wird ausgehend von der *Trailer*-Sequenz am 3'-Ende des Antigenoms synthetisiert. Die neuen Genome werden ebenfalls kontinuierlich in das Nukleokapsid verpackt. Parallel wird die Membran der infizierten Zelle mit G-Protein angereichert. Liegen ausreichend Genome vor, kommt es zur Knospung von VSV. Das M-Protein vermittelt dabei die RNPs an Membranabschnitte mit hoher Dichte an G-Protein. Sowohl genomische, als auch antigenomische RNA gelangt in die Viruspartikel, jedoch keine Transkripte (Gerlier et Lyles 2011).

### 1.3.4 Trailer-RNA

Es ist nicht vollständig geklärt, ob das Antigenom einzig als Vorlage für das Vollängen-Genom dient, oder ob auch kürzere, nackte RNAs vom 3'-Ende des Antigenoms transkribiert werden. Ein Kandidat hierfür wäre die sogenannte *Trailer*-RNA. Sie stellt eine Analogie zur *Leader*-RNA dar, die vom 3'-Ende des Genoms abgelesen wird. Die *Trailer*-RNA trug in den Anfangstagen ihrer Entdeckung noch den Namen *Minusstrang-Leader* (Leppert et al. 1979). Ursprünglich wurde sie als ein Transkript eines DI-Genoms beschrieben (Emerson et al. 1977; Schubert et al. 1978; Rao et Huang 1979).



### 1.3.5 Defective-interfering-Genome

Tabelle 1 Beschriebene DI-Genome von VSV

	Orientierung des nicht komplementären Abschnitts (+/-)	5'-Ende	Länge [nt]	Bruchpunkt in Bezug auf das Volllängen-Genom	Komplementärer Abschnitt	Referenz
<b><i>Internal deletion defective interfering particle</i></b>						
DI-LT <sub>1</sub>	-	PPP	5314	-	-	(Yang et Lazzarini 1983; Meier et al. 1984)
DI-LT <sub>2</sub>						
<b><i>Snapback defective interfering particle</i></b>						
DI 011	w/o	PPP	2334	9995	Vollständig komplementär	(Lazzarini et al. 1975; Marcus et Sekellick 1977; Schubert et al. 1978; Meier et al. 1984)
<b><i>Copy back defective interfering particle</i></b>						
DI-T	-	PPP	2208	8998	45 nt Trailer/Anti-trailer	(Meier et al. 1984; Pattnaik et al. 1992; Pattnaik et al. 1995)
DI-T (L)	-	PPP	3687	7521	48 nt Trailer/Anti-trailer	(Meier et al. 1984)
DI 611	-	PPP	4463	6745	48 nt Trailer/Anti-trailer	(Meier et al. 1984)

Virale Polymerasen von Negativstrang-RNA-Viren sind sehr fehleranfällig. Die daraus resultierende hohe Mutationsrate erlaubt den Viren eine rasche Anpassung an eine Vielzahl von Wirten. Im Fall von VSV und anderen *Mononegavirales* führt diese Fehleranfälligkeit neben *Read-through*-Produkten und Punktmutationen auch zu fehlerhaften Replikationsnebenprodukten. Es handelt sich dabei um verkürzte Varianten des Genoms. Diese werden als DI-Genome bezeichnet.

DI-Genome werden analog zum Volllängen-Genom auch in Virionen verpackt, die man dann als *DI-particle* bezeichnet. Es gibt mindestens fünf Mechanismen die zur Bildung eines DI-Genoms führen können. Die bedeutendsten sind *Internal-deletion*-DI-Genome

und *Copy-back*-DI-Genome. Erstere entstehen, indem die Polymerase während der Synthese einige Nukleotide der Matrize auslässt und es dadurch zu einer Deletion kommt. Bei *Copy-back*-DI-Genomen springt die Polymerase vom als Vorlage verwendeten Matrizen-Strang ab und setzt ihre Synthese auf dem gerade hergestellten Strang fort. Was die Polymerase zu solchen Sprüngen veranlasst, ist nicht geklärt. Alle DI-Genome haben gegenüber einem Volllängen-Genom einen Replikationsvorteil, weil sie kürzer sind und - abgesehen von *Internal-deletion*-DI-Genomen - an beiden Enden den stärkeren, antigenomischen *Trailer*-Promotor tragen. Voraussetzung für die Replikation eines DI-Genoms ist, dass die Wirtszelle zeitgleich mit einem Wildtyp-Virus infiziert wird, da das DI-Genom nicht die vollständige Information für alle für die Replikation notwendigen viralen Proteine enthält. Bei gleichzeitigem Vorhandensein in der Wirtszelle konkurrieren DI-Genome mit den Volllängen-Genomen um die für die Synthese zur Verfügung stehenden Protein- und Nukleinsäurebestandteile. Man spricht auch vom Interferieren, was den zweiten Namensbestandteil „*interfering*“ erklärt.

#### **1.4 Mögliche Liganden der RIG-I-like-Helikasen**

Die Überlegungen, welche RNA-Spezies als mögliche RIG-I-Liganden während einer Infektionen mit Negativ-Strang-RNA-Viren in Frage kommen, sind wesentlich von einem Review von Denis Gerlier und Douglas S. Lyles inspiriert (Gerlier et Lyles 2011). Dieser verdeutlicht, welche RNA-Spezies vom Virus im Laufe der Infektion gebildet werden können. Es ist dabei denkbar, dass RIG-I während der Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche RNAs erkennt. In der Literatur werden zwei wesentliche Eigenschaften eines RIG-I Liganden beschrieben. Erstens das 5'-Triphosphat-Ende (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006) und zweitens die zumindest partielle Doppelsträngigkeit in unmittelbarer Nähe der 5'-Triphosphat-Gruppe (Schlee et al. 2009; Schmidt et al. 2009). Legt man diese Kriterien an, reduziert sich die Zahl der möglichen Kandidaten deutlich. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die von VSV gebildeten RNAs und inwiefern diese die so eben genannte Kriterien erfüllen.

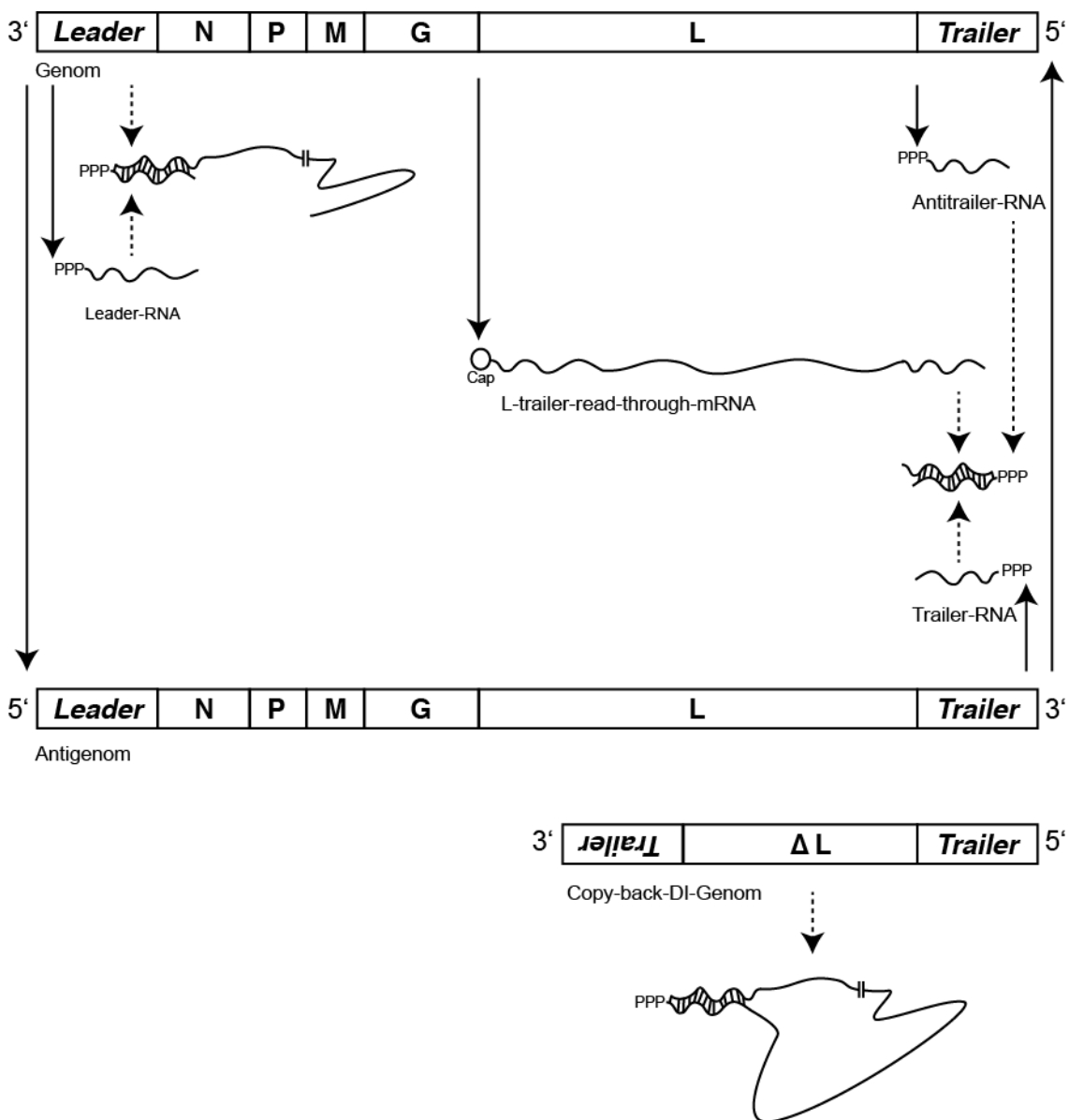
**Tabelle 2 Mögliche RIG-I-Liganden in VSV-infizierten Zellen**

	Orientierung	5'-Ende	Länge [nt]	Referenz
Genom	–	PPP	11.161	NC_001560.1
Antigenom	+	PPP	11.161	NC_001560.1
mRNA: N, P, M, G, L	+	Cap	1326, 814, 696, 1665, 6.380	NC_001560.1
<i>Leader</i> -RNA	+	PPP	46	(Colonna et Banerjee 1976; Colonna et Banerjee 1978)
<i>Leader</i> -N-read through-RNA	+	PPP oder Cap	95 – 170	(Herman et Lazzarini 1981)
<i>Trailer</i> -RNA	–	PPP	46 – 59	(Schubert et al. 1978) (Emerson et al. 1977) (Leppert et al. 1979)
<i>Antitrailer</i> -RNA	+	PPP		Hypothetisch (Gerlier et Lyles 2011)
<i>L-trailer-read through</i> -mRNA	+	Cap	6381 – 6430	Hypothetisch (Gerlier et Lyles 2011)
<i>Trailer-antitrailer</i> -dsRNA	Doppelsträngig (+/-)	PPP	50	Hypothetisch (Gerlier et Lyles 2011)
Leader-Genom-dsRNA	Doppelsträngig (+/-)	PPP	11.161	Hypothetisch
<i>Trailer-L-trailer-read through</i> -mRNA-dsRNA	Doppelsträngig (+/-)	PPP	6381 – 6430	Hypothetisch
<i>Trailer</i> -Antigenom-dsRNA	Doppelsträngig (+/-)	PPP	11.161	Hypothetisch

Die mRNAs von VSV kommen aufgrund ihrer 5'-Cap-Struktur eigentlich nicht als Liganden für RIG-I in Frage. Es wurde lange vermutet, dass Genom, Antigenom und auch DI-Genome aufgrund ihrer dichten Verpackung durch das Nukleokapsid vor der Entdeckung durch RLHs geschützt sind. Jedoch zeigt die jüngste Literatur, dass RIG-I und MDA5 durchaus in der Lage sind, RNA aus einer Proteinverpackung herauszulösen (Yao et al. 2015). Die Verpackung verhindert wohl auch, dass diese RNAs intra- oder intermolekulare Basenpaarungen eingehen können. Eine solche Ansicht taucht jedenfalls häufig in Übersichtsarbeiten auf, ist jedoch experimentell nicht belegt.

Ein möglicher Kandidat für die Erkennung durch RIG-I ist die *Leader*-RNA. Sie ist das erste Transkript während der VSV-Infektion, wird nicht 5'-Cap modifiziert und besitzt eine 5'-Triphosphat-Konfiguration. Die *Leader*-RNA ist zudem nicht polyadenyliert (Colonna et Banerjee 1976; Colonna et Banerjee 1978). Lässt man die Polymerase von VSV die Transkription *in vitro* starten, so ist das *Leader*-Transkript in der Lage, nach Transfektion in 293T-Zellen INF- $\beta$  zu induzieren (Plumet et al. 2007). Die *Leader*-RNA ist eine einzelsträngige RNA, die jedoch mit dem Genom einen intermolekularen 5'-Triphosphat-Doppelstrang bilden könnte.

Eine der *Leader*-RNA verwandte RNA ist die *Trailer*-RNA, die ein negativ orientiertes Transkript vom 3'-Ende des Antigenoms ist (Emerson et al. 1977; Schubert et al. 1978; Leppert et al. 1979). Die *Trailer*-RNA könnte zum Beispiel mit *L-trailer-read-through*-mRNAs oder dem Antigenom einen 5'-Triphosphat-Doppelstrang bilden. Außerdem wäre noch eine sogenannte *Antitrailer*-RNA, ein Transkript der letzten 50 Nukleotide des Genoms, denkbar, die mit der *Trailer*-RNA eine Doppelstrang-Paarung eingehen könnte.



**Abbildung 4** Mögliche RIG-I-Liganden in VSV-infizierten Zellen

Adaptiert nach Gerlier et Lyles 2011; Erläuterungen im Text

Die DI-Genome sind seit Langem als starke Interferon-Induktoren bekannt (Marcus et Sekellick 1977). Sie werden nicht in allen Zellen und nur unter bestimmten Bedingungen gebildet. Wären sie der einzige Ligand, müsste es also Bedingungen geben, in denen VSV keine IFN-Antwort auslöst. Es ist aber auch denkbar, dass DI-Genome aufgrund ihrer hohen Potenz im Auslösen einer IFN-Antwort dazu selbst dann in der Lage sind, wenn sie unter der Nachweis-Grenze bleiben. DI-Genome sind für das dem VSV verwandten Sendai-Virus in einer Publikation als RIG-I Ligand beschrieben worden (Baum et al. 2010).

## 2. Fragestellung

Vorangegangene Experimente innerhalb der Arbeitsgruppe führten zur Hypothese, dass der RIG-I Ligand eine spezifische Sequenz der viralen RNA des *Vesicular-stomatitis*-Virus enthält. Diese Sequenz findet man im Virusgenom in den letzten 59 Nukleotiden des 5'-Endes und trägt den Namen *trailer*. Die *Trailer*-Sequenz kodiert für kein Protein, fungiert aber als Promotor für die Synthese des Genoms. Die Sequenz der *Trailer*-RNA und ihr komplementärer Gegenpart, der positiv orientierte *antitrailer*, finden sich zudem in zahlreichen anderen RNAs des Virus. Die Sequenz des *antitrailer* findet sich im Antigenom, möglicherweise in *L-trailer-read-through*-mRNAs und im hypothetischen *Antitrailer*-Transkript. Die negativ orientierte *Trailer*-Sequenz kommt in verschiedenen DI-Genomen und im Vollängen-Genom vor. Zudem ist beschrieben, dass ein 46 Nukleotide langes *Trailer*-Transkript von einem DI-Genom abgelesen wird (Emerson et al. 1977; Schubert et al. 1978). Auch vom Vollängen-Antigenom kann eine kurze *Trailer*-RNA transkribiert werden (Leppert et al. 1979).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob sich mit anderen Methoden verifizieren lässt, dass RIG-I-Liganden die *Trailer*-Sequenz enthalten und ob der Ursprung der *Trailer*-Sequenz näher eingegrenzt werden kann. Im Vorläuferprojekt wurde als Nachweismethode der RIG-I-gebundenen viralen RNA das auf dem Prinzip des *pyrosequencing* bestehende *next generation sequencing* (NGS) der Fa. 454/Roche verwendet. Nun sollte die virale RNA mit einer Illumina-Sequenzierung nachgewiesen und das Ergebnis mit quantitativer *Real-time*-PCR (qRT-PCR) bestätigt werden. Zudem sollte eruiert werden, ob die in Immunpräzipitationsexperimenten gewonnene RNA immunstimulatorische Eigenschaften aufweist und ob diese Immunstimulation von beschriebenen Faktoren wie einer Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende und partieller Doppelsträngigkeit abhängt.

### 3. Materialien

#### 3.1 Reagenziensätze

miRNeasy Mini Kit	Fa. QIAGEN (Hilden, DE)
OptiEIA Human IP-10 ELISA	Fa. BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
OptiEIA TMB Substrat-Reagenz	Fa. BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
PeqLab RT-PCR Kit	PeqLab (Erlangen, DE)
TruSeq Stranded RNA LT Kit	Fa. Illumina (San Diego, CA, USA)
ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit	Fa. Epicentre (Madison, WI, USA)
Ribo-Zero Magnetic Kit (Human, Mouse, Rat)	Fa. Epicentre (Madison, WI, USA)
RNA-Seq Barcode Primers (Set 1)	Fa. Epicentre (Madison, WI, USA)
MinElute PCR Purification Kit	Fa. QIAGEN (Hilden, DE)
Random Hexamer Primer	Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

#### 3.2 Chemikalien

##### 3.2.1 Chemikalien für den Umgang mit Proteinen

Ammoniumpersulfate (APS)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Anti-FLAG-Antikörper	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Anti-mouse-Antikörper, <i>Horseradish</i> -Peroxidase-(HRP-) <i>linked</i>	Fa. Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-pIRF3-Antikörper	Fa. Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-rabbit-Antikörper, HRP- <i>linked</i>	Fa. Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
Anti-VSV-G-Antikörper	Fa. Kerabast (Boston, MA, USA)
Anti-VSV-N-Antikörper	Fa. Kerabast (Boston, MA, USA)
Anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper, HRP- <i>linked</i>	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
Blotting-Papier	Schleicher & Schuell (Dassel, DE)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Dithiothreitol (DTT)	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Enhanced chemiluminescence detection system (ECL)	Amersham (Little Chalfont, GB)
Ethanol	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Glycin	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Laemmli Sample Buffer	Fa. BioRad (Hercules, USA)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, DE)

Milchpulver	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. SIGMA (Steinheim, DE)
Natriumfluorid (NaF)	Fa. SIGMA (Steinheim, DE)
Nonidet P-40 (NP-40)	Fa. Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Prestained protein molecular weight marker plus	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Protease Inhibitor Cocktail	Fa. SIGMA (Steinheim, DE)
PVDF membrane 0,2 µm	Fa. BioRad (Hercules, CA, USA)
RIPA Lysis Buffer 10x	Fa. Merck (Darmstadt, DE)
Schwefelsäure (1 M)	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
TBS	Fa. SIGMA (Steinheim, DE)
Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Tris Acetat	Fa. SIGMA (Steinheim, DE)
Tris HCl	Fa. SIGMA (Steinheim, DE)
TRIS-Hydrochloride	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
Tween 20	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)
β -Mercaptoethanol	Fa. Roth (Karlsruhe, DE)

### 3.2.2 Zellkultur

Blasticidin	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)
Ciprofloxacin	Fa. Stada (Bad Homburg, DE)
Cycloheximid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Fetal calf serum (FCS)	GibcoBRL (Paisley, GB)
Hygromycin	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)
L-Glutamine	PAA (Linz, A)
Opti-MEM	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA (Linz, A)
Tetracyclin-Hydrochlorid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Trypan Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Zeocin	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)
Trypsin	Roche (Mannheim, DE)

### 3.2.3 Immunpräzipitation

IgG-beads: Mouse IgG-agarose saline suspension	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Preclearing-beads: Sepharose CL-4B	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
FLAG-beads: ANTI-FLAG M2 affinity gel	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
3x FLAG Peptid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
RNase ZAP®	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)



### 3.2.4 Transfektion

Lipofectamine RNAiMax Reagenz	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
-------------------------------	------------------------------------

### 3.2.5 Enzyme

5' Polyphosphatase, inkl 10x Puffer	Fa. Epicentre (Madison, WI, USA)
RNase R	Fa. Epicentre (Madison, WI, USA)
RNase III	Fa. Epicentre (Madison, WI, USA)
Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer	Fa. New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase	Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Ribolock RNase Inhibitor	Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

## 3.3 Puffer und Lösungen

### 3.3.1 Lyse- und Enzympuffer

#### IP-Lysepuffer

20 mM Tris HCl (pH 7.5)  
150 mM NaCl  
0.25% NP-40  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM NaF  
1:100 Protease Inhibitor  
Cocktail  
1:100 Ribolock RNase Inhibitor  
in ddH<sub>2</sub>O

#### RIPA-Puffer

1: 10 10x RIPA Lysepuffer  
in ddH<sub>2</sub>O

#### RNase III 10x Puffer

330 mM Trisacetat pH 7,5  
660 mM Kaliumacetat  
200 mM Magnesiumacetat  
5 mM DTT  
in ddH<sub>2</sub>O

### 3.3.2 Immunpräzipitation

3x FLAG Peptid Stamm-Lösung  
5 mg/µl 3x FLAG Peptid  
in TBS

3x FLAG Peptid Arbeits- Lösung  
2% 3x FLAG Peptid Stamm-  
Lösung  
≅ 100 µg/ml 3x FLAG *Peptid*  
in TBS

Tetracyclin Stamm-Lösung  
200 µg/ml Tetracyclin  
in H<sub>2</sub>O

### 3.3.3 Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISA-Coating-Puffer  
0,1 M Natriumcarbonat in  
ddH<sub>2</sub>O  
pH 9,5  
(7,13 g NaHCO<sub>3</sub>  
1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
in 1 l ddH<sub>2</sub>O)

ELISA-Waschpuffer  
0,05 Vol % Tween 20  
in PBS

ELISA-Verdünnungslösung  
10 % FCS  
0,05 % NaN<sub>3</sub>  
in PBS

ELISA-Detektions-Puffer  
1:1000 *Capture*-Antikörper  
(aus OptiEIA Human IP-10  
ELISA)  
1:250 Enzym-Reagenz (aus  
OptiEIA Human IP-10 ELISA)  
in Verdünnungslösung

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Stacking-Puffer  
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10%  
SDS

Trenn-Puffer  
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 10%  
SDS

SDS-Page Lauf-Puffer  
25 mM Tris  
200 mM Glycin  
0,1 % SDS  
in ddH<sub>2</sub>O

5 % Stacking-Gel  
2,26 ml H<sub>2</sub>O,  
1 ml *Stacking*-Puffer,  
0,68 ml µl 30% Acrylamid,  
40 µl 10% APS,  
4 µl TEMED

10 % Trenn-Gel  
4,1 ml H<sub>2</sub>O,  
2,5 ml *Trenn*-Puffer,  
3,3 ml 30% Acrylamid,  
100 µl 10% APS,  
4 µl TEMED

2x Laemmli-Puffer  
95 % Laemmli Proben-Puffer  
5 % β-Mercaptoethanol

### 3.3.5 Western blot

Transfer-Puffer

25 mM Tris  
190 mM Glycin  
20 % Methanol  
in ddH<sub>2</sub>O

0,1 % TBS-Tween

10 mM Tris/base pH 7.5  
0.1 M NaCl  
100 mM Glycin  
1 mM EDTA  
0.1 Vol % Tween 20  
in ddH<sub>2</sub>O

Blocking-Lösung

5 % Milchpulver in TBS-Tween

Puffer für Primär-Antikörper

5% BSA  
0,05 % NaN<sub>3</sub>  
in TBS-T

Puffer für Sekundär-Antikörper

5% BSA  
in TBS-T

### 3.3.6 Medium für die Zellkultur

DMEM-Vollmedium

10 µg/ml Ciprofloxacin  
1,5 mM L-Glutamin  
10 Vol % FCS  
in DMEM-Medium

Medium für HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen

10 µg/ml Ciprofloxacin  
100 µg/ml Hygromycin  
15 µg/ml Blastidin  
1,5 mM L-Glutamin  
10 Vol % FCS  
in DMEM-Medium

Medium für HEK-293 Flp-In™-Zellen

10 µg/ml Ciprofloxacin  
100 µg/ml Zeocin  
15 µg/ml Blastidin  
1,5 mM L-Glutamin  
10 Vol % FCS  
in DMEM-Medium

### 3.4 Verbrauchsmittel

96 Well Polystyrene High Bind Microplate	Fa. Corning (Tewksbury, MA, USA)
Aeroject Filter Tips 10 µl	Fa. Ratiolab (Dreieich, DE)
Aeroject Filter Tips 100 µl	Fa. Ratiolab (Dreieich, DE)
Aeroject Filter Tips 1000 µl	Fa. Ratiolab (Dreieich, DE)
Aeroject Filter Tips 20 µl	Fa. Ratiolab (Dreieich, DE)
Aeroject Filter Tips 200 µl	Fa. Ratiolab (Dreieich, DE)
Micro Bio-Spin chromatography columns	Fa. BIO-RAD (München, DE)

### 3.5 Geräte

Alpha Imager HP	Fa. Alpha Innotech (San Leandro, CA, USA)
Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, DE)
Eismaschine	Fa. Manitowoc ICE (Manitowoc, WI, USA)
Entwickler Curix 60	Fa. AGFA (Köln, DE)
FluoroMax-P Fluorimeter	Fa. Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, DE)
Lamin Air Flow (HB 2448)	Fa. Heraeus (Hanau, DE)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)
Mikroskop	Fa. Zeiss (Jena, DE)
Multiplate Reader Mithras LB 940	Fa. Berthold Technologies (Bad Wildbach, DE)
NanoPhotometer	Fa. Implen (München, DE)
pH-Meter SB70P symphony	Fa. VWR (Darmstadt, DE)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, DE)
Thermocycler T3	Fa. Biometra (Göttingen, DE)
Trans-Blot Cell	Fa. Biorad (München, DE)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, DE)
Waage LP 6209	Fa. Sartorius (Göttingen, DE)
Waage SBC 21	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, DE)
Zentrifuge 5415 R	Fa. Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (Hanau, DE)
LightCycler 480	Fa. Roche (Mannheim, DE)
Illumina Genome Analyzer	Fa. Illumina (San Diego, CA, USA)
Dual Gel Caster	Fa. Hoefer (Holliston, MA, USA)
Bioanalyzer 2100	Fa. Agilent (Santa Clara, CA, USA)

### 3.6 Software

Adobe Photoshop CS5.1	Fa. Adobe (San Jose, CA, USA)
Adobe Illustrator CS5.1	Fa. Adobe (San Jose, CA, USA)
CLC Genomics Workbench 5.5.1 Trial Version	Fa. CLC Bio (Aarhus, DK)
EndNote X7	Fa. Thomson Reuters (New York City, NY, USA)
Lasergene Seq Builder	Fa. DNASTAR (Madison, WI, USA)
Microsoft Office 2011 for Mac	Fa. Microsoft (Redmond, WA, USA)
Prism 5.0b	Fa. Graphpad Software (La Jolla, CA, USA)

## 4. Methoden

### 4.1 Zellkultur

HEK-293 Flp-In<sup>TM</sup> Zellen wurden von der Fa. Invitrogen erworben. HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden im Rahmen des Promotionsprojekts von Dominik Höchter mittels pcDNA5-Vektor aus HEK-293 Flp-In<sup>TM</sup> Zellen generiert. Die Zellen exprimieren rekombinantes RIG-I mit aminoterminalen FLAG-*tag* unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors. Das rekombinante RIG-I ist funktionell aktiv. HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden in Hygromycin- und Blasticidin-haltigem DMEM-Vollmedium kultiviert. HEK-293 Flp-In<sup>TM</sup> Zellen ohne FLAG-RIG-I-Konstrukt wurden in Blasticidin- und Zeocin-haltigem DMEM-Vollmedium kultiviert. 1205LU-Melanomzellen stammten von Dr. Robert Besch (LMU München). 1205LU-Melanomzellen wurden in DMEM-Vollmedium kultiviert. Zellen wurden bei ca. 80 % Konfluenz unter dem Mikroskop gesplittet.

#### 4.1.1 Tetrazyklininduktion des FLAG-RIG-I-Promotors

Der RIG-I Promotor in den HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurde 24 h vor der Infektion mit 1 µg/ml Tetrazyklin induziert.

#### 4.1.2 Virusinfektion und Lyse

Zellen wurden mit *Vesicular-stomatitis-Indiana-Virus* infiziert. Die *multiplicity of infection* (MOI) für alle in dieser Arbeit aufgeführten Experimente betrug 1. Das Virus stammt von Prof. Anne Krug (LMU München). Für die

Immunpräzipitationsexperimente wurden pro Bedingung 4 Flaschen (175 cm<sup>2</sup> flask) zu je 10 Millionen Zellen ausplattiert. Für die Experimente zur Kinetik der Virusinfektion wurden 1 Millionen Zellen in 200 x 10 mm Schalen ausplattiert. Die Virusinfektion wurde in Optimem-Medium durchgeführt, das bis zur Lyse auf den Zellen belassen wurde. Für die Lyse wurden die Zellen nach der gewünschten Infektionszeit durch Abklopfen vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Die meisten der Zellen in den Virus-infizierten Bedingungen waren abhängig vom Zeitpunkt der Infektion schon vom Boden der Flasche gelöst. Es folgten vier Waschschrte bestehend aus Zentrifugation und Resuspension der Zellen in 40 ml 4° C kaltem PBS. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in den 50 ml Falcon Tubes lysiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. In den Immunpräzipitationsexperimenten wurde mit 1 ml IP-Lysepuffer lysiert. In den Experimenten zur Kinetik der Virusinfektion mit 100 µl IP-Lysepuffer. Die lysierten Zellen wurden durch fünfmaliges Aufziehen in eine Spritze mit einer 20G Kanüle weiter aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation bei 16.000 g für 15 Minuten bei 4° C. Der Überstand wurde in eine neues Eppendorfgefäß überführt und über Nacht bei -80° C weggefroren. Für die Analyse nukleärer Proteine wurde das abzentrifugierte Pellet zweimal in IP-Lysepuffer gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer aufgeschlossen.

#### **4.1.3 Cycloheximid-Behandlung von Zellen**

Für die Inhibition der Proteinbiosynthese in Virus-infizierten HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurde eine halbe Stunde vor Virusinfektion das DMEM-Vollmedium gegen Optimem mit 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) getauscht. Auch das zur Infektion verwendete Virus-haltige Optimem wurde mit 100 µg/ml CHX versetzt und bis zur Lyse auf den Zellen belassen.

## 4.2 Immunpräzipitation von RIG-I-RNA-Komplexen in FLAG-RIG-I-exprimierenden Zellen

Die Methode der Immunpräzipitation von RIG-I-RNA-Komplexen wurde im Detail in einer Veröffentlichung dargestellt (Schmidt et al. 2014). Zur Vorbereitung der Immunpräzipitation wurden die *beads* je zweimal in 1 ml IP-Lysepuffer gewaschen. Um die Menge unspezifischer Bindung zu reduzieren, erfolgte zunächst ein sogenannter *Preclearing*-Schritt. Hierbei wurden die Lysate mit Sepharose-*beads* inkubiert, an die kein Antikörper gekoppelt ist. Die *Preclearing-beads* wurden zur Vorbereitung zweimal in IP-Lysepuffer gewaschen. Dann wurden die Lysate für eine Stunde bei 4° C rollend mit den *Preclearing-beads* inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Lysate für 2 Stunden mit den zuvor ebenfalls zweimal in IP-Lysepuffer gewaschenen FLAG-*beads* inkubiert. Daraufhin wurden RNA- und *Western-blot*-Proben aus dem Überstand (*supernatant*, SN) entnommen und die *beads* fünfmal in je 1 ml IP-Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die *beads* in 500 µl IP-Lysepuffer auf eine Säule übertragen, die in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen steckten. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 1000 g für 30 Sekunden und 4° C. Nun wurden die Säulen erneut in neue 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt. Auf die *beads* in den Säulen wurde 10 µl 3x FLAG-Peptid und 2 µl Ribolock hinzugegeben. Die Säulen wurden in den Eppendorf-Gefäßen steckend für 10 Minuten bei 200 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Nach hinzufügen von 100 µl TBS und 5 µl Ribolock wurden die Proben erneut für 10 Minuten bei 200 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Zum Abschluss der Elution wurden die Säulen bei 4000 g bei 4° C für 3 Minuten zentrifugiert. Das Eluat wurde entweder zunächst bei -80° C eingefroren oder direkt für die RNA-Isolation verwendet.

In den Immunpräzipitationsexperimenten kamen verschiedene Negativkontrollen zum Einsatz. Diese unterschieden sich von der experimentellen Bedingung entweder in Bezug auf den zur IP verwendeten *bead*, die eingesetzte Zelllinie, die Tetrazyklin-Induktion oder die Infektion der Zellen. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die einzelnen Bedingungen.

**Tabelle 3 Bedingungen der Immunpräzipitation**

Bedingung	Zelllinie	Virusinfektion	Tetrazyklin	Bead
FLAG-RIG-I	HEK-293 FLAG-RIG-I	VSV, MOI = 1	1µg/ml	α-FLAG
IgG	HEK-293 FLAG-RIG-I	VSV, MOI = 1	1µg/ml	α-IgG
Flp-In <sup>TM</sup>	HEK-293 Flp-In <sup>TM</sup>	VSV, MOI = 1	1µg/ml	α-FLAG
FLAG-RIG-I, nicht induziert	HEK-293 FLAG-RIG-I	VSV, MOI = 1	-	α-FLAG
FLAG-RIG-I, nicht infiziert	HEK-293 FLAG-RIG-I	-	1µg/ml	α-FLAG

### 4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western blot

Um die Effizienz der Immunpräzipitation zu kontrollieren, in Experimenten zur Kinetik der Virusreplikation, sowie zur Überprüfung der Wirkung von CHX wurden *Western blots* durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden die Proben 1:1 in 2x Laemmli-Puffer verdünnt und 5 Minuten bei 95° C gekocht. Im Fall eines IP-Experiments wurden jeweils 0,75% des Inputs, des SN und des Eluats auf ein 10%-Tris-Glycin-Acrylamid Gel aufgetragen. In allen anderen Experimenten wurden Zellysate gleichen Volumens eingesetzt. Die Proteine wurden für eine Stunde bei einer konstanten Spannung von 100 Volt unter denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt.

Der Transfer erfolgte mit der sogenannten *Wet-transfer*-Methode für eine Stunde bei einer Stromstärke von 360 mA. Hierbei wurden die Proteine in einer mit *Wet-transfer*-Puffer gefüllten Kammer (Trans-Blot Cell, Fa. Biorad) mittels einer horizontal angelegten Spannung aus dem Gel auf eine PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm übertragen, die zuvor in Methanol aktiviert worden war.

Die Membran wurde für eine Stunde in 5% Milch in TBS-T geblockt. Bei anschließender Färbung auf phosphoryliertes IRF3 (pIRF3) wurde die Membran mit 5% bovinem Serum-Albumin (BSA) in TBS-T geblockt. Daraufhin wurde die Membran für



mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C mit murinem Anti-FLAG-Antikörper (1:1000), murinem Anti-VSV-G-Antikörper (1:1000), Anti-VSV-N-Antikörper (1:500) oder Anti-β-Aktin-Antikörper (1:2000) in 5% BSA in TBS-T unter kontinuierlichem Rollen inkubiert. Für alle Membranen - außer für die mit Anti-β-Aktin-Antikörper inkubierten - folgte die Inkubation mit dem Anti-*mouse*-Sekundärantikörper in 5% Milch in TBS-T für eine Stunde bei 4° C. Für pIRF3 erfolgte die Inkubation der Membran mit dem des Anti-*mouse*-Sekundärantikörper in 5% BSA in TBS-T. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten und nach dem letzten Arbeitsschritt wurde die Membran dreimal für 5 Minuten unter ständigem Schütteln in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Umwandlung des Substrats durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte *Horseradish*-Peroxidase (HRP) mit 1 ml einer 1:1 Mischung des Substrats in Gang gesetzt und mittels LAS Imager (Fa. Fujifilm) detektiert.

#### **4.4 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des miRNeasy Kit der Fa. QIAGEN, das auf dem Prinzip einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Säulenaufreinigung beruht. Auf 100 µl Lysat wurden 750 µl QIAzol Lysis Reagenz aus dem Kit gegeben. Um das Gemisch zu homogenisieren, wurde es zehnmal auf- und abpipettiert. Die restliche Aufreinigung erfolgte gemäß der Anleitung der Firma. Im letzten Schritt wurde die RNA in 50 µl Wasser von der Säule eluiert. RNA wurde bei -80° C gelagert.

## 4.5 Reverse Transkription

Um RNA mittels quantitativer *Real-time*-PCR (qRT-PCR) charakterisieren zu können, ist zunächst ein Umschrieb der RNA in *copy*DNA (cDNA) nötig. Hierfür wurde für jede Probe folgender Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet:

1 mM H-Reverse Transkriptase, 1 mM dNTPs, 5 µM Random Hexamer Primer, 100 nM *Leader*-RT-Primer, 20 u Ribolock RNase Inhibitor, 50 ng RNA, H<sub>2</sub>O, 5 µl Reaction Buffer

Der Ansatz wurde folgendem Protokoll in einem Thermocycler unterworfen:

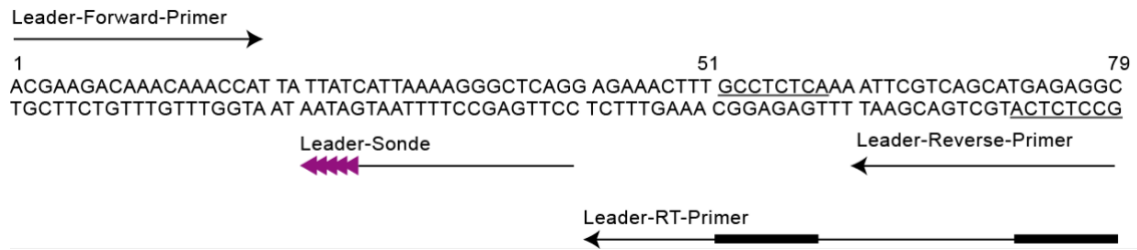
42° C für 60 Minuten

70° C für 10 Minuten

Herabkühlen des Ansatzes auf 4° C

Der für den Umschrieb verwendete Random Hexamer Primer besteht aus einem zufälligen Gemisch kurzer DNA-Primer, die den Umschrieb aller im Ansatz vorhandenen RNAs gewährleisten soll.

Für die *Leader*-RNA von VSV ließ sich aufgrund ihrer geringen Größe kein konventioneller qRT-PCR-Assay designen. Deshalb wurde zusammen mit der Fa. TIB MOLBIOL ein spezieller Assay entworfen. Dem Umschrieb wurde ein spezieller *Stem-loop*-Primer hinzugefügt, der komplementär zum 3'-Ende der *Leader*-RNA ist. Dieser wurde als *Leader*-RT-Primer bezeichnet. Die *Leader*-RNA ist 51 Nukleotide lang. Der *Leader*-RT-Primer verlängert die *Leader*-cDNA um 29 Nukleotide, so dass das Transkript eine Länge von 79 Nukleotiden hat und damit lang genug für einen qRT-PCR-Assay ist. Um die Hybridisierungseigenschaften der Sonde zu verbessern, wurden fünf Nukleotide durch *locked nucleic acid* (LNA)-Moleküle ersetzt. Tabelle 4 und Abbildung 5 geben einen Überblick über die Bestandteile und die Funktionsweise des *Leader*-Assays.



**Abbildung 5 – Schematische Darstellung des Leader-Assays**

Schematische Darstellung des Leader-Assays. Dargestellt ist die Sequenz des Amplifikats, wie es während der qRT-PCR amplifiziert wird. Die Pfeile repräsentieren die Primer und die Sonde. Komplementäre Abschnitte sind in der Sequenz unterstrichen und bei den Pfeilen fett dargestellt. LNA-Basen sind violett dargestellt. Die Abbildung wurde adaptiert nach einem Entwurf der Fa. TIB MOLBIOL.

**Tabelle 4 – Bestandteile des cDNA- und qRT-PCR-Assay für den Nachweis der Leader-RNA**

Komplementäre Abschnitte sind unterstrichen. LNA-Basen sind violett hinterlegt.

Name	Sequenz	Orientierung	Abgedeckte Nukleotide	Schmelztemperatur
Forward Primer	ACGAAGACAAACAAACCAT	<i>Sense</i>	1- 19	50,2° C
Reverse Primer	GCCTCTCATGCTGACGAAT	<i>Anti-sense</i>	48 - 30	54,6° C
Leader-RT Primer	<u>GCCTCTCA</u> TGCTGACGAATTT <u>TGAGAGGC</u> AAAGTTTC	<i>Anti-sense</i>	79 -43	L: 84° C
Leader-Sonde	FAM- CCTGAGCTTTTAA <u>TGATAA</u> - BBQ	<i>Anti-sense</i>	41 -22	66° C <sup>LNA</sup>

#### 4.6 Quantitative *Real-time*-PCR

Die in cDNA umgeschriebene RNA wurde mittels quantitativer *Real-time*-PCR (qRT-PCR) quantifiziert. Für jedes der Gene von VSV, für die *Leader*-RNA, die *Trailer*-RNA

und die Übergangsbereiche *Leader-N* und *L-trailer* stehen folgende Assays zur Verfügung: ein spezifisches Primerpaar, bestehend aus *Forward*- und *Reverse*-Primer, und eine spezifische Sonde, die an das zu amplifizierende cDNA-Molekül binden. Für das L-Gen von VSV wurden aufgrund seiner Größe zwei unterschiedliche Assays verwendet. Die Auswahl der Sonden und das Primer-Design erfolgte mit dem Webtool *Universal ProbeLibrary (UPL) Assay Design Center* der Fa. Roche (<http://qpcr.probefinder.com>). Als Referenzgen diente das humane *Housekeeping*-Gen HPRT. In der qRT-PCR wird die cDNA wie in einer klassischen PCR in 45 Zyklen hochamplifiziert. Die eingesetzte Taq-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität und löst die Sonde von der cDNA. Dadurch entsteht ein Fluoreszenz-Signal. In jedem Zyklus wird die optische Aktivität der Sonde gemessen. Die Fluoreszenz ist direkt abhängig von der Menge amplifizierter DNA-Moleküle. Der Zeitpunkt, in dem die Fluoreszenz der Sonde, die des Hintergrundes überschreitet, wird als *crossingpoint* (Cp) bezeichnet. Je mehr cDNA der spezifischen Sequenz in dem ursprünglichen Ansatz enthalten ist, desto früher wird dieser Zeitpunkt erreicht. Er kann somit als indirektes Maß für die Menge der detektierten cDNA dienen. Um vom Cp-Wert auf die relative Menge der cDNA schließen zu können, ist zudem der Vergleich mit einem Referenzgen, das ebenfalls in allen Proben als cDNA vorliegen muss, nötig. Aus dem Verhältnis der Cp-Werte des sog. *Target*-Gen zum Referenzgen kann auf die relative Häufigkeit des *Target*-Gens geschlossen werden. Die Einheit wird als Kopien/HPRT angegeben.

Für jede Probe wurde folgender Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet:

5 µl Roche Mastermix, 9 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl cDNA (zuvor 1:3 in H<sub>2</sub>O verdünnt), 0,2 µM *Forward*-Primer, 0,2 µM *Reverse*-Primer, 0,1 µM Sonde

Die qRT-PCR wurde mit folgenden Einstellungen in einem LightCycler 480 der Fa. Roche auf einer 96-*well* Platte durchgeführt:

Präinkubation: 95° C für 10 Minuten

Amplifikation (45 Zyklen): 95° C für 10 Sekunden  
54° C für 30 Sekunden

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die unterschiedliche Effizienz der qRT-PCR-Assays berücksichtigt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe aus

Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen erstellt. Die Verdünnungsreihe bestand aus unverdünnter cDNA und vier 1:10 Verdünnungsschritten. Die Verdünnungsreihe wurde in Triplikaten mit jedem in Tabelle 5 gelisteten Assay gemessen und für eine automatisierte Auswertung in der Software des LightCycler 480 hinterlegt. Für den Assay, der humanes IFN- $\beta$  misst, wurde darauf verzichtet, da für diesen Assay der Vergleich der Häufigkeit in Relation zu den viralen RNAs irrelevant war und nur die Änderungen innerhalb des Assays von Interesse waren.

**Tabelle 5 qRT-PCR Assays**

Name	Forward-Primer	Reverse-Primer	Sonde	Sondensequenz	Position der Amplifikate im VSV Genom (von 3' nach 5')
Humanes HPRT	TGACCTTGAT TTATTTTGCA TACC	CGAGCAAGAC GTTTCAGTCCT	Roche UPL #73	unbekannt	-
Humanes IFN- $\beta$	CGACACTGTT CGTGTTGTCA	GAGGCACAAC AGGAGAGCA A	Roche UPL #25	unbekannt	-
Leader	ACGAAGACA AACAAACCAT	GCCTTCTCATG CTGACGAAT	TIB MOLBIOL Leader	CCTGAGCCTT TTAATGATAA	1 - 50
Leader-N	CGAAGACAA ACAAACCATT ATTATCA	GTTGTCAATG ATTCTCTTGA CTGTAAC	Roche UPL #2	unbekannt	1 – 96
N	CGAAGACAA ACAAACCATT ATTATCA	TCTGCAACTT CTCGTTCAA	Roche UPL #85	unbekannt	766 - 830
P	GCAGAGTGCA CATTGGAAGC	AGTTATCTGG CGCTCCTTCA T	Roche UPL #7	unbekannt	1858 - 1917
M	GCGAAGGCA GGGCTTATT	GCTCTGGTAC ATTGAGCATG G	Roche UPL #60	unbekannt	2653 - 2718
G	TGGTTTCGAGA TGGCTGATAA	ACTTGACCCT TCTGGGCATT	Roche UPL #71	unbekannt	3831 - 3899
L1	CCTTTAGAAG GGAATTGGAA GAA	TCTGCCGACT TGATAGGATT G	Roche UPL #62	unbekannt	8765 - 8824
L2	CCAGCAATCA TTCCCGATTA	CCACTTCTGC TTGTATCCTC CT	Roche UPL #75	unbekannt	10708 - 10771
L-trailer	CATGAGGAGA CTCCAAAC	GACGAAGACC ACAAAACC	TIB MOLBIOL Trailer	TCTTGTGGTT TTTATTTTTTA TCTGG	11068 - 11161
Trailer	GGCTTTGATC CTTAAGACC	GACGAAGACC ACAAAACC	TIB MOLBIOL Trailer	TCTTGTGGTT TTTATTTTTTA TCTGG	11103 - 11161

## 4.7 RNA-Sequenzierung mittels *next generation sequencing*

### 4.7.1 Erstellen einer cDNA-library

Die Gesamt-RNA aus Virus-infizierten Zellen bzw. RIG-I-assoziierte RNA wurde entweder mit dem ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit der Fa. Epicentre gemäß den Herstellerangaben vorbereitet oder die Proben wurden von Charlotte Lässig in der Arbeitsgruppe Hopfner am Genzentrum der LMU mit dem TruSeq Stranded RNA LT Kit der Fa. Illumina gemäß dem Herstellerprotokoll vorbereitet.

Für die Erstellung einer cDNA-Bibliothek mit dem ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit sind folgende Schritte notwendig: Zunächst wird die ribosomale RNA (rRNA) aus der Probe entfernt, die den größten Anteil zellulärer RNA ausmacht. Sie würde mit der Sequenzierung anderer RNAs interferieren. In einem nächsten Schritt wird die RNA zerkleinert. Es folgt der Umschrieb in einzelsträngige cDNA durch reverse Transkription (RT). Hierfür wird ein Gemisch aus Primern verwendet, die zum Teil aus einem zufälligen, hexameren Sequenzmuster und zum anderen Teil aus einer *Tag*-Sequenz bestehen. Diese *Tag*-Sequenz, die am 5'-Ende der cDNA eingeführt wird, ist notwendig, um in einem späteren PCR-Schritt alle cDNAs gleichmäßig und mit den gleichen Primern amplifizieren zu können. Danach wird auch am 3'-Ende eine *Tag*-Sequenz hinzugefügt. Dies erfolgt mithilfe eines am 3'-Ende blockierten Terminal Tagging Oligonukleotid. Dieser Primer bindet mittels einer hexameren Sequenz so an die cDNA, dass ein 5'-Überhang entsteht. Dort ist die Sequenz für den einzuführenden *tag* enthalten. Die Polymerase verlängert den cDNA-Einzelstrang, den 5'-Überhang des Primers als *template* nutzend, am 3'-Ende. Das 3'-Ende des Primers ist hingegen blockiert. Dies verhindert, dass die einzelsträngige cDNA zum Doppelstrang vervollständigt wird. Die cDNA wird nun über ein Säulen-basiertes Kit aufgereinigt und in eine PCR eingesetzt. Die in der PCR verwendeten Primer sind komplementär zu den eingeführten *tags* am 5'- und 3'-Ende der cDNA. Der *Forward*-Primer ist für alle Bedingungen gleich und führt eine zusätzliche Adapter-Sequenz ein. Mithilfe des *Reverse*-Primers wird neben einer Adapter-Sequenz eine für jede Bedingung unterschiedliche Index-Sequenz eingeführt. Die Adapter-Sequenzen sind komplementär zu den später für die Sequenzierung verwendeten Primern. Die Index-Sequenzen

ermöglichen das Sequenzieren der PCR-Produkte aller Bedingungen in einem gemeinsamen Ansatz. Bei der Analyse der Sequenzierergebnisse kann durch die sechs Nukleotide langen Index-Sequenzen jeder *read* einer bestimmten Bedingung zugeordnet werden.

Im Folgenden wird die Probenvorbereitung mit dem ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit im Detail beschrieben.

#### **4.7.1.1 rRNA-Depletion**

In einem ersten Schritt wurden gemäß der Anleitung des Kits die RNA-Proben von der rRNA depletiert. Der Teil des Reagenziensatzes heißt *Quick Protocol for Ribo-Zero™ Kit*. Pro Bedingung wurde 1 µg RNA eingesetzt. Für die IgG-Bedingung wurde die maximale Menge in 16 µl eingesetzt. Dies entsprach etwa 200 ng RNA.

Nach der Depletion der rRNA ist eine Aufreinigung der restlichen RNA nötig. Hierfür wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dafür wurde folgender Ansatz verwendet:

53 µl RNA, 117 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl LithiumChlorid (10 M), 2µl Glykogen (10 ng/µl, im Kit enthalten), 18 µl NaAcetat, 600 µl Ethanol

Der Ansatz wurde bei -20° C über Nacht, und die letzte Stunde vor Weiterverarbeitung bei -80° C weggefroren. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 g über 30 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde daraufhin in 10 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **4.7.1.2 RNA-Fragmentierung**

Von den 10 µl an gefällter, rRNA-freier Probe, wurden 5 µl in die weitere Verarbeitung mit dem *ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit* eingesetzt. Für die

Fragmentierung der RNA wurde folgender Ansatz verwendet.

4  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser, 5  $\mu$ l rRNA-freie RNA, 1  $\mu$ l RNA *fragmentation solution* und 2  $\mu$ l cDNA Synthese-Primer

Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 85° C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf 4° C gekühlt.

#### **4.7.1.3 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Zunächst wurde der cDNA Synthesis Master Mix vorbereitet:

3  $\mu$ l cDNA Synthesis PreMix, 0.5  $\mu$ l DTT (100 mM), 0,5  $\mu$ l StarScript Reverse Transcriptase.

Die 4  $\mu$ l des cDNA Synthesis Master Mix wurden zu den 12  $\mu$ l aus dem Ansatz der RNA-Fragmentierung hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation mit folgenden Einstellungen:

25° C für 5 Minuten

42° C für 20 Minuten

Herabkühlen des Ansatzes auf 37° C

Daraufhin wurden 1  $\mu$ l Finishing Solution hinzugegeben und der Ansatz durch Pipettieren gemischt. Es erfolgte eine Inkubation mit folgenden Einstellungen:

37° C für 10 Minuten

95° C für 3 Minuten

Herabkühlen des Ansatzes auf 25° C



#### **4.7.1.4 Einführung der Tag-Sequenzen**

Die Einführung der *Tag*-Sequenzen erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Zunächst wurde der *terminal tagging master mix* vorbereitet:

7,5 µl Terminal Tagging Premix, 0,5 µl DNA Polymerase

Die 8 µl des *terminal tagging master mix* wurden zu den 16 µl aus dem Ansatz der cDNA-Synthese hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation im Thermocycler mit folgenden Einstellungen:

25 ° C für 15 Minuten

95° C für 3 Minuten

Herabkühlen des Ansatzes auf 4 ° C

#### **4.7.1.5 Aufreinigung der di-tagged cDNA**

Die am 5'- und am 3'-Ende mit einem *tag* versehene cDNA (*di-tagged cDNA*) wurde mit dem MinElute PCR Purification Kit der Fa. QIAGEN gemäß der Herstellerangaben aufgereinigt. Die einzige Abweichung vom Herstellerprotokoll bestand darin, im letzten Schritt des Protokolls anstatt von 10 µl EB Puffer zur Elution der cDNA von der Säule 25 µl zu verwenden. Nach Zentrifugation fanden sich ca. 22,5 µl Eluat im Eppendorf-Gefäß.

#### **4.7.1.6 PCR und Einführung der Index-Sequenzen**

Für die PCR wurde in einem 200 µl-PCR-Gefäß folgender Ansatz verwendet:

22 µl *di-tagged cDNA*, 1 µl dNTPs, 16,5 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Phusion Buffer, 1 µl Forward PCR Primer, 1 µl Reverse Index Primer, 0,5 µl Phusion

Die *di-tagged* cDNA wurde dann unter folgenden Bedingungen in einer PCR im Thermocycler amplifiziert:

98° C für 30 Sekunden  
Dann 16 Zyklen:  
98° C für 10 Sekunden  
55° C für 30 Sekunden  
72° C für 3 Minuten

Danach wurde der PCR-Ansatz für 7 Minuten bei 72° C inkubiert. Daraufhin wurde die PCR bei 4° C pausiert. Die amplifizierte cDNA wurde bei – 20 ° C eingefroren.

#### **4.7.2 Next generation sequencing**

Folgende Analysen wurden durch die Arbeitsgruppe Blum und die Arbeitsgruppe Hopfner am Genzentrum der LMU durchgeführt.

Die Qualität der cDNA-Bibliothek wurde mit einem DNA1500 Chip für den Bioanalyzer 2100 der Fa. Agilent überprüft. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina Genome Analyzer in einer gemeinsamen *lane* der Durchflusszelle (*flow cell*). Bei den in dieser Arbeit vorgenommenen Analysen wurden einmal 80 und einmal 100 Nukleotide sequenziert. Bei geringer Qualität der cDNA-Bibliothek wurde die Bibliothek durch eine zusätzliche PCR vor der Sequenzierung amplifiziert.

Die Adapter-Sequenzen und Sequenzen mit einem PHRED-Score kleiner 30 wurden mit dem FASTX toolkit ([http://hannolab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannolab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) entfernt.

#### **4.7.3 Analyse der Next-generation-sequencing-Ergebnisse**

Als Ergebnis der Sequenzierung erhält man eine Liste sogenannter *reads*. Diese Sequenzen haben je nach den bei der Sequenzierung angewendeten Parametern eine

definierte Länge (80 oder 100 Nukleotide). Um verschiedene Bedingungen gleichzeitig analysieren zu können, wurde bei der Erstellung einer cDNA-Bibliothek aus den RNAs eine sogenannte Index-Sequenz eingeführt, die mitsequenziert wird und die es erlaubt, jeden einzelnen *read* seiner ursprünglichen Bedingung zuzuordnen.

Mithilfe einer Software lassen sich die Sequenzen mit einer Referenzsequenz abgleichen. Für jeden *read* untersucht die Software, an welcher Position der Referenzsequenz die gleiche oder eine revers-komplementäre Sequenz auftaucht. Als Referenzsequenz diente im vorliegenden Projekt die sogenannte *copyRNA* (cRNA) des Genoms des VSV, Serotyp Indiana (>gi|335873|gb|J02428.1|VSVCG *Vesicular-stomatitis-Indiana-Virus, complete genome*) aus der PubMed-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information*. Für jede Position der Referenzsequenz, das heißt für jedes Nukleotid, ermittelt die Software eine Zahl an Sequenzen, die an diese Position passen.

Diesen Prozess des Abgleichens mit der Referenzsequenz nennt man *alignment*. Den Wert, der angibt, mit welcher Anzahl an Sequenzen jede einzelne Position abgedeckt ist, nennt man *coverage* (deutsch etwa Abdeckung). Da ein *read* mit mehreren, im Idealfall mit jedem, seiner Nukleotide an die Referenz aligniert, erhält jede Position der Referenzsequenz für diesen einen *read* einen Punkt. Es wird also nicht nur die Position gezählt, an der der *read* beginnt, sondern alle vom *read* abgedeckten Nukleotide. Die *coverage* lässt sich nun in einem Punkte-Diagramm auf der y-Achse gegen die einzelnen Positionen der Referenz auf der x-Achse auftragen.

Beim *alignment* gibt es einige beeinflussbare Parameter. So lässt sich vorgeben, wie groß der Anteil eines *reads* sein muss, der an die Referenz *align*t, damit er in die *coverage* aufgenommen wird. Zudem lässt sich für die Darstellung der *coverage* eine bestimmte Fensterung einstellen. Man kann die *coverage* auf ein Nukleotid genau auflösen, oder sie über eine bestimmte Anzahl von Positionen mitteln. Dies bezweckt eine Glättung der Ergebnisse, da die Auflösung der *coverage* auf eine Position genau durch Ungenauigkeiten in der Sequenzierung beeinflusst wird. Neben den auf ein Nukleotid aufgelösten *alignments* wurden in der hier vorliegenden Arbeit *alignments* auf 50-Nukleotid-Fenster und auf Fenster, die den Abschnitten des VSV-Genoms entsprechen, vorgenommen.

Da sich im Lauf der Arbeit herausstellte, dass die überwiegende Mehrheit der

Sequenzen unspezifisch an FLAG-*beads* gebunden hatte, also auch in der Negativkontrolle nachzuweisen war, ohne jedoch immunstimulatorische Kapazität aufzuweisen, wurde die relative Anreicherung zwischen den Bedingungen analysiert. Hierfür wurde die *coverage* der experimentellen Bedingung für jede Position der Referenzsequenz oder in einem bestimmten Fenster durch die *coverage* an der entsprechenden Position oder im entsprechenden Fenster in der Negativkontrolle dividiert. Dieser Quotient wurde als relative Anreicherung bezeichnet.

## 4.8 Transfektion

Für die Analyse der immunstimulatorischen Kapazität einer RNA wurde diese in 1205LU-Melanomzellen transfiziert und nach 25 Stunden das Zytokin *interferon gamma-induced protein 10* (IP-10) im Überstand gemessen. 8000 am Vortag in 100  $\mu$ l DMEM-Medium ausplattierte Zellen wurden mit 100 ng RNA in einem 96-Well stimuliert. Konnte nach Immunpräzipitation von RIG-I-RNA-Komplexen keine RNA-Konzentration aufgrund zu geringer Menge ermittelt werden, wurden 2  $\mu$ l der in 50  $\mu$ l eluierten RNA eingesetzt. Nach enzymatischem Verdau wurden 10  $\mu$ l des Ansatzes eingesetzt.

Für die Transfektion wurde die RNA auf 100 ng/ $\mu$ l in Wasser vorverdünnt. 0,2  $\mu$ l des Transfektionsreagenz RNAiMax Lipofectamin wurden in 25  $\mu$ l Optimem-Medium verdünnt. Separat wurden 100 ng der RNA ebenfalls in 25  $\mu$ l Optimem-Medium verdünnt. Die beiden Ansätze wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach zu einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l zusammengeführt. Um die Komplexierung der negativ geladenen RNA mit dem kationischen Lipofectamine zu ermöglichen, wurde die Mischung erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die 50  $\mu$ l des Gemischs auf die 1205LU-Melanomzellen gegeben und diese für 25 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Überstände abgenommen und entweder sofort einer Analyse mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) unterzogen oder für eine spätere Analyse bei -20° C weggefroren.

#### **4.9 Enzyme-linked immunosorbent assay**

Die Konzentration von IP-10, auch bekannt als *C-X-C motif chemokine 10* (CXCL10), wurde im Überstand von 1205LU-Zellen mittels ELISA bestimmt. Dafür wurde das OptiEIA Human IP-10 ELISA Kit der Fa. BD Biosciences verwendet.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von IP-10 wird dieses zunächst über eine Antikörperbindung an den Boden eines Wells gebunden. Im nächsten Schritt bindet ein weiterer Antikörper an das Protein, welcher an ein Enzym gekoppelt ist – die *Horseradich*-Peroxidase (HRP). Bei Zugabe eines Substrats wird dieses von der HRP umgesetzt und es entsteht ein Lichtsignal. Die Menge des entstehenden Lichts korreliert mit der Konzentration des zu messenden Proteins. Anhand eines Standards lässt sich auf die Konzentration schließen.

Im ersten Schritt wurde in eine 96-Well Polystyrene-*high-bind*-Mikrotiterplatte der *Capture*-Antikörper - 1:250 verdünnt in *Coating*-Puffer - über Nacht bei 4° C inkubiert. Hierbei wurden 50 µl pro Well verwendet. Für jede zu messende Probe wurde ein Well eingeplant. Für den Standard wurden zweimal acht Wells eingeplant. Nach dem *coating* folgte der erste Waschschrift, wobei diese immer nach folgendem Schema erfolgten:

Inhalt der Wells verwerfen, Wells mit Waschpuffer auffüllen, Waschpuffer verwerfen und Mikrotiterplatte auf Saugpapier trocken klopfen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Danach wurden die Wells mit 100 µl ELISA-Verdünnungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur und 200 Umdrehungen auf einem Schüttler geblockt. Während der Inkubation auf dem Schüttler wurden die Wells in allen Schritten mit Parafilm verschlossen, um Verdunstung zu vermeiden.

In der Zwischenzeit wurde eine siebenstufige 1:1-Verdünnungsreihe des Standards hergestellt. Die höchste Konzentration des Standards betrug 500 pg/ml IP-10 in Verdünnungslösung, die niedrigste 7,81 pg/ml. Um einen Nullpunkt für die Standardkurve definieren zu können, wurde reine Verdünnungslösung als Leerwert verwendet.

Nach dem Blocken wurde die Mikrotiterplatte erneut, wie oben beschrieben, dreimal gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Wells mit 50 µl Probe bzw. 50 µl Standard befüllt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur und 200 Umdrehungen auf dem Schüttler inkubiert.

Es folgte ein weiterer Waschschrift mit fünf Wiederholungen.

Nun wurde die Platte mit 50 µl Detektions-Puffer befüllt. Dieser bestand aus einer 1:1000 Verdünnung des Detektions-Antikörpers und einer 1:250 Verdünnung des Enzym-Reagenz. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur bei 200 Umdrehungen auf dem Schüttler.

Es folgte ein weiterer Waschschrift mit sieben Wiederholungen.

Um die Reaktion, in der die HRP ihr Substrat umsetzt, zu starten, wurden 50 µl einer 1:1 Verdünnung aus Substrat-Reagenz A und Substrat-Reagenz B (Substrat-Reagenziensatz der Fa. OptiEIA TMB) in jedes Well gegeben und die Platte im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Abhängig von der IP-10 Konzentration begann dadurch eine mehr oder weniger schnelle Verfärbung der Substratflüssigkeit in den Wells. Die Reaktion wurde nach ca. 10 Minuten, in Abhängigkeit vom Farbumschlag des Standards, durch die Zugabe von 25 µl Schwefelsäure (Konzentration 1 M) beendet. Durch die Säure schlägt die Farbe der Lösung von blau in gelb um. Die Absorption der Flüssigkeit in den Wells wurde nun mit dem Multiplate Reader (Fa. Berthold Technologies) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die Absorption bei 595 nm subtrahiert. Die gemessenen Absorptionswerte wurden daraufhin wie folgt ausgewertet:

Durch die Korrelation der Absorptionswerte des Standards mit den entsprechenden, bekannten IP-10 Konzentrationen erhält man eine Standardkurve. Auf der x-Achse werden die Absorptionswerte und auf der y-Achse die IP-10 Konzentrationen der einzelnen Proben des Standards gegeneinander aufgetragen. Da die Korrelation zwischen IP-10 Konzentration und Absorption linear ist, stellte sich diese Standardkurve annähernd als eine Gerade dar. Durch Bestimmung der Steigung der Gerade lässt sich der Faktor errechnen, mit dem die Absorptionswerte der Proben multipliziert werden müssen, um auf die IP-10 Konzentration schließen zu können. Immer wenn die Proben vor dem Einsetzen in den ELISA verdünnt wurden, wurde die

Konzentration von IP-10 entsprechend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um auf die ursprüngliche Konzentration schließen zu können. Die Verdünnung der Proben fand in ELISA-Verdünnungslösung statt und war immer dann notwendig, wenn die erwartete IP-10 Konzentration in der Probe die Konzentration des höchsten Standards (500 pg/ml) überstieg.

#### 4.10 Enzymatischer Verdau von RNA

Um die mithilfe der Immunpräzipitation angereicherte RNA weiter zu charakterisieren, wurde diese enzymatisch verdaut und auf ihre Fähigkeit, nach dem Verdau eine Immunantwort auszulösen, getestet. Hierfür wurde die an RIG-I gebundene RNA aus VSV-infizierten Zellen mit den Enzymen RNase R, RNase III und 5'-Polyphosphatase für 30 Minuten im jeweils dazugehörigen Puffer bei 37° C inkubiert und anschließend in 1205LU-Melanomzellen transfiziert. Als Kontrolle wurde RNA ohne Enzym im Puffer der RNase III ebenfalls 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Für den Verdau wurde ein 20 µl Ansatz gewählt, bestehend aus den folgenden Reagenzien für die entsprechenden Enzyme:

**Tabelle 6 – Enzyme zum Verdau von RNA**

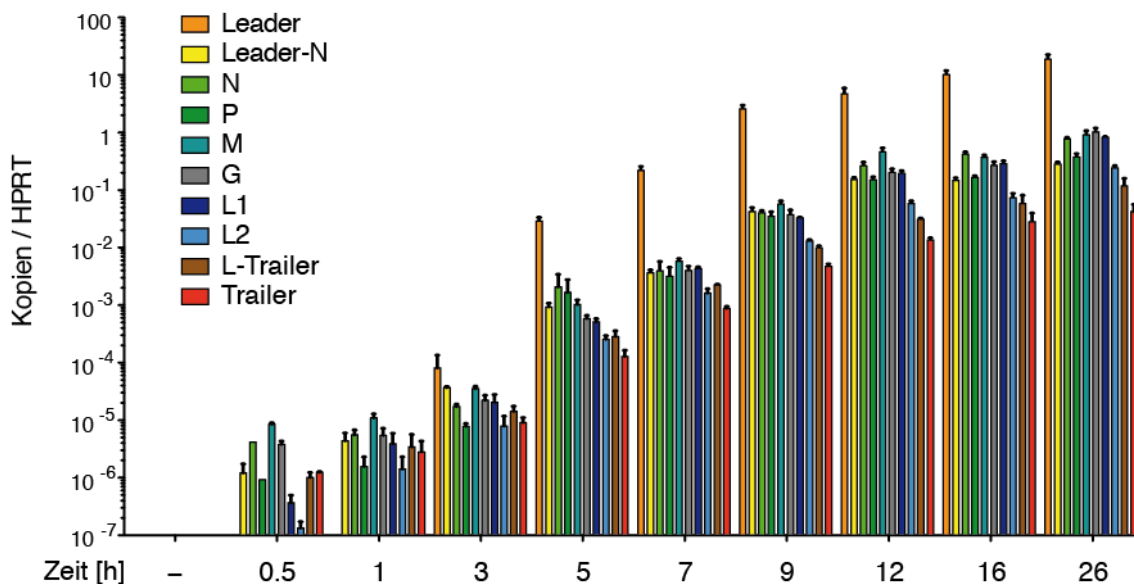
Enzym	Puffer	RNA	Ribolock	Enzymmenge	H <sub>2</sub> O	Zielstruktur
5'-Polyphosphatase	2 µl 10x Puffer	4 µl	0,5 µl	1 µl = 1 U 1 U/µl	12,5 µl	5'-Phosphat
RNase III	2 µl 10x Puffer	4 µl	-	1 µl = 1 U 1 U/µl	13 µl	dsRNA
RNase R	2 µl 10x Puffer	4 µl	-	1 µl = 20 U 20 U/µl	13 µl	ssRNA
Kontrolle	2 µl 10x Puffer	4 µl	-	-	14 µl	

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Kinetik viraler RNAs in VSV-infizierten Zellen

Um herauszufinden, welche virale RNA RIG-I aktivieren kann, ist es nötig, zu verstehen, welche RNAs überhaupt vom Virus gebildet werden. So sollte untersucht werden, ob sich typische Muster für Transkription und Replikation in der frühen bzw. späten Phase der Infektion abgrenzen lassen.

Dafür wurden HEK-293 FLAG-RIG-I Zellen mit VSV infiziert und die Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Lyse unterbrochen. Die viralen RNAs wurden mittels qRT-PCR-Assays für alle Gene von VSV, so wie die *Leader*-Region, die *Trailer*-Region und die *L-trailer*-Region gemessen.



**Abbildung 6 - Kinetik der einzelnen VSV-RNAs in infizierten HEK-Zellen**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden mit VSV (MOI = 1) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Nach RNA-Isolation wurde die cDNA mit einem Random Hexamer Primer und dem *Leader*-RT-Primer synthetisiert. Die cDNA wurde mit qRT-PCR auf die angegebenen RNAs von VSV untersucht und auf das Referenz-Gen HPRT normalisiert. L1 und L2 sind qRT-PCR-Assays, die verschiedene Abschnitte des L-Gens abdecken. Der erste dargestellte Zeitpunkt entspricht nicht infizierten Zellen (-). Die Kopien/HPRT-Werte der nicht infizierten Zellen wurden von den Werten von allen Zeitpunkten subtrahiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von Triplikaten eines Experiments. Für die Werte bei 0,5 Stunden liegen Duplikate vor.



Interessanterweise ist bis zu einer Stunde nach Infektion noch keine *Leader*-RNA nachweisbar (Abbildung 6). Da die *Leader*-RNA erst durch das Einsetzen der Transkription nachweisbar wird, kann das zu diesen Zeitpunkten vorliegende Muster ausschließlich auf das Genom zurückzuführen sein, welches soeben in die Zelle gelangt ist. Beim Nachweis des Genoms würde man eine in etwa gleich hohe Abdeckung aller untersuchten Gene mit Ausnahme des *Leader*-Assays erwarten. Dies ist nach einer Stunde annähernd der Fall.

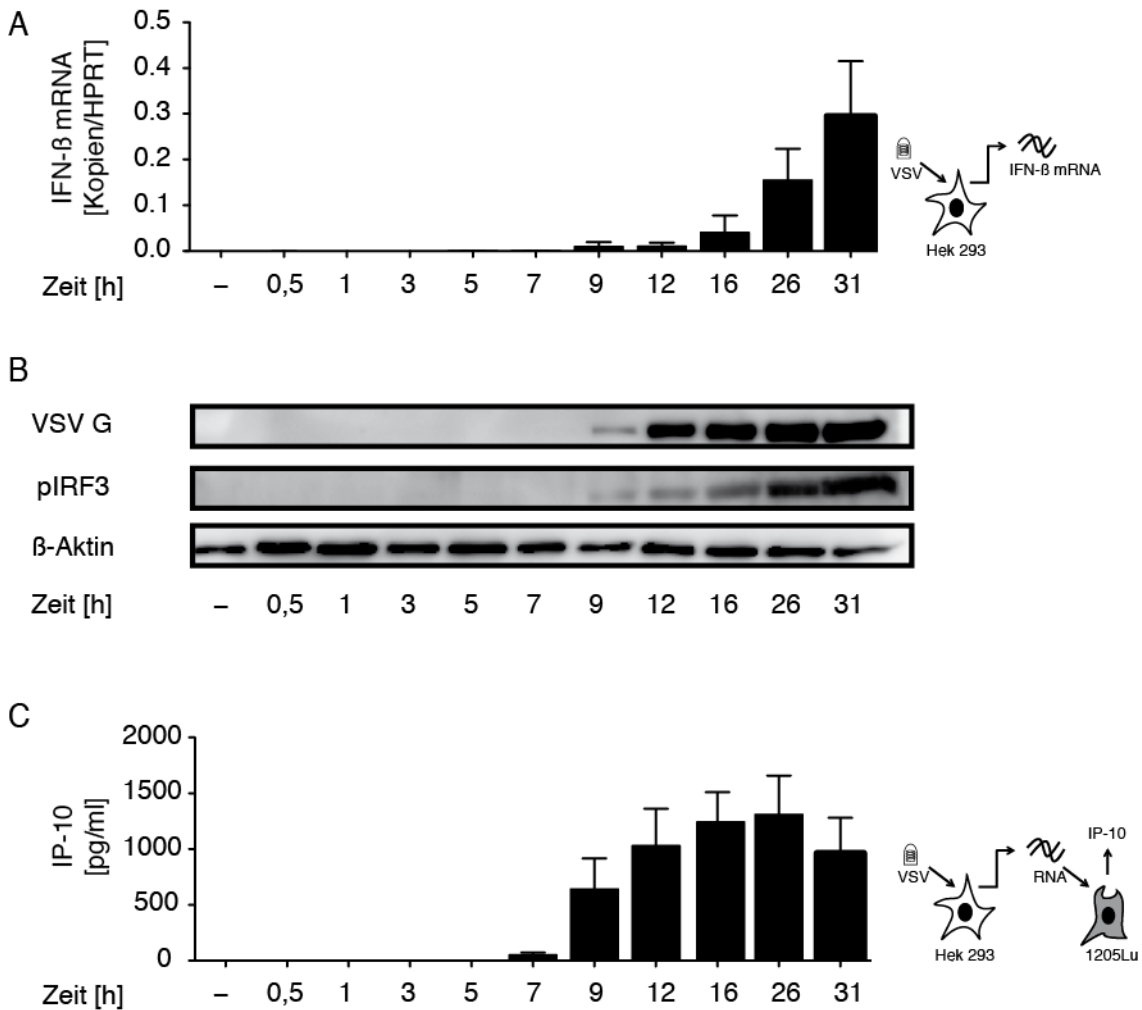
Nach fünf Stunden zeigt sich der für VSV typische Gradient der mRNAs (Villarreal et al. 1976; Iverson et Rose 1981). Zu diesem Zeitpunkt überwiegt die Transkription.

Angesichts der zeitlichen Auflösung des Experiments ist es nicht überraschend, dass sich keine zeitliche Verzögerung zwischen den einzelnen mRNAs ergibt, da bekannt ist, dass die Polymerase von VSV an jeder intergenischen Grenze gerade einmal zwei bis sechs Minuten benötigt, um den *poly(A)*-Schwanz und das 5'-Cap einzuführen, ehe sie die Transkription am nächsten Gen fortsetzt (Iverson et Rose 1981).

Für das Masernvirus ist beschrieben, dass Genom und Antigenom erst nach zwölf Stunden repliziert werden und sich eine Transkriptionsphase von einer Replikationsphase abgrenzen lässt (Plumet et al. 2005). Im hier vorliegenden Experiment waren der Assay für *L-trailer* und *trailer* als Marker für die Replikation vorgesehen. Die Erwartung war demnach, dass die Kopien der *Trailer*- und der *L-trailer*-RNA später ansteigen. Jedoch steigen auch diese beiden Assays bereits zwischen drei Stunden und fünf Stunden deutlich an. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Polymerase auch *L-trailer-read-through*-mRNA produziert, die von beiden Assays nachgewiesen wird. Daneben ist denkbar, dass ein *Trailer*-Transkript vom 3'-Ende des Antigenoms oder vom 3'-Ende eines möglichen DI-Genoms abgeschrieben wird.

Der mRNA-Gradient verschwindet zu den späteren Zeitpunkten, was vermutlich an einer Zunahme der Replikation des Vollängen-Genoms und seines Zwischenprodukts, dem Antigenom, liegt. Begünstigt wird das Verschwinden des typischen mRNA-Gradienten sicherlich auch durch eine zunehmende Desynchronisation der Infektion zwischen den verschiedenen Zellen.

## 5.2 Kinetik immunstimulatorischer RNA in VSV-infizierten Zellen



**Abbildung 7 - Kinetik der IFN- $\beta$ -Expression, des Auftretens viraler Proteine, der Phosphorylierung von IRF3 und der Entstehung immunstimulatorischer RNA in VSV-infizierten Zellen**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden mit VSV (MOI = 1) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Durch Zentrifugation wurde die zytoplasmatische Fraktion von den Zellkernen und den Membranresten getrennt. Im Anschluss wurde das die Zellkerne enthaltende Pellet mit Lysepuffer gewaschen und mit RIPA-Puffer aufgeschlossen. Aus der zytoplasmatischen Fraktion wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der erste dargestellte Zeitpunkt entspricht nicht infizierten Zellen (-). **(A)** IFN- $\beta$ -mRNA wurde mittels qRT-PCR gemessen und auf das Referenz-Gen HPRT normalisiert. **(B)** Die zytoplasmatischen Fraktionen wurden mittels *Western blot* auf die Anwesenheit von VSV G-Protein und  $\beta$ -Aktin untersucht. Die nukleären Extrakte wurden auf phosphoryliertes IRF3 angefärbt. **(C)** 100 ng der zytoplasmatischen RNA wurden in 1205LU-Zellen transfiziert. Nach 25 Stunden wurde im Überstand IP-10 mittels ELISA bestimmt. **(A)** und **(C)** stellen den Mittelwert von Triplikaten mit Standardabweichung dar. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Um den optimalen Zeitpunkt für die Detektion von RIG-I-Liganden möglichst früh im

Replikationszyklus zu ermitteln, wurden HEK-293 FLAG-RIG-I Zellen mit VSV infiziert und die Infektion zu den angegebenen Zeitpunkten durch Lyse unterbrochen. Die aus diesen Lysaten gewonnene RNA wurde nicht nur auf die viralen RNAs (Abbildung 6), sondern auch auf die Expression von IFN- $\beta$  untersucht (Abbildung 7A). Dadurch sollte geklärt werden, wann die infizierte Zelle auf die Anwesenheit des Virus mit einer Hochregulation der Expression antiviraler Gene reagiert.

Ein deutlicher Anstieg der IFN- $\beta$ -mRNA ist frühestens nach neun Stunden nachweisbar. Danach steigt sie annähernd exponentiell weiter an (Abbildung 7A). Stellt man die Daten logarithmisch dar, so ist bereits nach fünf Stunden ein geringer Anstieg der IFN- $\beta$ -mRNA zu messen (nicht gezeigt).

Parallel wurden aus den infizierten Zellen auch Proben für eine *Western-blot*-Analyse gewonnen. Die Färbung auf das G-Protein von VSV zeigt, dass die Hochregulation von IFN- $\beta$  mit der Translation viraler Proteine korreliert. Die Färbung nukleärer Extrakte auf die phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktor IRF3 zeigt, dass zwischen dessen Phosphorylierung und der Expression von IFN- $\beta$ -mRNA kein Zeitunterschied nachweisbar ist (Abbildung 7B).

Die zu verschiedenen Zeitpunkten aus VSV-infizierten Zellen gewonnene RNA wurde auf ihre Fähigkeit, eine Immunstimulation auszulösen, getestet. Als biologisches Reportersystem wurden dazu 1205LU-Melanomzellen verwendet. RNA aus den Zelllysaten wurde transfiziert und IP-10 im Überstand gemessen. Es dient als Messgröße für die Kinetik des Auftretens immunstimulatorischer RNA in VSV-infizierten Zellen. Immunstimulatorische RNA ist erstmals nach sieben Stunden detektierbar. Die Menge immunstimulatorischer RNA nimmt daraufhin bis zu einem Zeitpunkt von 25 Stunden zu, bevor es zu einer Abnahme des immunstimulatorischen Effektes der RNA 31 Stunden nach der Infektion kommt. Das Muster dieser Kinetik erinnert an das der viralen Replikation. Entstände die immunstimulatorische RNA in der Transkription, so wäre ein früherer Nachweis immunstimulatorischer RNA zu erwarten. Zudem lässt sich festhalten, dass die Entstehung immunstimulatorischer RNA der Phosphorylierung von IRF3 und der Transkription der IFN $\beta$ -mRNA vorausgeht (Abbildung 7C).

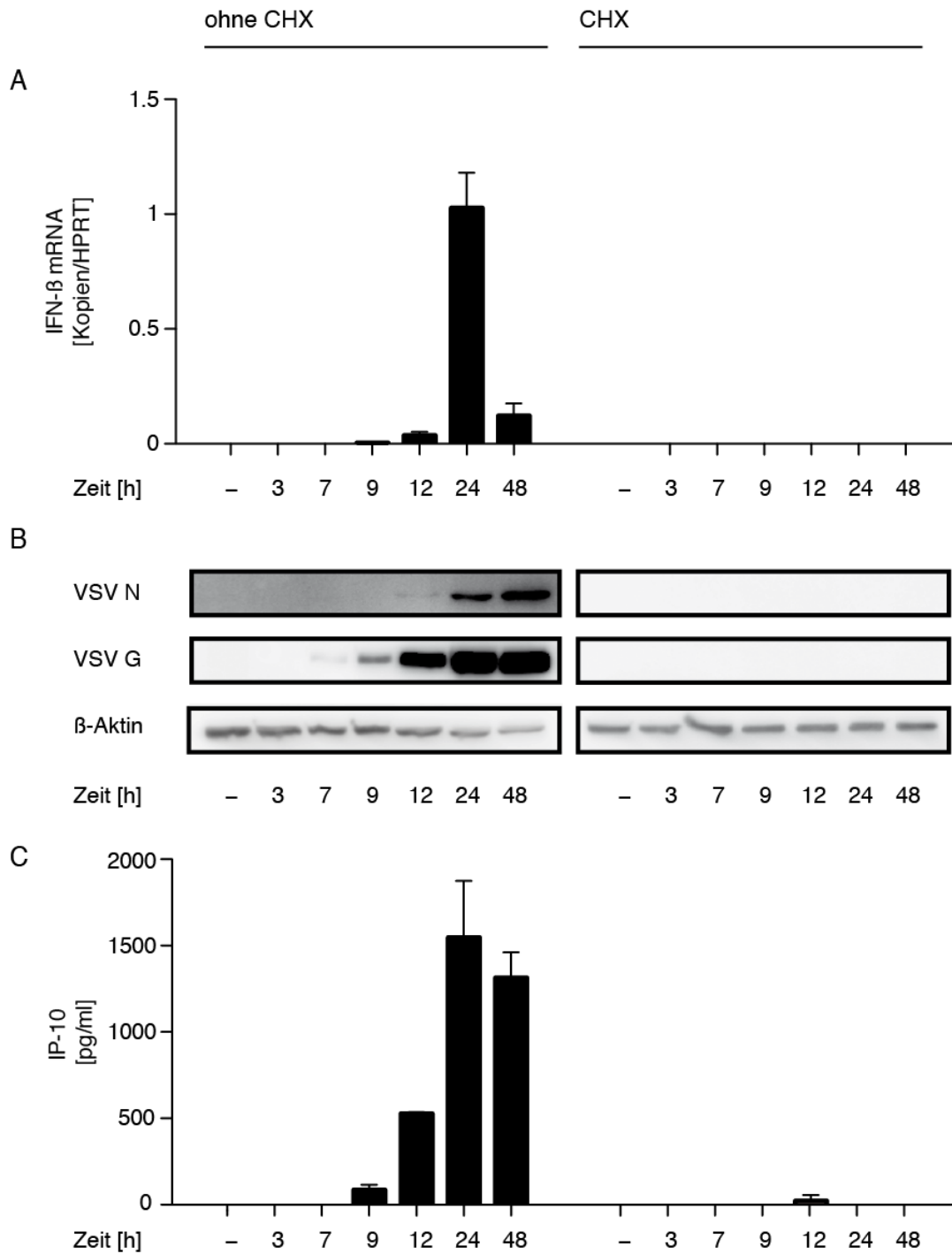
Die Dynamik des Auftretens immunstimulatorischer RNA weist auf eine Replikations-abhängige Entstehung hin. Die RdRp beginnt direkt nach Eintritt ins

Zytoplasma mit der Transkription. Zum Zeitpunkt der initialen Transkription ist jedoch keine immunstimulatorische RNA nachweisbar. Erst wenn ausreichend Protein für den Wechsel zur Replikation vorhanden ist, kann auch immunstimulatorische RNA nachgewiesen werden. Streng genommen würde man erwarten, dass das Auftreten immunstimulatorischer RNA gegenüber dem Auftreten der viralen Proteine verzögert geschieht. Jedoch erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass die Infektion in einem Experiment mit vielen Millionen Zellen streng synchron verläuft. Zudem hat der Assay für den Nachweis immunstimulatorischer RNA durch die biologische Signalverstärkung eines überschwelligem immunstimulatorischen Reizes in der transfizierten Zelle eine höhere Sensitivität als der *Western blot*. Dessen geringere Sensitivität zeigt sich daran, dass das virale N-Protein erst verzögert zum G-Protein nachweisbar ist (Abbildung 8B). Eigentlich sollte das N-Protein das erste translatierte Protein sein, da sein Gen sich am nächsten am 3'-Ende des VSV-Genoms befindet.

### **5.3 Die Entstehung immunstimulatorischer RNA in VSV-infizierten Zellen hängt von einer intakten Translation ab**

Die Replikation des Genoms von VSV ist abhängig von der intakten Synthese viraler Proteine. Folglich ist das Virus bei einer Inhibierung der Translation nicht mehr in der Lage, sein Genom zu replizieren: Zum einen, weil davon ausgegangen wird, dass das Vorhandensein von N-Protein das entscheidende Signal für die Polymerase darstellt, von der Transkription der mRNAs auf die Synthese des Vollängen-Antigenoms umzuschalten (Blumberg et al. 1981). Zum anderen wegen des Mangels an für die Replikation essentiellen Protein-Bausteinen.

Behandelt man Zellen vor und während der VSV-Infektion mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX), so lässt sich die Translation viraler Proteine verhindern (Abbildung 8B). Dies führt dazu, dass keine immunstimulatorische RNA mehr entsteht (Abbildung 8C) und die Hochregulation von IFN- $\beta$ -mRNA bleibt aus (Abbildung 8A). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die immunstimulatorische RNA in VSV-infizierten Zellen ein Produkt der Replikation ist.



**Abbildung 8 - Cycloheximid hemmt die Translation viraler Proteine und verhindert die Entstehung immunstimulatorischer RNA**

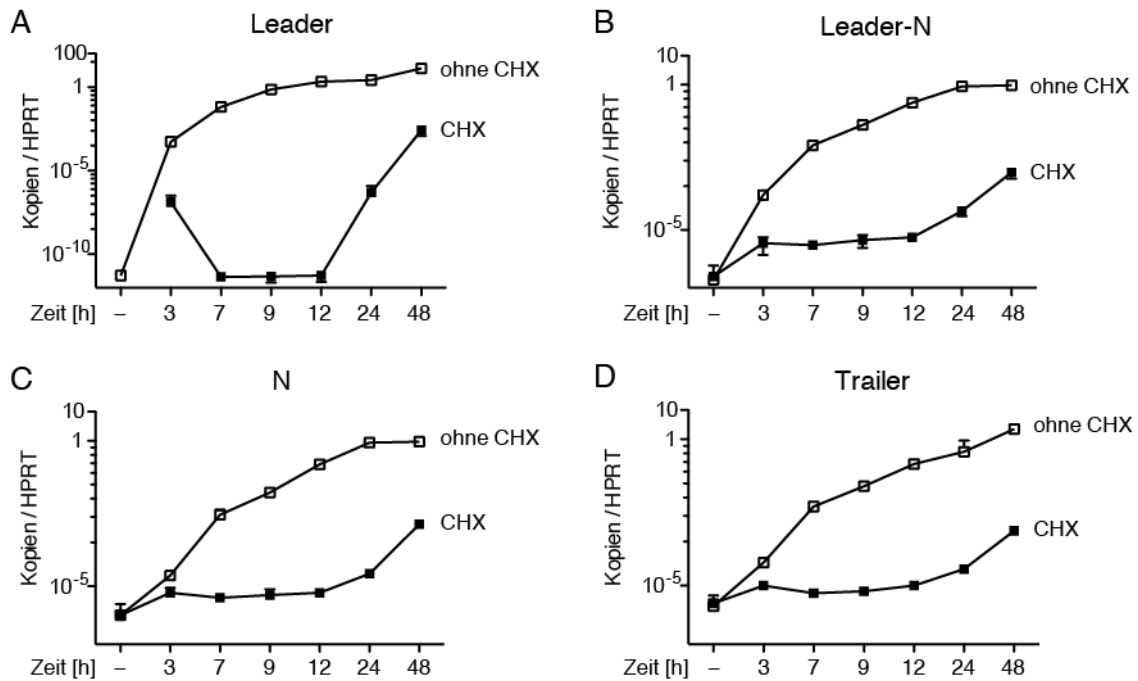
HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden mit VSV (MOI =1) infiziert. Die in der rechten Hälfte der Abbildung dargestellten Bedingungen wurden eine halbe Stunde vor und während der Infektion mit 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) behandelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert. Der erste dargestellte Zeitpunkt entspricht nicht infizierten Zellen (-). **(A)** Aus den Lysaten wurde RNA isoliert, mit Random-Hexamer-Primern und *Leader*-RT-Primer in cDNA umgeschrieben und auf die Expression von IFN-β und das Referenzgen HPRT analysiert. **(B)** 10 % der Lysate wurden mittels *Western blot* auf die Expression der viralen Proteine N und G, so wie das humane Protein β-Aktin untersucht. **(C)** Je 100 ng RNA wurden in 1205LU-Zellen transfiziert und 25 Stunden später wurde IP-10 im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von Duplikaten eines Experiments.

Da das Virus seine eigene RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-*dependent* RNA Polymerase, RdRp) in die Zelle einschleust, sollte die primäre Transkription der *Leader*-RNA und der mRNAs durch eine Behandlung mit CHX zunächst nicht betroffen sein. Es ist jedoch zu erwarten, dass auch die Transkription im Lauf der Zeit durch Hemmung der Translation kompromittiert wird. Analysiert man die Daten aus Abbildung 8A in einer logarithmischen Darstellung (nicht gezeigt), so zeigt sich tatsächlich auch in Anwesenheit von CHX ein marginaler Anstieg der IFN-Expression in VSV-infizierten Zellen, so dass möglicherweise auch primäre Transkripte oder das eingeschleuste Genom zur Immunstimulation der Zelle beitragen. Jedoch ist dies im Verhältnis zur Immunstimulation durch Replikationsprodukte nahezu vernachlässigbar.

Es ist bekannt, dass VSV nach Hemmung der Proteinsynthese in Zellen noch 20 Minuten in der Lage ist das, Genom zu replizieren. Dann ist der Vorrat an N-Protein erschöpft (Rubio et al. 1980). Wie lange die Polymerase die von N-Protein unabhängige Transkription aufrechterhalten kann, weiß man jedoch nicht. Für das Masernvirus konnte gezeigt werden, dass die initial vom Virus mitgebrachte Polymerase noch fünf Stunden fähig ist, N-mRNA zu synthetisieren (Plumet et al. 2005).

Es zeigt sich, dass für VSV unter den hier verwendeten Infektionsbedingungen bereits innerhalb von drei Stunden der Zeitpunkt erreicht wird, ab dem die Nukleinsäure-Synthese von einer intakten Translation abhängt. Hierfür wurden die infizierten und CHX-behandelten Zellen auf die Expression der viralen Gene *leader*, *Leader-N*, N und *trailer* untersucht (Abbildung 9). Zunächst kommt es zu einem minimalen, initialen Anstieg aller untersuchter RNAs nach drei Stunden. Dieser Anstieg kann entweder durch das hereinkommende Genom oder die primären Transkripte erklärt werden. Die qRT-PCR-Assays können nicht zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden. Jedoch ist in den CHX-behandelten Zellen bereits zum ersten gemessenen Zeitpunkt deutlich weniger virale RNA nachweisbar als in den Zellen ohne CHX. Dann gilt, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt CHX einen Einfluss auf die Synthese viraler RNAs hat. Dies kann bedeuten, dass CHX auch die transkriptionelle Aktivität der RdRp von VSV inhibiert. Diese Beobachtung ist in der Literatur allerdings bisher nicht beschrieben.

Die andere, wahrscheinlichere Möglichkeit ist jedoch, dass die Entstehung viraler RNA schon nach drei Stunden von der Synthese neu generierter, viraler Proteine abhängt.



**Abbildung 9 - Cycloheximid inhibiert die Transkription viraler RNAs**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden mit VSV (MOI =1) infiziert. Die Hälfte der Bedingungen wurde eine halbe Stunde vor und während der Infektion mit 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) behandelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert. Der erste dargestellte Zeitpunkt entspricht nicht infizierten Zellen (-). Aus den Lysaten wurde RNA isoliert, mit Random-Hexamer-Primern und *Leader*-RT-Primer in cDNA umgeschrieben und auf die Expression von HPRT als Referenzgen und von (A) *Leader*-RNA, (B) *Leader-N-read-through*-RNA (C) *N*-RNA und (D) *Trailer*-RNA analysiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von Duplikaten eines Experiments.

Für die *Trailer*-RNA, als Transkript von DI-Genomen ist unter CHX-Behandlung ein Anstieg beschrieben (Blumberg et al. 1981), der mit den Daten dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden konnte.

Nach 24 Stunden zeigen die Assays für *leader*, *Leader-N*, *N* und *trailer* einen deutlichen Anstieg. Die einsetzende, geringfügige RNA-Synthese zu diesen späten Zeitpunkten ist vermutlich auf die nachlassende Wirkung des Cycloheximid zurückzuführen.

## 5.4 Die Immunpräzipitation von FLAG-RIG-I ermöglicht die Aufreinigung immunstimulatorischer RNA

Zur Identifizierung der viralen RNA-Moleküle, die für die Immunstimulation verantwortlich sind, wurde FLAG-RIG überexprimiert, die Zellen mit VSV infiziert, RIG-I mit den gebundenen RNAs aus den Lysaten mit Anti-FLAG-*beads* immunpräzipitiert und dann aus den Eluaten RNA isoliert.

Nachdem eine deutliche Menge immunstimulatorischer RNA frühestens nach neun Stunden in Lysaten VSV-infizierter Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde die Immunpräzipitation zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Abbildung 10 zeigt den schematischen Aufbau des zentralen Experiments dieser Arbeit.

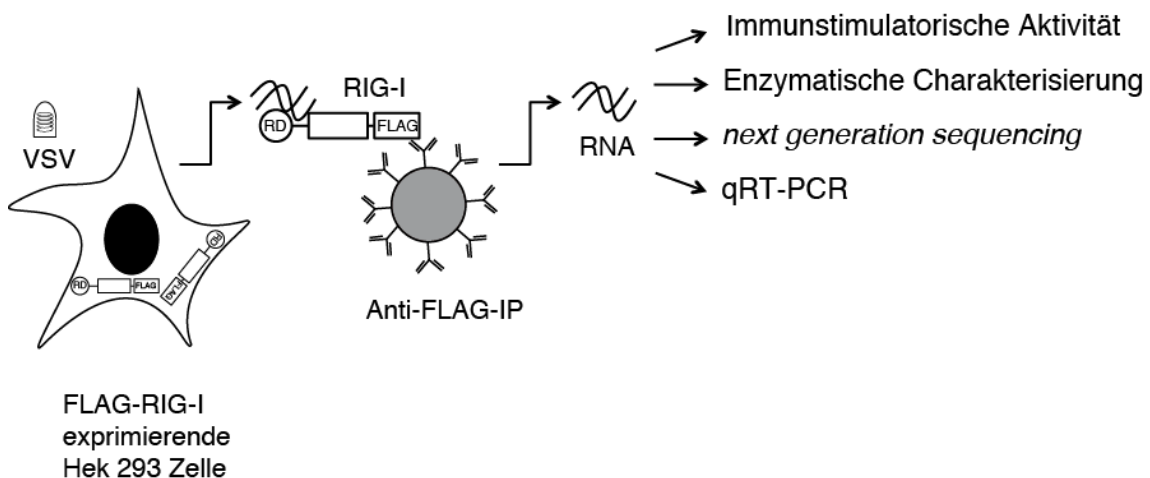


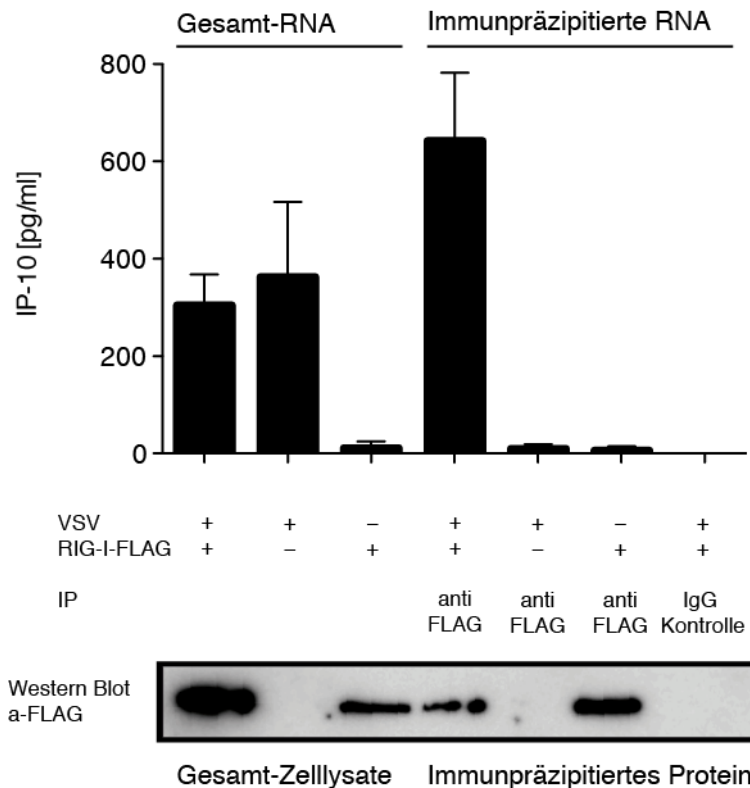
Abbildung 10 - Schematischer Aufbau des Immunpräzipitationsexperiments

Nach Tetrazyklininduktion und Virusinfektion wurden die FLAG-RIG-I-exprimierenden HEK-293 Zellen lysiert und die Lysate mit Anti-FLAG-Beads immunpräzipitiert. Aus den Eluaten der Immunpräzipitation wurde RNA gewonnen, die mit den angegebenen Methoden näher charakterisiert wurde.

Bevor die immunpräzipitierte RNA mittels enzymatischen Verdaus, NGS und qRT-PCR näher charakterisiert werden sollte, musste sichergestellt werden, dass sich mit der Methode immunstimulatorische RNA anreichern lässt. Dazu wurde der Erfolg der Immunpräzipitation von FLAG-markiertem RIG-I mit einem *Western blot* überprüft (Abbildung 11). Der *Western blot* zeigt FLAG-RIG-I in einer Anti-FLAG-Färbung.



FLAG-RIG-I findet sich erwartungsgemäß nur in Lysaten von Zellen, die das FLAG-RIG-I Konstrukt integriert haben. Das ist unabhängig davon, ob die Zellen infiziert wurden oder nicht (Laufbande 1 und Laufbande 3). Die Negativkontrolle aus Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen, die das Konstrukt nicht tragen, exprimiert kein Protein mit FLAG-tag (Laufbande 2).



**Abbildung 11 - Die RIG-I-assoziierte RNA ist immunstimulatorisch**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen wurden für 24 Stunden Tetrazyklin-induziert (1 µg/ml) und für 9 Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. 20 µl der Lysate wurden für den *Western blot* abgezweigt und in 2x Laemmli Puffer verdünnt, davon wurden 15 µl im *Western blot* eingesetzt. Das entsprach 0,75 % der Lysate. 100 µl der Lysate wurden für die Extraktion von RNA verwendet. Die verbleibenden 880 µl der Lysate wurden in die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Lysate der Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen wurden mit Anti-FLAG-beads immunpräzipitiert (FLAG-Kontroll-IP). Die Lysate der HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden mit Anti-FLAG-beads (FLAG-IP) oder mit IgG-beads (IgG-Kontroll-IP) immunpräzipitiert. 0,75 % der Eluate wurde in den *Western blot* eingesetzt. Aus dem restlichen Eluat wurde RNA isoliert. 100 ng RNA aus dem Eluat und den Lysaten wurde in 1205LU-Zellen transfiziert. Nach 25 Stunden wurde IP-10 im Überstand mittels ELISA gemessen.

Nur in Eluaten, die aus einer Immunpräzipitation (IP) mit Anti-FLAG-beads stammen, lässt sich FLAG-RIG-I anfärben (Laufbande 4 und 6). Der Nachweis von FLAG-RIG-I gelingt dabei in Eluaten aus nicht infizierten und aus Virus-infizierten Zellen.

Erwartungsgemäß findet sich im Eluat aus der Kontroll-IP mit IgG-*beads* kein FLAG-RIG-I (Laufbande 7). Ebenso wenig in Eluaten aus der IP mit Anti-FLAG-*beads* in Zellysaten von Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen, die kein FLAG-RIG-I exprimieren (Laufbande 5).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen Bedingungen, in denen sich FLAG-RIG-I im Lysat nachweisen lässt, es auch mit Anti-FLAG-*beads* präzipitiert werden kann.

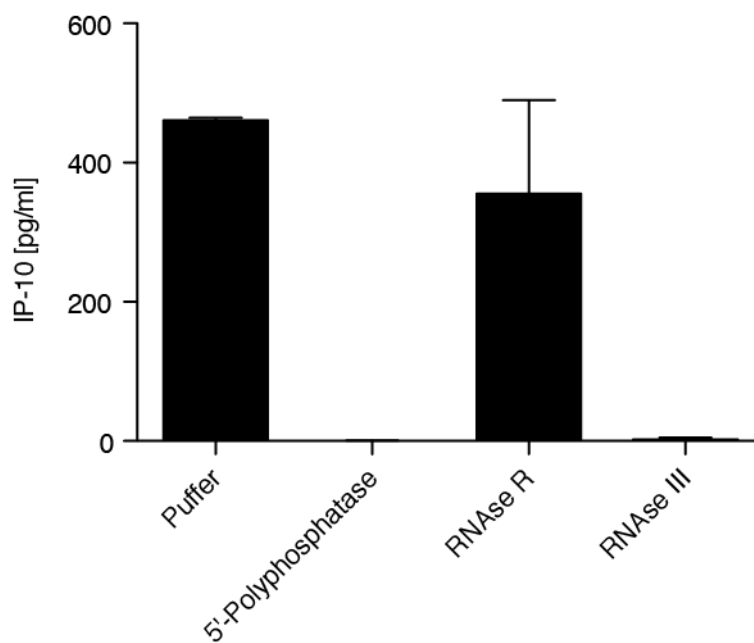
Ursprünglich war für das Experiment als Negativkontrolle der Vergleich mit nicht Tetrazyklin-induzierten Zellen vorgesehen. Die Tetrazyklin-Induktion erhöht zwar die Expression von FLAG-RIG-I, nicht induzierte Zellen exprimieren jedoch ebenfalls in geringerem Maße FLAG-RIG-I, so dass sie sich als Negativkontrolle für ungeeignet erwiesen: auch in der nicht Tetrazyklin-induzierten Bedingung ließ sich FLAG-RIG-I im Eluat nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Transfiziert man die RNA, die man durch Immunpräzipitation von RIG-I in Virus-infizierten Zellen gewinnt, in 1205LU-Zellen, so reagieren diese mit der Produktion des Zytokins IP-10. Auch die Gesamt-RNA aus Virus-infizierten Zellen ist immunstimulatorisch (Abbildung 11). Die immunpräzipitierte RNA führt jedoch gegenüber der Gesamt-RNA zu einer höheren IP-10-Induktion. So konnte gezeigt werden, dass sich mit der Immunpräzipitation von RIG-I in spezifischer Weise immunstimulatorische RNA aufreinigen lässt.

## **5.5 RIG-I bindet doppelsträngige 5'-Triphosphat-RNA in VSV-infizierten Zellen**

Behandelt man die RNA aus der Immunpräzipitation von RIG-I in VSV-infizierten Zellen mit verschiedenen Enzymen und überprüft in der Folge die Kapazität, ob diese RNA intrazellulär den RIG-I-Signalweg aktivieren kann, so lassen sich Rückschlüsse auf die für die Stimulation notwendigen Eigenschaften der RNA ziehen.

Die 5'-Polyphosphatase ist ein Enzym, das in der Lage ist, RNA spezifisch an ihrem 5'-Ende zu dephosphorylieren. RNase III ist ein Enzym, das nur doppelsträngige RNA (dsRNA) verdaut. Die Produkte des RNase III-Verdaus sind Fragmente von einer Größe von 15 bis 23 Basenpaaren. RNase R ist eine Einzelstrang-spezifische 3'-5' Exoribonuklease, die aber auch in der Lage zu sein scheint, eine dsRNA zu verdauen, sofern diese einen mindestens fünf Nukleotide langen 3'-Überhang aufweist (Vincent et Deutscher 2009). Aus Abbildung 12 geht hervor, dass die 5'-Polyphosphatase und die RNase III fähig sind die immunstimulatorische Eigenschaft des RIG-I-Liganden aus VSV-infizierten Zellen unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. RNase R kann das nicht. Daraus lässt sich folgern, dass der RIG-I-Ligand in VSV-infizierten Zellen doppelsträngig ist und an seinem 5'-Ende eine Triphosphatgruppe trägt.



**Abbildung 12 - Enzymatische Charakterisierung der RIG-I-gebundenen RNA**

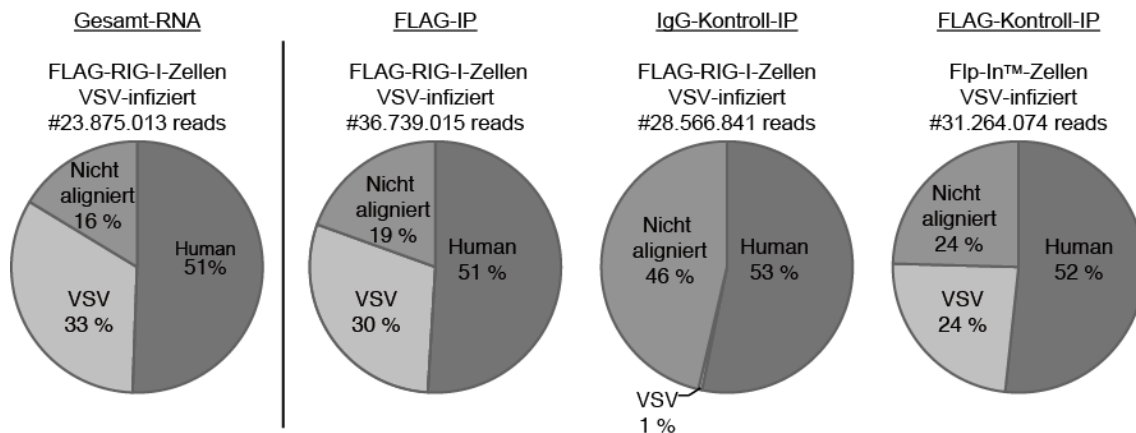
HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen wurden für 24 Stunden Tetrazyklin-induziert (1 µg/ml) und für 9 Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Die Lysate wurden mit Anti-FLAG-beads immunpräzipitiert. Aus den Eluaten der IP wurde RNA isoliert. Die RNA wurde mit den angegebenen Enzymen für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Als Kontrolle diente der Puffer der RNase III ohne Enzym. Die so behandelte RNA wurde in 1205LU-Zellen transfiziert und IP-10 nach 25 Stunden im Überstand mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente.

## **5.6 Der größte Anteil mittels *next generation sequencing* detektierter RNA aus der Immunpräzipitation von RIG-I bindet unspezifisch an die *beads***

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich durch Immunpräzipitation (IP) von RIG-I auch dessen Liganden anreichern lassen, wurde die RNA mittels *next generation sequencing* analysiert. Dafür wurden die cDNA-Bibliotheken der verschiedenen Bedingungen der IP, so wie die cDNA-Bibliothek von Gesamt-RNA aus VSV-infizierten Zellen sequenziert und die Sequenzen mit dem humanen Genom und dem VSV-Genom abgeglichen.

Die Zusammensetzung der Kuchendiagramme in Abbildung 13 zeigt, dass der Anteil der mit dem humanen Genom übereinstimmenden Sequenzen in allen Bedingungen nahezu konstant bei knapp über 50 % liegt. Der Anteil an VSV-RNA liegt für die Gesamt-RNA und die beiden Bedingungen, in denen Anti-FLAG-*beads* verwendet wurden, zwischen 24 und 33 % und damit in einem vergleichbaren Rahmen. In der IgG-Bedingung können nur 1 % der Sequenzen auf VSV zurückgeführt werden. Einen größeren Anteil machen in dieser Bedingung nicht alignierbare Sequenzen aus. Dies spricht für eine schlechtere Qualität der cDNA-Bibliothek im Vergleich zu den anderen Bedingungen. Diese erklärt sich dadurch, dass aus den Eluaten der IgG-Kontroll-IP kaum RNA gewonnen werden konnte. Bereits bei der Erstellung der cDNA-Bibliothek dieser Bedingung musste deshalb das maximale Volumen eingesetzt werden, während für die anderen Bedingungen eine definierte Menge RNA verwendet werden konnte.

Vergleicht man die Bedingungen, in denen der gleiche *bead* für die Immunpräzipitation verwendet wurde, zeigt sich, dass der Unterschied zwischen experimenteller Bedingung und Kontrolle für virale Sequenzen bei 6% liegt. Dies ist nur eine geringe Anreicherung. Der überwiegende Anteil der viralen Sequenzen bindet demnach unspezifisch an Anti-FLAG-*beads*.



**Abbildung 13 - Kuchendiagramme der NGS-Analyse von cDNA-Bibliotheken**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen wurden für 24 Stunden Tetrazyklin-induziert (1 µg/ml) und für 9 Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Die Lysate der Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen wurden mit Anti-FLAG-*beads* immunpräzipitiert (FLAG-Kontroll-IP). Die Lysate der HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden mit Anti-FLAG-*beads* (FLAG-IP) oder mit IgG-*beads* (IgG-Kontroll-IP) immunpräzipitiert. Aus den Eluaten der drei Bedingungen der IP und aus dem Lysat von für neun Stunden VSV-infizierter HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen (Gesamt-RNA) wurde RNA isoliert und cDNA-Bibliotheken erstellt. Die cDNA-Bibliotheken wurden parallel mit dem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzen wurden auf das humane Genom und die cRNA-Sequenz des VSV-Genoms aligniert. Für jede Bedingung der IP, so wie die Gesamt-RNA, ist der prozentuale Anteil der an die jeweilige Referenz alignierenden Sequenzen, so wie der Anteil der nicht alignierbaren Sequenzen dargestellt. # kennzeichnet die Anzahl sequenzierter *reads* in der jeweiligen Bedingung.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die unspezifischen Bindeeigenschaften des verwendeten *beads* erheblich das Ergebnis einer IP beeinflussen. Aus der IgG-Bedingung ließ sich keine cDNA-Bibliothek von ausreichender Qualität generieren, weshalb sie sich als Negativkontrolle mit eingeschränkter Vergleichbarkeit erwies. In Immunpräzipitationsexperimenten ist es nicht unüblich, sich auf eine Kontrollbedingung zu verlassen, die sich von der experimentellen Bedingung einzig in der IP verwendeten Antikörper unterscheidet. Durch ein solches Vorgehen wären in unserem Fall viele Sequenzen fälschlicherweise als in der RIG-I-IP angereichert gewertet worden, obwohl sich diese Anreicherung aus den unspezifischen Bindeeigenschaften der verwendeten *beads* ergibt. Bei der weiteren Analyse der NGS-Daten wurden deshalb vornehmlich die Bedingungen beachtet, in denen Anti-FLAG-*beads* verwendet wurden.

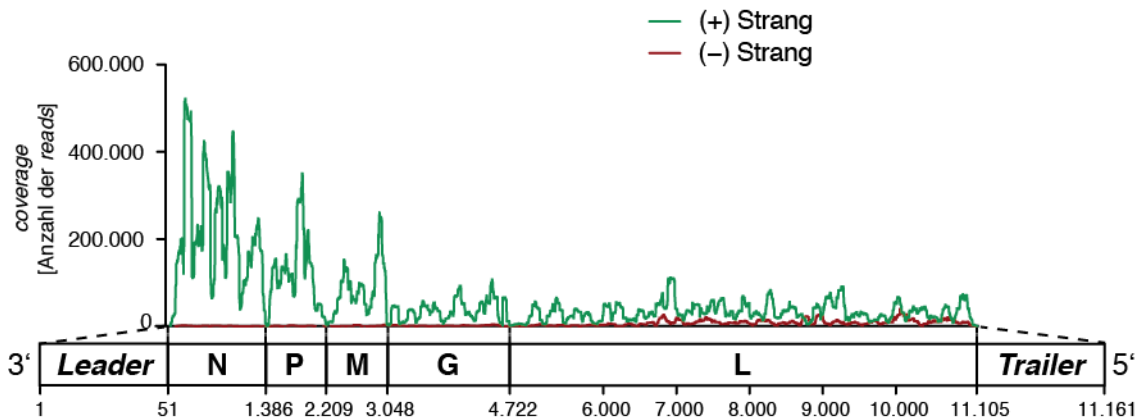
## 5.7 Der überwiegende Anteil viraler RNAs in der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen entspricht viralen mRNAs

Um einen Eindruck von der Verteilung viraler RNAs in der Gesamt-RNA aus VSV-infizierten Zellen zu gewinnen, wurde ein Teil der Lysate, die für die Immunpräzipitation mit FLAG-RIG-I verwendet wurden, abgezweigt. Daraus wurde RNA isoliert und nachfolgend eine cDNA-Bibliothek generiert. Diese wurde mittels NGS basierend auf einer Illumina-Sequenzierung analysiert. Dabei wurde die Orientierung im Bezug zum Referenzgenom des VSV berücksichtigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der überwiegende Anteil der viralen RNAs in einer mit VSV infizierten Zelle nach neun Stunden Infektion eine positive Orientierung hat, also entweder auf das Antigenom oder auf mRNA zurückzuführen ist (Abbildung 14). Dass es sich größtenteils um mRNA handelt, sieht man daran, dass das *alignment* an den intergenischen Grenzen stark abfällt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass es kaum RNAs gibt, die diese Grenze überschreiten: eine Eigenschaft, die man bei den positiv orientierten RNAs, vor allem von Sequenzen erwarten würde, die dem Antigenom entsprechen.

Der zweite Hinweis darauf, dass der überwiegende Anteil der positiv orientierten Sequenzen auf mRNA zurückzuführen ist, zeigt sich darin, dass die *coverage* der einzelnen Gene vom 3'-Ende des Genoms zu seinem 5'-Ende hin abnimmt. Das N-Gen hat somit die höchste *coverage*, das L-Gen, die geringste. Dies entspricht dem erwarteten Gradient der primären Transkripte ( $N > P > M > G > L$ ; s. Punkt 1.2.3 der Einleitung).

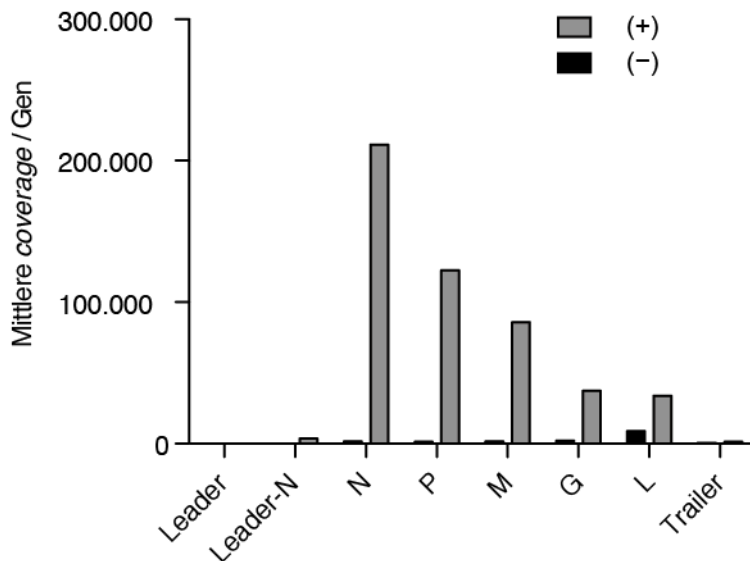
Noch deutlicher wird dieser Gradient, wenn man eine alternative Darstellung für das *alignment* wählt. Für Abbildung 15 wurden die Sequenzen auf die Gene des VSV-Genoms, so wie die nicht Protein-kodierende *Leader*- und *Trailer*-Region gefenstert. Das bedeutet, ein Balken entspricht der Menge aller in einem definierten Bereich alignierenden Sequenzen, normalisiert auf die Länge des Bereichs. Den Bereich bezeichnet man auch als Fenster und er entspricht in diesem Fall dem jeweiligen Gen.



**Abbildung 14 - Alignment der Gesamt-RNA VSV-infizierter Zellen auf das VSV-Genom**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden für 9 Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Aus den Lysaten wurde RNA isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt. Die Bibliothek wurde auf dem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzen wurden auf die cRNA-Sequenz des VSV-Genoms aligniert. Auf der y-Achse ist die *coverage* aufgetragen. Der Begriff *coverage* beschreibt die Anzahl der Sequenzen, die eine bestimmte Nukleotidposition im Referenzgenom abdecken. Die Auflösung der x-Achse ist auf ein Nukleotid genau. Unter der x-Achse ist das Genom von VSV schematisch dargestellt. Die *Leader*- und die *Trailer*-Region sind nicht maßstabsgetreu. Die *coverage* ist getrennt für die in positiver oder negativer Orientierung alignierenden Sequenzen aufgetragen. (+) Strang Sequenzen entsprechen in ihrer Sequenz dem Referenzgenom. (-) Strang Sequenzen verhalten sich zu diesem revers-komplementär.

Für VSV ist beschrieben, dass die Polymerase mit ca. 31% Wahrscheinlichkeit an jeder Gengrenze abfällt (N-P 32%, P-M 29%, M-G 33%, G-L unbekannt) (Iverson et Rose 1981). Für die Gengrenzen N-P lässt sich aus den NGS-Daten eine Wahrscheinlichkeit von 42 %, für die Gengrenze P-M von 30%, für die Gengrenze M-G von 55% und für die Gengrenze G-L von 10% errechnen. Dies entspricht einer mittleren Wahrscheinlichkeit von 34 %. Auch die qRT-PCR-Daten aus Abbildung 6 lassen sich auf diese Frage hin untersuchen. Nach fünf Stunden ist der mRNA-Gradient am deutlichsten ausgeprägt. Hier kann eine mittlere Abfallwahrscheinlichkeit von ca. 31 % berechnet werden. (N-P 48%, P-M 20%, M-G 43%, G-L 12%). Dies zeigt, dass sich NGS-Daten mithilfe der qRT-PCR bestätigen lassen. Dass der mRNA-Gradient zu den späteren Zeitpunkten der VSV-Kinetik mittels qRT-PCR nicht mehr nachweisbar ist, kann durch eine Zunahme an mitgemessenen Replikationsprodukten erklärt werden. Die qRT-PCR ist nicht Strang-spezifisch. In der NGS-Analyse ist das Ergebnis durch alleinige Betrachtung der positiv orientierten Sequenzen weniger durch Replikationsprodukte gestört.



**Abbildung 15 - Mittlere *coverage* pro Gen des *alignment* der Gesamt-RNA VSV-infizierter HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen wurden für 9 Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Aus den Lysaten wurde RNA isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde eine cDNA-Bibliothek erstellt. Die cDNA-Bibliothek wurde mit dem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzen der cDNA-Bibliothek wurden auf die cRNA-Sequenz des VSV-Genoms aligniert. Für die VSV-Gene N, P, M, G und L, die *Trailer*-Region, die *Leader*-Region, und die Übergangsregion *Leader-N* (Nukleotide 1 – 200) wurde die mittlere Abdeckung (*coverage*) mit positiv (+) und negativ (-) orientierten *reads* berechnet. Dabei wurden alle Sequenzen, die in diesen Bereichen alignieren addiert und auf die Länge des Abschnitts normalisiert. Es handelt sich um eine alternative Darstellung der Daten in Abbildung 14.

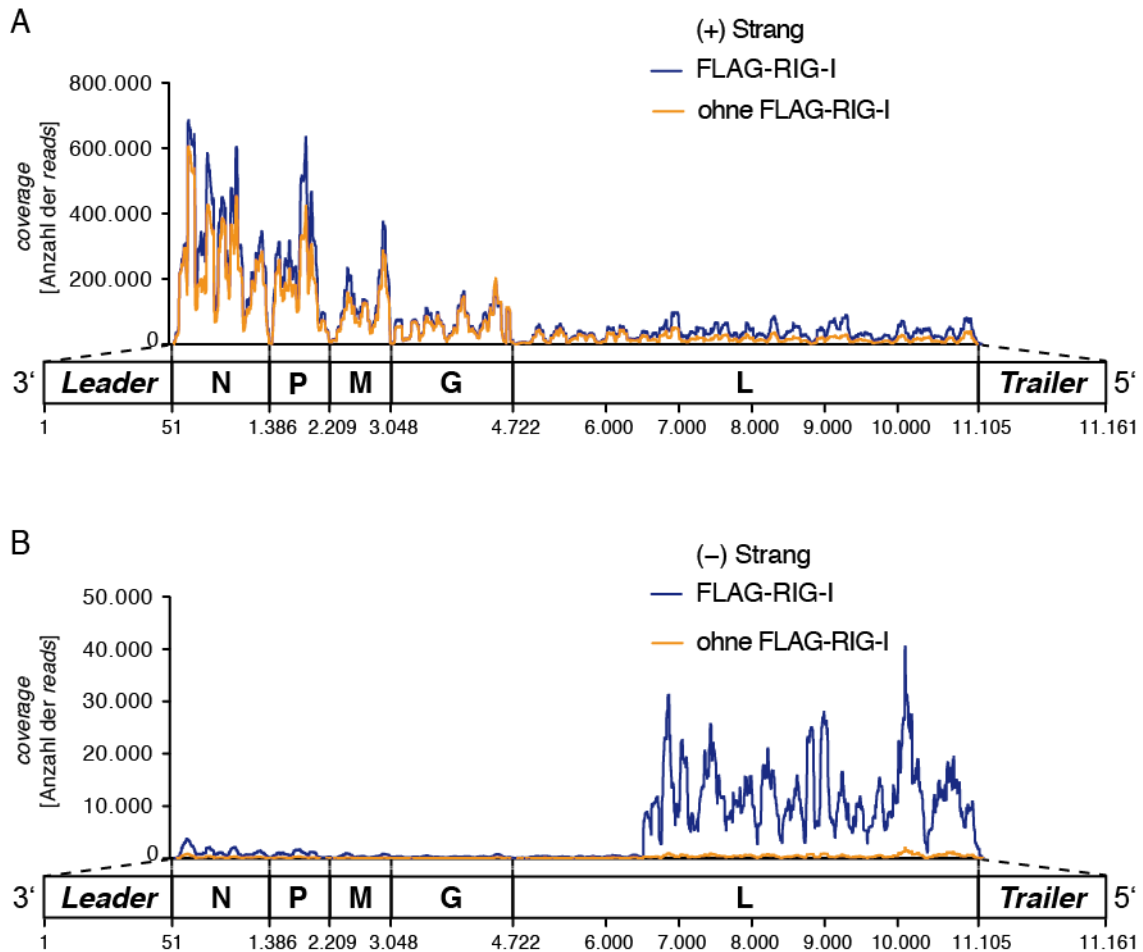
Bei der Analyse der negativ orientierten Sequenzen des *alignments* der Gesamt-RNA, würde man bei einer Infektion mit einer homogenen Population von Wildtyp-Virus eine relativ gleichmäßige *coverage* über die gesamten 11.161 Nukleotide der Referenz erwarten, da ja die einzige vorhandene negativ orientierte RNA in den infizierten Zellen das Vollängen-Genom sein sollte. Betrachtet man jedoch das *alignment* der negativ orientierten Sequenzen der Gesamt-RNA, so fällt ein deutlicher Anstieg der *coverage* im hinteren Bereich des Genoms auf (rote Linie in Abbildung 14). Bei genauerem Blick in die Daten zeigt sich ein abrupter Anstieg der *coverage* um die Position 6495. Die *coverage* der negativ orientierten Sequenzen beträgt bis zur Position 6494 im Durchschnitt 1842 *reads* pro Nukleotid und steigt ab der Position 6495 auf 10.809 *reads* pro Nukleotid. Dies entspricht einer 5,9-fach höheren Abdeckung im hinteren Bereich des Genoms. Eine plausible Erklärung für dieses Muster bietet das Vorhandensein eines DI-Genoms, das sich über diesen Abschnitt des Genoms erstreckt. Die Abdeckung der *Leader*- und der *Trailer*-Region ist sehr niedrig, was sich in Abbildung 14 und 15 zeigt.



Dies kann zum Einen dadurch erklärt werden, dass die sehr kurzen Transkripte dieser Regionen als äußerst instabil gelten. So ist es möglich, dass sie bei der RNA-Aufreinigung oder cDNA-Bibliothek-Erstellung degradiert oder verloren gegangen sind. Zum Anderen ist bekannt, dass bei NGS-Analysen die 5'- und die 3'-Enden von Nucleinsäuren unterrepräsentiert sind. Eine Tatsache, die in letzter Zeit zu Bemühungen um alternative Methoden zur Generierung von cDNA-Bibliotheken geführt hat (Agarwal et al. 2015).

## **5.8 Ein 4719 Nukleotide langes *Panhandle-defective-interfering*-Genom bindet an RIG-I**

Analysiert man die Ergebnisse des NGS der aus der RIG-I Immunpräzipitation gewonnenen RNA, so zeigt sich, dass diese in ihrem Muster weitestgehend dem entspricht, was man bereits in der Analyse der Gesamt-RNA aus VSV-infizierten Zellen beobachten konnte (Abbildung 14). Der überwiegende Anteil der an die VSV-Referenzsequenz alignierenden *reads* stimmt in seiner Orientierung mit dem Antigenom überein (Abbildung 16A). Für diese positiv orientierten RNAs lässt sich keine Anreicherung zwischen den Bedingungen mit oder ohne Expression von FLAG-RIG-I in den zur IP verwendeten Zellen erkennen. Das bedeutet, dass der größte Anteil viraler RNA in den IPs und in der Kontrollbedingung aus mRNA besteht und unspezifisch an die *beads* bindet. Dass sich die Sequenzen auf die mRNA zurückführen lassen, erkennt man, wie schon bei der Analyse der Gesamt-RNA, am Gradienten der *coverage*. Dieser tritt auch hier deutlicher hervor, wenn man das *alignment* auf die Gene gefenstert darstellt (Abbildung 18).



**Abbildung 16 - NGS-Analyse FLAG-RIG-I-gebundener RNA**

HEK-293 FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen (Negativkontrolle, „ohne FLAG-RIG-I“) wurden für 24 Stunden Tetrazyklin-induziert (1 µg/ml) und für 9 Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Die Lysate wurden mit Anti-FLAG-beads immunpräzipitiert. Aus den Eluaten der IP wurde RNA isoliert und cDNA-Bibliotheken erstellt. Die cDNA-Bibliotheken wurden parallel mit dem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzen wurden auf die cRNA-Sequenz des VSV-Genoms aligniert. Auf der y-Achse ist die *coverage* aufgetragen. Der Begriff *coverage* beschreibt die Anzahl der Sequenzen, die eine bestimmte Nukleotidposition im Referenzgenom abdecken. Die Auflösung der x-Achse ist auf ein Nukleotid genau. Unter der x-Achse ist das Genom von VSV schematisch dargestellt. Die *Leader*- und die *Trailer*-Region sind nicht maßstabsgetreu. **(A)** Darstellung der *coverage* der in positiver Orientierung an das Referenzgenom alignierenden Sequenzen. **(B)** Darstellung der *coverage* der in negativer Orientierung an das Referenzgenom alignierenden Sequenzen.

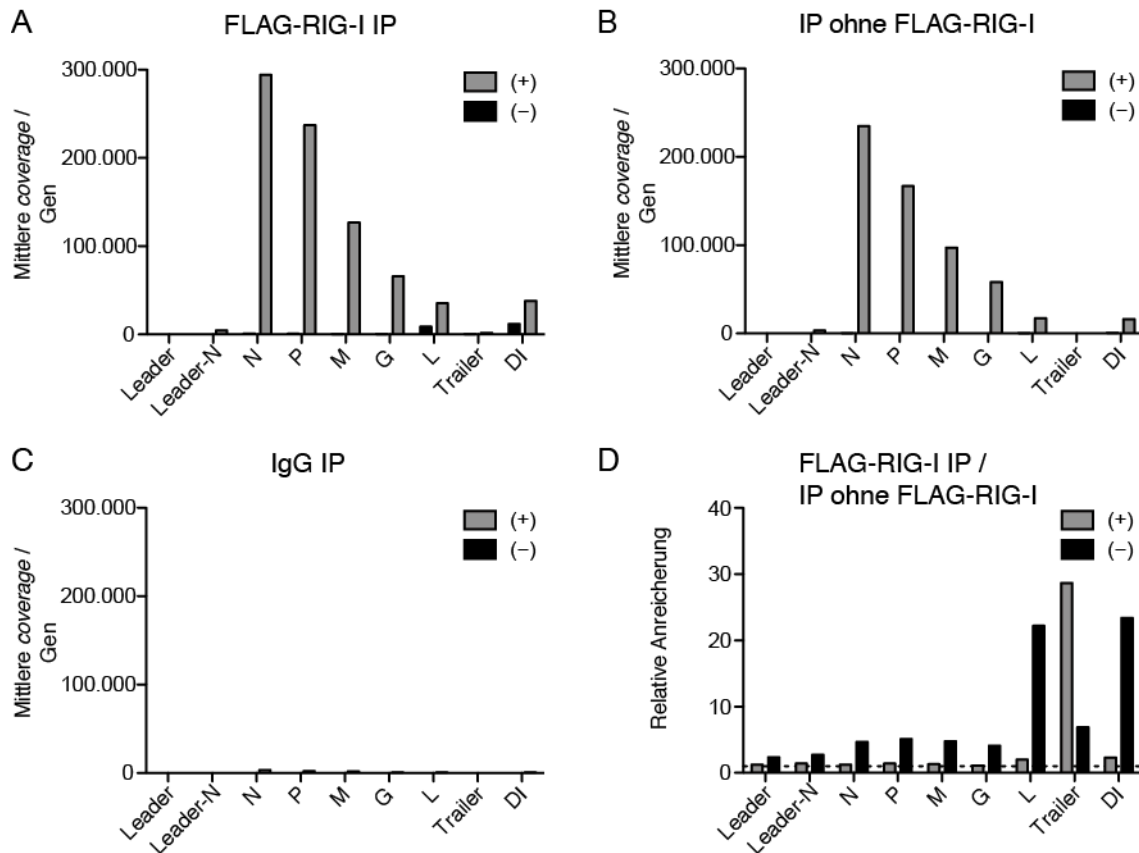
Betrachtet man jedoch die negativ orientierten Sequenzen, so zeigen sich deutliche Unterschiede im Muster der *coverage* zwischen der FLAG-RIG-I-IP und der Kontrolle (Abbildung 16B). Es wird deutlich, dass um Position 6500 herum eine deutlich höhere durchschnittliche *coverage* in der experimentellen Bedingung beginnt. Eine genauere Analyse ergibt, dass die Abdeckung zwischen Position 6496 und Position 6497 abrupt ansteigt.



Die mittlere Abdeckung der negativ orientierten Sequenzen liegt bis zu Position 6496 bei 583 *reads* pro Nukleotidposition für die Bedingung in der FLAG-RIG-I in den Zellen exprimiert wurde und bei 130 *reads* pro Nukleotidposition für die Bedingung in der FLAG-RIG-I nicht exprimiert wird. Nach der Position ergibt sich eine mittlere Coverage von 11.978 bzw. 511 *reads* pro Nukleotidposition.

Noch deutlicher tritt dieser Sprung in der *coverage* hervor, wenn man für jede einzelne Position des viralen Genoms einen Quotienten der *coverages* aufgelöst in positive und negative Sequenzen bildet (Abbildung 17A). Man teilt also die Anzahl der Sequenzen, die in der FLAG-RIG-I Bedingung an einem bestimmten Nukleotid alignieren durch die Anzahl der Sequenzen, die an der gleichen Position in der Negativkontrolle alignieren. Dieser Quotient wird als relative Anreicherung bezeichnet. Bis zur Position 6496 trägt die relative Anreicherung zwischen den Bedingungen für die negativ orientierten Sequenzen in etwa 4,5. Diese mäßige Anreicherung lässt sich dadurch erklären, dass RIG-I das negativ orientierte Vollängen-Genom bindet. Ab Position 6497 sind die Sequenzen um etwa den Faktor 23 angereichert.

Dieser deutliche Anstieg in der relativen Anreicherung lässt sich am besten durch ein 4719 Nukleotide langes *Defective-interfering*-Genom (DI-Genom) mit *Panhandle*-Struktur erklären. Ein weiterer Hinweis für ein DI-Genom mit diesen Charakteristika ist die Anreicherung der *Trailer*-Region in positiver Orientierung (siehe Abbildung 17A). Diese bildet nämlich in allen bisher beschriebenen *Panhandle*-DI-Genomen den Doppelstrang mit der die Triphosphat-Gruppe tragenden negativ orientierten *Trailer*-Region.



**Abbildung 18 – Analyse der Next-Generation-Sequencing-Ergebnisse der mit FLAG-RIG-I immunpräzipitierenden viralen RNA in Gen-Fenstern**

FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen (Negativkontrolle) wurden für 24 Stunden Tetracyclin-induziert (1 µg/ml) und für neun Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Das Lysat der FLAG-RIG-I-Zellen wurde mit Anti-FLAG-beads oder IgG-beads (weitere Negativkontrolle) immunpräzipitiert. Das Lysat der Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen wurde mit Anti-FLAG-beads immunpräzipitiert. Aus den Eluaten der IP wurde RNA isoliert und cDNA-Bibliotheken erstellt. Die cDNA-Bibliotheken wurden parallel mit dem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzen wurden auf die cRNA-Sequenz des VSV-Genoms und des *de-novo*-assemblierte DI-Genom aligniert. Für die VSV-Gene N, P, M, G und L, die *Trailer*-Region, die *Leader*-Region, die *Leader-N*-Region (Nukleotide 1 – 200) und das DI-Genom wurde die mittlere Abdeckung (*coverage*) mit positiv (+) und negativ (-) orientierten *reads* berechnet. Dabei wurden alle Sequenzen, die in diesen Bereichen alignieren addiert und auf die Länge des Abschnitts normalisiert. Dargestellt ist die mittlere *coverage* der einzelnen Gene aus der IP (A) mit Anti-FLAG-beads in Lysaten von FLAG-RIG-I-Zellen, (B) mit Anti-FLAG-beads in Lysaten von Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen, die kein FLAG-RIG-I exprimieren, (C) mit IgG-beads in Lysaten von FLAG-RIG-I-Zellen. (D) Abgebildet ist die relative Anreicherung der mittleren *coverage* pro Gen zwischen (A) und (B).

## 5.9 *Breakpoint*-Sequenzen bestätigen ein *Panhandle-defective-interfering*-Genom als Liganden von RIG-I

Software zur Analyse von NGS-Daten, wie die *CLC Genomics Workbench* oder der *Integrative Genomics Viewer* stellen das Ergebnis eines *alignments* folgendermaßen dar: Unter der Referenzsequenz werden alle Sequenzen an der Position aufgelistet, an der sie mit der Referenzsequenz übereinstimmen. Wirft man nun einen Blick auf die Position 6496 des VSV-Genoms, entdeckt man dort Sequenzen, die nur teilweise mit der Referenzsequenz an dieser Stelle übereinstimmen. Und zwar sind die Sequenzen in ihrem hinteren Teil deckungsgleich mit der Nukleotid-Sequenz des VSV-Genoms, die sich ab Position 6496 ergibt. Der erste Teil dieser Sequenzen ist jedoch nicht mit den Nukleotiden vor Position 6496 deckungsgleich. Da für VSV DI-Genome beschrieben sind, die aus einem Teil des Genoms mit einer komplementären Doppelung der *Trailer*-Region bestehen, war es naheliegend zu untersuchen, ob die nicht komplementären Nukleotide vor Position 6496 mit der *Trailer*-Region des VSV-Genoms übereinstimmen. Zumal sich in den NGS-Ergebnissen in der Darstellung der relativen Anreicherung eine Anreicherung der *Trailer*-Region in positiver Orientierung ergibt.

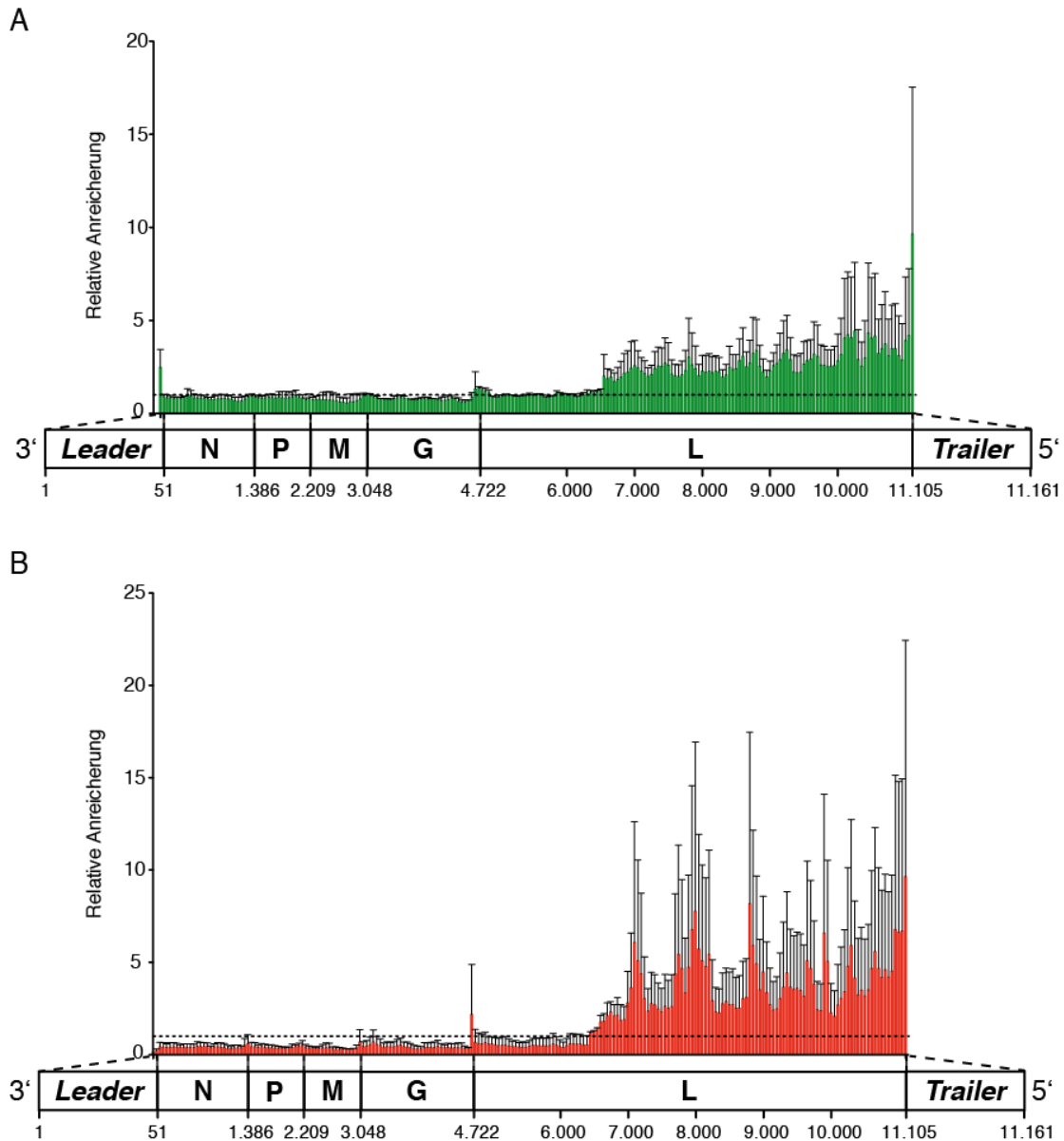
Bereits bei der makroskopischen Analyse zeigt sich eine augenfällige Übereinstimmung der ersten Hälfte der Sequenzen mit der *Trailer*-Region des VSV-Genoms. Eine systematische Analyse bestätigt dieses Ergebnis. Hierfür wurde gezielt nach Sequenzen gesucht, die zu einem Teil an einer Stelle des VSV-Genoms und zum anderen Teil an einer anderen, mindestens ein Nukleotid entfernten Stelle des VSV-Genoms alignieren. Hierbei wurde auch die Information berücksichtigt, in welcher Orientierung die jeweiligen Abschnitte der Sequenzen an die Referenz alignieren. Das Nukleotid, ab dem sich eine Sequenz an einer anderen Stelle alignieren lässt, bezeichnet man als *breakpoint*. Die Sequenz, die einen *breakpoint*, enthält bezeichnet man als *Breakpoint*-Sequenz. Durch die Analyse ergab sich eine Liste von Kandidaten-*breakpoints*. Doch nur der bereits mit der makroskopischen Analyse entdeckte *breakpoint* an Position 6496 zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle angereichert. Sowohl im Input, als auch im Eluat der FLAG-RIG-I Bedingung fanden sich 18 solcher Sequenzen, während in der Negativkontrolle mit demselben Algorithmus keine einzige Sequenz mit diesen Eigenschaften detektiert wurde. Der Aufbau dieser *Breakpoint*-Sequenz und die

Tatsache, dass die Anreicherung in der IP genau um diesen Punkt herum ansteigt, zeigt, dass es sich bei dem an RIG-I-gebundenen DI-Genom um ein *Copy-back-defective-interfering*-Genom handelt, das eine doppelsträngige *Trailer*-Region aufweist.

Aus dem Ergebnis der *Breakpoint*-Analyse lässt sich ein graphisches Modell für das DI-Genom entwickeln, das in Abbildung 17B dargestellt ist.

### **5.10 Sowohl antigenomische als auch genomische *Defective-interfering*-Genome binden an RIG-I**

Auch DI-Genome benötigen, um repliziert zu werden, einen Zwischenschritt. Nach Infektion einer Zelle durch die, abgesehen von der *Trailer*-Region, negativ orientierte, „genomische“ DI-RNA, muss diese zunächst in positiv orientierte, „antigenomische“ DI-RNA umgesetzt werden. Die Abbildungen 16, 17 und 18 zeigen eine überwiegende Anreicherung negativer, genomischer DI-Genom-RNA. Doch in Abbildung 17A deutet sich an, dass die Anreicherung von DI-RNA in beiden Orientierungen erfolgt ist, auch wenn die Anreicherung positiv orientierter RNA geringer ausfällt. Führt man die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten zusammen, bestätigt sich dies (Abbildung 19). Zur besseren Vergleichbarkeit der Experimente wurden die NGS-*reads* hier in 50 Nukleotid großen Fenstern auf das Referenzgenom aligniert und der relative, prozentuale Anteil aller Sequenzen eines Fensters in Bezug auf alle VSV-Sequenzen der gleichen Bedingung des gleichen Experiments berechnet. Dies erfolgte getrennt für positiv und negativ orientierte Sequenzen.



**Abbildung 19 - Relative Anreicherung auf 50 Nukleotid-große Fenster**

FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen (Negativkontrolle) wurden für 24 Stunden Tetrazyklin-induziert (1 µg/ml) und für 9 Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Die Lysate wurden mit Anti-FLAG-*beads* immunpräzipitiert. Aus den Eluaten der IP wurde RNA isoliert und cDNA-Bibliotheken erstellt. Die cDNA-Bibliotheken wurden mit dem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzen wurden in 50 Nukleotide großen Fenstern auf die cRNA-Sequenz des VSV-Genoms aligniert. Der relative Anteil der in einem der 50-Nukleotid-Fenster alignierenden Sequenzen in Bezug auf die Gesamtzahl aller an die VSV-Referenz alignierenden Sequenzen wurde berechnet. Die Ergebnisse der Bedingung, in der FLAG-RIG-I-exprimierende Zellen verwendet wurden, wurde auf die der Negativkontrolle normalisiert („relative Anreicherung“). Die Analyse folgte getrennt für in **(A)** positiver (grün) und **(B)** negativer (rot) Orientierung alignierende Sequenzen. Unter der x-Achse ist das Genom von VSV schematisch dargestellt. Die *Leader*- und die *Trailer*-Region sind nicht maßstabsgetreu. Da die Referenzsequenz 11.161 nt lang ist, wurde die Fensterung nur bis zur Position 11.150 vorgenommen und die coverage der letzten 11 Nukleotide in der Analyse außer Acht gelassen. Die gestrichelte Linie stellt den Wert  $y = 1$  dar. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung zweier unabhängiger Experimente.



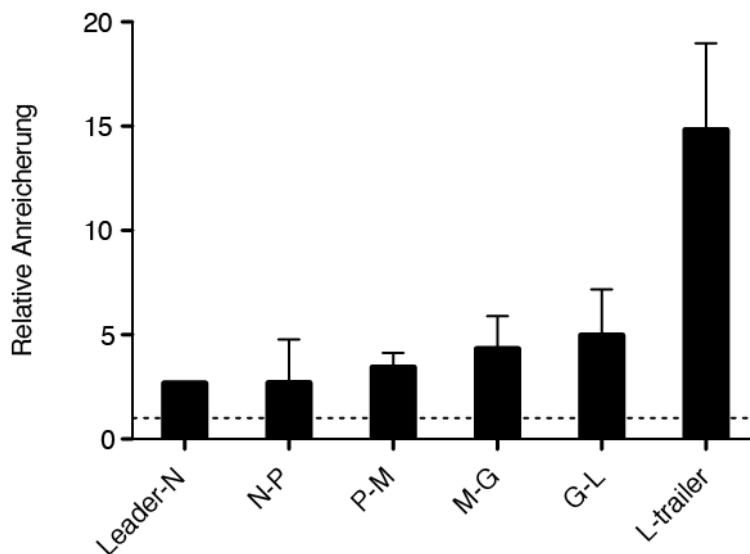
Es bestätigt sich, dass das DI-Genom in beiden Orientierungen angereichert ist. Dabei ist es nicht verwunderlich, dass sowohl genomische als auch antigenomische DI-RNA von RIG-I erkannt werden kann. Der doppelsträngige Anteil, die *Trailer-Region*, unterscheidet sich nicht zwischen den beiden RNAs. Einzig die Häufigkeit der beiden RNAs differiert im Lauf der viralen Replikation. Ganz zu Anfang steht wenig genomische DI-RNA zur Verfügung. Dann folgt die Transkription in antigenomische DI-RNA. Hierbei dient der „unnatürliche“ *Trailer-L-Übergang* um den *breakpoint* an Position 6496 als Promotor für die Polymerase.

Beim Volllängen-Genom wäre der Promotor für die Synthese des Antigenoms die *Leader-Region*. Ausgehend vom *L-trailer-Übergang* am Ende der antigenomischen DI-RNA wird dann wieder genomische DI-RNA produziert. Die *Leader-Region* gilt im Vergleich zur *Trailer-Region* als schwächerer Promotor, weshalb mehr genomische als antigenomische RNA entsteht. Es erscheint nicht unwahrscheinlich, dass der „unnatürliche“ *Trailer-L-Übergang* im Gegensatz zur physiologischen *L-trailer-Region* ebenfalls ein eingeschränkter Promotor ist. Deshalb ist es plausibel, dass es in einer DI-infizierten Zelle tendenziell mehr genomische, als antigenomische DI-RNA gibt. Das Verhältnis der beiden RNAs ist dabei wohl abhängig vom Zeitpunkt der Infektion. Nach neun Stunden steht offensichtlich mehr genomische DI-RNA für RIG-I zur Bindung zur Verfügung.

Interessanterweise ist in einem der Experimente auch die *Leader-Region*, bzw. die *Leader-N-Region* in positiver Orientierung angereichert (Abbildung 19). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Volllängen-Genom in dem Moment von RIG-I erkannt wird, in dem die *Leader-RNA* transkribiert wird. Zu diesem Zeitpunkt besteht ein intermolekularer Doppelstrang zwischen positiv orientiertem *Leader-Transkript*, das gleichzeitig die 5'-Triphosphat-Gruppe liefert, und dem negativ orientierten Volllängen-Genom. Vorstellbar ist, dass die *Leader-N-read-through-Produkte* aufgrund ihrer Größe einen stabileren Doppelstrang bilden als die kürzere *Leader-RNA*.

## 5.11 Das VSV-Volllängen-Genom bindet an RIG-I

In Abbildung 17A und 18D zeigt sich, dass neben dem DI-Genom auch das Volllängen-Genom in der Immunpräzipitation von RIG-I angereichert ist. Um das zu bestätigen, wurde die Anreicherung von Genom-spezifischen Sequenzen innerhalb der cDNA Bibliotheken untersucht. Eine solche Genom-spezifische Sequenz deckt entweder den Bereich zwischen zwei Genen oder den Bereich zwischen einem Gen und einer nicht Protein-kodierenden Region (*leader* oder *trailer*) ab und hat eine negative Orientierung. Intergenische Sequenzen mit einer positiven Orientierung können hingegen antigenomischen Ursprungs sein oder durch mRNA-*read-through*-Produkte erklärt werden.



**Abbildung 20 - Relative Anreicherung negativ orientierter, intergenischer Bereiche als Marker für die Anreicherung des Volllängen-Genoms**

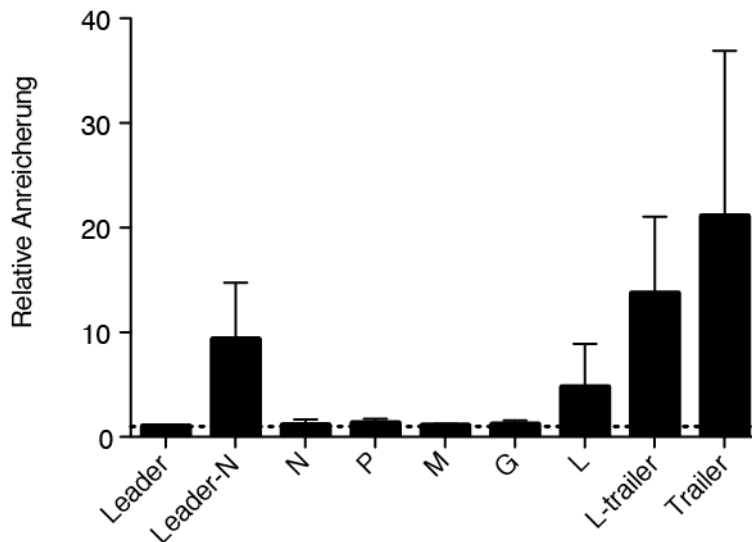
FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen wurden für 24 Stunden Tetrazyklin-induziert (1 µg/ml) und für neun Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Die Lysate wurden mit Anti-FLAG-*beads* immunpräzipitiert. Aus den Eluaten der IP wurde RNA isoliert und cDNA-Bibliotheken erstellt. Die cDNA-Bibliotheken wurden parallel mit dem Illumina Genome Analyzer sequenziert. Die Sequenzen wurden auf die cRNA-Sequenz des VSV-Genoms aligniert. Die cDNA-Bibliothek aus der IP der FLAG-RIG-I-exprimierenden Zellen, so wie aus der IP der nicht FLAG-RIG-I-exprimierenden Negativkontrolle wurden auf Sequenzen untersucht, die intergenische Bereiche abdecken. Abgebildet ist die relative Anreicherung der negativ orientierten, intergenischen Sequenzen zwischen diesen beiden Bedingungen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten. Für *Leader-N* konnte in einem der Experimente keine Sequenz mit dieser Eigenschaft in der Negativ-Kontrolle detektiert werden, so dass keine relative Anreicherung berechnet werden konnte und für diesen Bereich nur die Daten aus einem Experiment dargestellt sind. Die Daten für *Leader-N* sind bereits in Abbildung 18 D dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt den Wert  $y = 1$  dar.

Betrachtet man die relative Anreicherung negativ orientierter, intergenischer Sequenzen, so zeigt sich, dass diese mit Ausnahme der *L-trailer*-Region geringfügig, aber relativ gleichmäßig angereichert sind. Daraus lässt sich schließen, dass auch das VSV-Volllängen-Genom an RIG-I bindet. Die im Vergleich dazu stärkere Anreicherung der *L-trailer*-Region kann hingegen mit der Assoziation des DI-Genoms mit RIG-I erklärt werden. Demnach ist das DI-Genom stärker angereichert als das Volllängen-Genom. Dass lässt sich einerseits dadurch erklären, dass das DI-Genom durch seinen Replikationsvorteil häufiger in der infizierten Zelle vorkommt. Andererseits stellt das DI-Genom mit seiner *Panhandle*-Struktur und seiner doppelsträngigen *Trailer*-Region einen nahezu optimalen RIG-I Liganden dar.

## **5.12 Die spezifische Anreicherung viraler RNA-Sequenzen in der qRT-PCR bestätigt die *Next-generation-sequencing*-Ergebnisse**

Um die Anreicherung viraler RNAs in der Immunpräzipitation von RIG-I mit einer unabhängigen Methode zu verifizieren, wurde die RNA mittels qRT-PCR analysiert. Wider Erwarten konnte nach der Immunpräzipitation von FLAG-RIG-I auch HPRT-RNA im Eluat nachgewiesen werden. Da der Nachweis auch in drei Kontrollbedingungen erfolgte, kann man von einer unspezifischen Bindung ausgehen. Nur in der Bedingung, in der IgG-Kontroll-*beads* verwendet wurden, wichen die Cp-Werte von HPRT um mehr als zwei Zyklen ab. Daraus kann geschlossen werden, dass die unspezifische Bindung von den verwendeten *beads* abhängt. Auch im NGS hatte sich gezeigt, dass die unspezifisch an die FLAG-*beads* bindenden viralen mRNAs in der IgG-Bedingung nicht nachgewiesen werden konnten (Abbildung 18C). In allen Bedingungen, in denen anti-FLAG-*beads* verwendet wurden, erfolgte eine annähernd gleichmäßige Aufreinigung von HPRT-mRNA. Diese ermöglichte es, die spezifische Anreicherung der viralen RNAs auf die unspezifische HPRT-mRNA zu beziehen, um die Bedingungen vergleichen zu können. Wie auch in den NGS-Daten, zeigte sich, dass die relativ angereicherten RNAs nicht die absolut häufigsten waren. Erst durch die Bildung des Quotienten der Kopien/HPRT-Werte zwischen der Bedingung

FLAG-RIG-I und der Negativkontrolle ohne FLAG-RIG-I-Expression, kommen die angereicherten RNAs zu Darstellung. Analog zu der Analyse der NGS-Daten wurde dieser Quotient als relative Anreicherung bezeichnet.



**Abbildung 21 - *Leader-N*-, *L*- und *Trailer*-Sequenzen sind im Eluat der FLAG-RIG-I IPs angereichert**

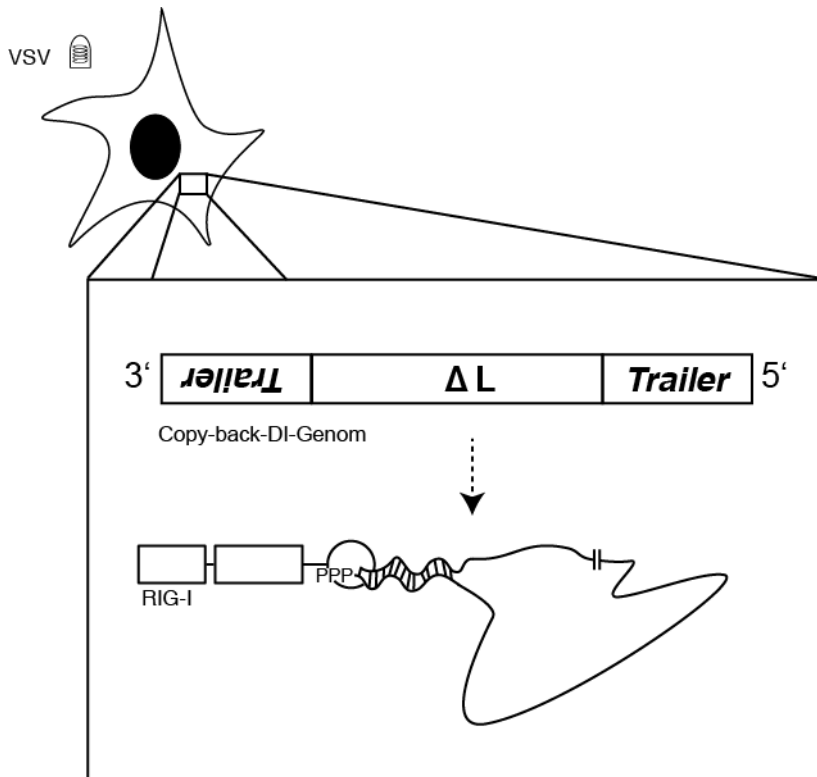
FLAG-RIG-I-Zellen und Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen (Negativkontrolle) wurden für 24 Stunden Tetrazyklin-induziert (1 µg/ml) und für neun Stunden mit VSV (MOI=1) infiziert. Die Lysate wurden mit Anti-FLAG-*beads* immunpräzipitiert. Nach RNA-Isolation aus den Eluaten der IP erfolgte der Umschrieb in cDNA mit Random Hexamer Primern und *Leader*-RT-Primer. Mittels qRT-PCR wurden die verschiedenen viralen RNAs gemessen und auf HPRT normalisiert. Abgebildet ist das Verhältnis der Kopien/HPRT Werte zwischen der Anti-FLAG-IP in Lysaten von FLAG-RIG-I-Zellen und der Anti-FLAG-IP in Lysaten von Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen, die kein FLAG-RIG-I exprimieren. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus einem (*leader*, M, G,) bzw. zwei (*L*, *L-trailer*) oder drei (*Leader-N*, N, P, L2, *trailer*) unabhängigen Experimenten.

Das Muster der relativen Anreicherung bestätigt im Wesentlichen die NGS-Daten. Die Anreicherung in den Assays, die das L-Gen, die *Trailer*-Region oder die Gengrenze zwischen L und *trailer* abbilden, lässt sich durch das DI-Genom erklären. Die höhere Anreicherung der *Trailer*-Region im Vergleich zum L-Gen entsteht zum einen dadurch, dass die *Trailer*-Region im DI-Genom doppelt vorliegt. Zum anderen weist der Assay für L auch L-mRNA nach. Nach den NGS-Daten ist diese jedoch nicht angereichert, und schwächt damit den Effekt der Anreicherung aller RNAs, die die L-Sequenz enthalten, ab. Die *L-trailer*-Region ist im Gegensatz zur *Trailer*-Region nur einmal in der DI-Genom RNA und – abgesehen von möglichen *Read-through*-Produkten – gar

nicht in der mRNA enthalten. Das erklärt, warum die Anreicherung des *L-trailer*-Assays zwischen der Anreicherung für L und der für *trailer* liegt. Die qRT-PCR ist nicht Strang-spezifisch, so dass nicht zwischen genomischer und antigenomischer DI-RNA unterschieden werden kann. Die Anreicherung des Vollängen-Genoms, wie sie sich in den NGS-Daten andeutet, verschwindet vermutlich ebenfalls hinter der großen Menge nicht angereicherter mRNAs. Interessanterweise ergibt sich auch in den qRT-PCR-Daten eine Anreicherung für die Gengrenze zwischen dem *Leader*-Bereich und dem N-Gen. Der spezielle Assay, der ausschließlich *Leader*-RNA nachweisen sollte, zeigt hingegen keine Anreicherung. Dieser Assay ist allerdings aufgrund seines speziellen Umschriebs nur eingeschränkt mit den anderen Assays zu vergleichen.

## 6. Diskussion

### 6.1 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse



**Abbildung 22 - Das zentrale Ergebnis dieser Arbeit: VSV bildet ein Panhandle-DI-Genom, das von RIG-I erkannt wird**

Erläuterungen im Text

Die hier vorliegende Arbeit implementiert eine Methode, mit der sich RIG-I-Liganden aus VSV-infizierten Zellen aufreinigen lassen und beschreibt diese Liganden näher. Zunächst untersucht die Arbeit in Zellkulturexperimenten die Kinetik des Entstehens immunstimulatorischer RNAs und der daraus resultierenden Immunantwort nach Infektion mit VSV. Daraus leitet sie den Zeitpunkt neun Stunden nach Infektion als geeignet für die Aufreinigung von möglichst frühen RIG-I-Liganden ab (Abbildung 7). Aus der Dynamik des Auftretens immunstimulatorischer RNA ergibt sich zudem der Hinweis, dass der entscheidende RIG-I-Stimulus erst durch Replikation entsteht oder vermehrt werden muss. Dies wird durch die Abhängigkeit des Auftretens immunstimulatorischer RNA von intakter Synthese viraler Proteine bestätigt (Abbildung 8). Die Immunpräzipitation von FLAG-getagtem RIG-I erlaubt die

Rückgewinnung von RIG-I-gebundener immunstimulatorischer RNA (Abbildung 11). Diese RNA ist doppelsträngig und trägt eine 5'-Triphosphat-Gruppe (Abbildung 12). Durch eine *Next-generation-sequencing*-Analyse dieser RIG-I-assoziierten RNA, zeigt sich, dass VSV ein 4719 Nukleotide großes DI-Genom bildet, das mit hoher Affinität an RIG-I bindet (Abbildungen 16-19). Auch das VSV-Vollängen-Genom bindet an RIG-I (Abbildung 20). Hierbei liegt möglicherweise ein Doppelstrang mit *Leader-N-read-through*-RNA vor. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine qRT-PCR-Analyse der immunpräzipitierten RNA bestätigen (Abbildung 21).

## 6.2 Folgedaten im Promotionsprojekt von Viktoria Bothe

Das hier vorliegende Projekt wurde im Rahmen des Promotionsprojekts von Viktoria Bothe fortgesetzt. Die Tatsache, dass das durch die *Next-generation*-Sequenzierung identifizierte DI-Genom eine im Vergleich zu den übrigen VSV-RNA-Spezies einzigartige Sequenz an der Stelle des *breakpoints* an Position 6496 besitzt, erlaubte das Design eines qRT-PCR-Assays, der spezifisch dieses DI-Genom nachweist. Dadurch konnte bestätigt werden, dass DI-RNA in der Immunpräzipitation von FLAG-RIG-I angereichert ist. Zudem lässt sich das DI-Genom durch Passage mit sehr niedriger MOI aus Virus-Stocks herausverdünnen. Dies lässt sich durch den qRT-PCR-Assay nachvollziehen. Nach fünf Passagen mit niedriger MOI ist die Erkennung der so entstandenen DI-Genom-depletierten Virus-Population durch RIG-I stark eingeschränkt. Die Zellen, die mit den DI-armen Virus-Stammlösungen infiziert werden, produzieren deutlich weniger IFN- $\beta$ -mRNA. Nach 24 Stunden Infektion lässt sich über die Hälfte weniger immunstimulatorische RNA aus diesen Zellen isolieren. Zudem bestätigte sich, dass die Replikation von DI-RNA durch Cycloheximid geblockt werden kann.

Lädt man die RNA aus VSV-infizierten Zellen auf ein Agarose-Gel, so wandert die DI-RNA in der erwarteten Größenfraktion von 4000 bis 6000 Nukleotiden. Durch Re-Transfektion der einzelnen Fraktionen dieser nach der Größe aufgetrennten RNA in 1205LU-Zellen bestätigt sich, dass diese Fraktion auch den größten Anteil an immunstimulatorischer RNA ausmacht. Allerdings ist auch die Fraktion, die RNA

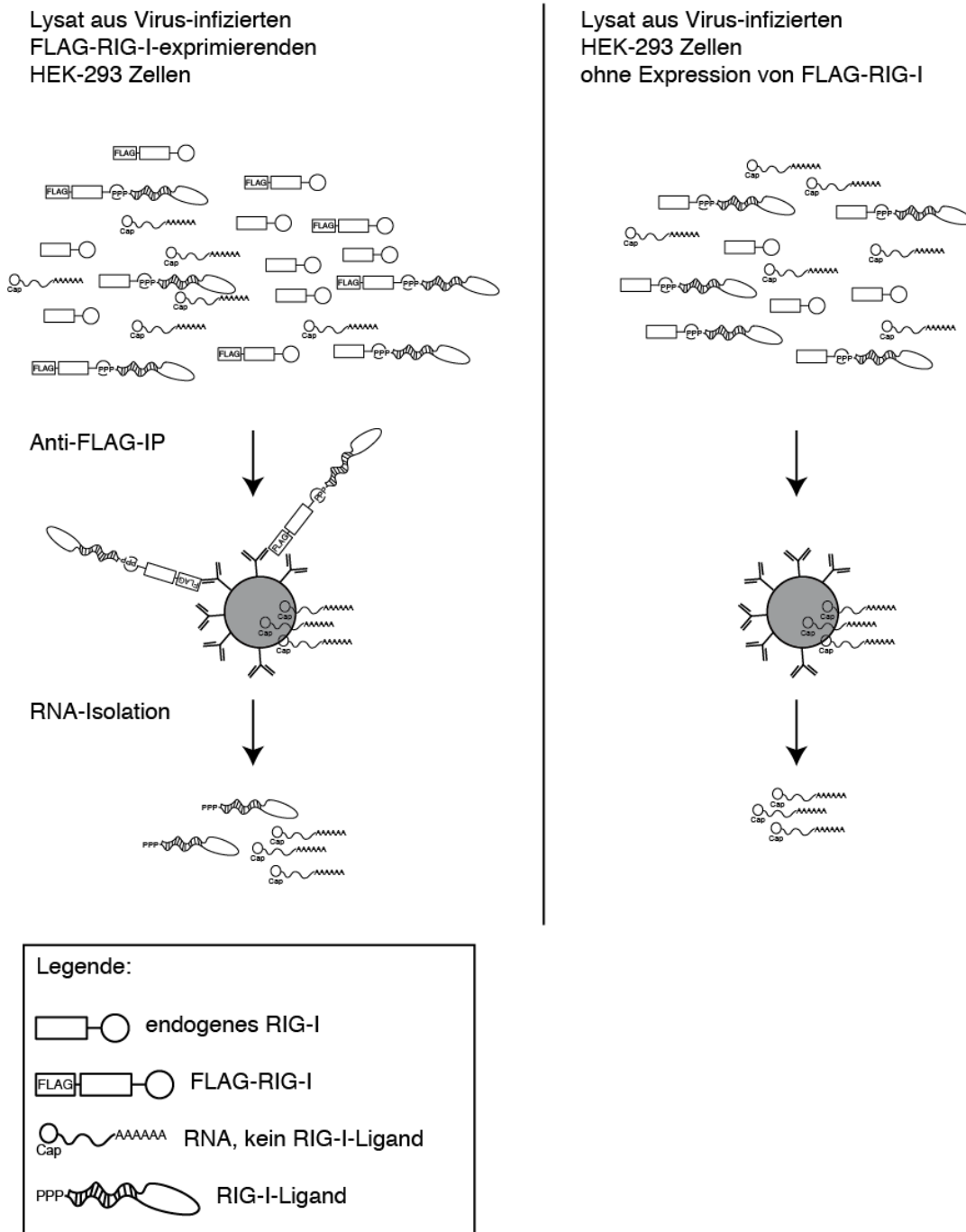
größer als 10.000 Nukleotide enthält, immunstimulatorisch. Die einzige RNA dieser Größe in VSV-infizierten Zellen ist das Volllängen-Genom, das sich dadurch als RIG-I-Ligand bestätigt. In den DI-armen Virus-Populationen ist es dann auch hauptsächlich RNA dieser Größe, die immunstimulatorisch aktiv ist. Vergleicht man die in RIG-I-assoziiierter RNA angereicherten Sequenzen von Zellen, die mit DI-armen und mit DI-reichen Stocks infiziert wurden, so zeigt jedoch einzig der *Leader-N*-Assay in der Infektion mit DI-armen Stocks in der qRT-PCR eine Anreicherung. Der *Leader-N*-Assay erkennt theoretisch das Volllängen-Genom, das Antigenom, sowie *Leader-N-read-through*-RNA. Der Assay ist damit relativ Genom-spezifisch und wird damit nicht übermäßig durch die unspezifisch bindenden mRNAs beeinflusst. Eine Anreicherung in diesem Bereich liefert damit ein Argument, dass RIG-I in DI-armen Virus-Populationen tatsächlich das Volllängen-Genom erkennt.

### **6.3 Problematik der unspezifischen RNA-Bindung in RIG-I-Immunpräzipitationen**

Es widerspricht den Erwartungen, dass die in der RIG-I IP im Vergleich zur Kontrolle am stärksten angereicherten Sequenzen in der *Next-generation*-Sequenzierung in absoluten Zahlen nicht die häufigsten sind: Die mRNAs sind für die meisten Sequenzen verantwortlich. Sie sind jedoch nicht angereichert, d. h. in der RIG-I-assoziierten und der aus der Kontroll-Bedingung isolierten RNA in gleichem Maße vorhanden. Das verdeutlicht, wie problematisch unspezifische Interaktionen bei IPs trotz mehrerer Waschschriffe und eines *Preclearing*-Schritts sind, insbesondere, wenn das Ergebnis mit einer so hoch sensitiven Methode, wie dem NGS analysiert wird. Zudem fällt auf, dass nicht, wie erwartet, eine Positiv-Selektion von RIG-I-Liganden in der FLAG-RIG-I-exprimierenden Bedingung stattgefunden hat. Vielmehr zeigt sich eine Negativ-Selektion von RIG-I-Liganden in der nicht FLAG-RIG-I-exprimierenden Negativkontrolle. Die beiden Bedingungen unterscheiden sich im Ergebnis in erster Linie durch die Abwesenheit von DI-RNA in der Negativkontrolle, während sich DI-RNA auch in Gesamt-RNA nachweisen lässt. Bedenkt man, dass in beiden



Bedingungen noch das endogene RIG-I aktiv ist, so lässt sich die Negativ-Selektion durch folgende Überlegung erklären:



**Abbildung 23 - Negativselektion von RIG-I-Liganden in der Immunpräzipitation**

Erläuterungen im Text

RIG-I hat eine sehr hohe Affinität zu seinen Liganden (Gerlier et Lyles 2011). Wenn

man annimmt, dass RIG-I im Überschuss vorliegt und alle potentiellen Liganden auch wirklich bindet, dann sind diese in der experimentellen Bedingung auf FLAG-RIG-I und auf endogenes RIG-I verteilt. In der Negativkontrolle sind alle Liganden an endogenes RIG-I gebunden. Die RIG-I-Liganden stehen damit nicht für die unspezifische Bindung von RNA an die Anti-FLAG-*beads* zur Verfügung. Sie können also nur in der FLAG-RIG-I-exprimierenden Bedingung aufgereinigt werden. In der Negativkontrolle werden sie negativ selektioniert. Dass durch die Methode nicht alle RIG-I-Liganden positiv selektioniert werden, ist auch daran erkennbar, dass im Überstand der IP weiterhin immunstimulatorische RNA nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt). Der Überstand wird also nicht vollständig depletiert. Trifft die Überlegung zu, so wäre davon auszugehen, dass die im Überstand verbleibende immunstimulatorische RNA vollständig an das nicht immunpräzipitierte endogene RIG-I gebunden ist (Abbildung 23).

## 6.4 Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

### 6.4.1 Der RIG-I-Ligand in VSV-infizierten Zellen erfüllt die in der Literatur beschriebenen strukturellen Charakteristika eines RIG-I-Liganden: Doppelsträngigkeit und 5'-Triphosphat

Die minimalen Voraussetzungen eines RIG-I-Liganden wurden in den letzten Jahren intensiv mit vornehmlich synthetisch hergestellten RNAs untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass RIG-I 5'-Triphosphat-Modifikationen von RNA in unmittelbarer Nachbarschaft eines doppelsträngigen Bereichs erkennt (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006; Schlee et al. 2009; Schmidt et al. 2009). Interessanterweise beruht die Entdeckung, dass RIG-I dsRNA erkennt, auf der Tatsache, dass die üblicherweise zur Synthese von triphosphorylierter ssRNA im Prozess der *in vitro*-Transkription verwendete T7-Polymerase fehlerhaft arbeitet und ungewollt *stem-loop*-enthaltende RNA-Beiprodukte generiert (Schmidt et al. 2009). Dieser Prozess läuft dabei ähnlich ab, wie die Entstehung von DI-Genomen durch die Polymerasen der *Mononegavirales*.

Es stellt sich also die Frage, wo in VSV-infizierten Zellen dsRNA ihren Ursprung hat?

Entgegen der von Weber et al. publizierten Beobachtung, dass in mit ssRNA-Viren infizierten Zellen keine dsRNA > 40 BP nachweisbar ist (Weber et al. 2006), ist der Nachweis doppelsträngiger RNA in VSV-infizierten Zellen bei Kato et al. beschrieben (Kato et al. 2008). Mit dem Anti-dsRNA-Antikörper J2 lassen sich VSV-infizierte Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie anfärben. Kato et al. konnten zeigen, dass diese RNA etwa 2,2 Kilobasen groß ist. Diese Größe entspricht ziemlich genau dem DI-T-Partikel (Tabelle 1). Erklärt man die Anwesenheit von dsRNA mit einem DI-Genom, bedeutet das, dass DI-Genome in VSV-infizierten Zellen doppelsträngige Bereiche ausbilden, die bei der Färbung von Zellen von einem Antikörper erkannt werden können. Laut Gerlier und Lyles liegt die Nachweisgrenze des J2-Antikörpers bei 40 bis 50 Nukleotiden (Gerlier et Lyles 2011). Der DI-T-Partikel hat einen doppelsträngigen Bereich von 45 Nukleotiden. Das bedeutet, dass der doppelsträngige Bereich des DI-Genoms nahezu vollständig erkennbar sein muss. Wenn dieser dsRNA-Abschnitt der Erkennung durch einen Antikörper zugänglich ist, so ist es naheliegend, dass er auch von RIG-I erkannt werden kann.

Interessanterweise weisen Kato et al. diese dsRNA frühestens nach neun Stunden nach. Das ist genau der Zeitpunkt, zu dem in der hier vorliegenden Arbeit zum ersten Mal immunstimulatorische RNA in ausreichender Menge isoliert werden konnte (Abbildung 7).

Neben dem absolut notwendigen Kriterium der Doppelsträngigkeit, erfüllt der RIG-I-Ligand in VSV-infizierten Zellen auch das Kriterium der 5'-Triphosphatgruppe. Dies gilt nicht nur, wenn man die Gesamt-RNA aus VSV-infizierten Zellen enzymatisch verdaut (Kato et al. 2008; Schmidt et al. 2009), sondern auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, für RNA aus RIG-I-IPs (Abbildung 11).

Eine neuere Studie zeigt, dass auch eine 5'-Diphosphatgruppe, wie sie in *Reovirus*-Genomen vorkommt, ausreichend ist, um RIG-I zu aktivieren (Goubau et al. 2014). Alle VSV-RNAs mit Ausnahme der 5'-Cap-modifizierten mRNAs sind in der Literatur als 5'-Triphosphat-RNAs beschrieben. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der Beitrag von 5'-Diphosphat-RNA in VSV-infizierten Zellen vernachlässigbar ist. Die in dieser Arbeit verwendete 5'-Polyphosphatase würde sowohl 5'-Diphosphat-, als auch

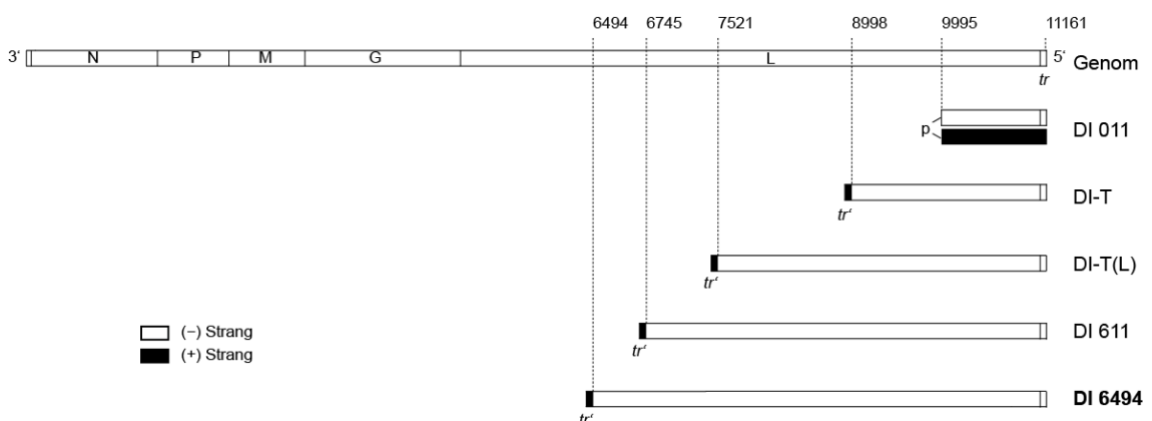
5'-Triphosphat-RNA dephosphorylieren und ist damit zu genauer Unterscheidung nicht geeignet.

Nachdem DI-Genome die wahrscheinlichste Quelle von dsRNA in VSV-infizierten Zellen sind, soll beleuchtet werden, inwieweit für diese immunstimulatorische Eigenschaften beschrieben sind.

Auf andere, mögliche Quellen doppelsträngiger RNA in VSV-infizierten Zellen, wie etwa an das Genom angelagerte *Trailer*-RNA oder auf sich selbst zurückfaltende *Leader-N-read-through*-RNA soll weiter unten eingegangen werden.

#### 6.4.2 Replizierende *Defective-interfering*-Genome werden von RIG-I erkannt

Bereits 1977 konnte gezeigt werden, dass DI-Genome von VSV Interferon induzieren (Marcus et Sekellick 1977). Allerdings entspricht das von Marcus et Sekellick untersuchte DI 011 (Abbildung 24) mit seiner vollständigen Komplementarität und der daraus resultierenden Doppelsträngigkeit über 2334 Nukleotide eher einem MDA5-Liganden (Kato et al. 2006).



**Abbildung 24 – Copyback- und Snapback-DI-Genome im Vergleich**

Dargestellt sind die bisher publizierten *Copyback*- und *Snapback*-DI-Genome von VSV, sowie das in dieser Arbeit identifizierte DI Genom 6494. Abbildung modifiziert aus (Meier et al. 1984).

Die *Copy-back*-DI-Genome von VSV (Abbildung 24) oder Sendai-Virus mit ihren mutmaßlich basengepaarten, komplementären *Trailer*-Regionen am 5'- und 3'-Ende gleichen da schon eher RIG-I-Liganden.

Aus der Kinetik in Abbildung 7 geht hervor, dass immunstimulatorische RNA nicht von Anfang an in VSV-infizierten Zellen vorhanden ist, sondern erst über die Zeit im Lauf des Replikationszyklus entsteht. Auch die Tatsache, dass immunstimulatorische RNA nur bei intakter Translation viraler Proteine entsteht, deutet auf eine Abhängigkeit von der Replikation hin. Die gleiche Beobachtung wurde bereits von einer anderen Gruppe beschrieben. TenOever et al. verwenden als Maß für die Aktivierung des IFN-Systems das Auftreten der phosphorylierten Formen von IRF3 und die Induktion von ISGs (tenOever et al. 2004).

Geht man davon aus, dass die Hauptquelle immunstimulatorischer RNA in VSV-infizierten Zellen DI-Genome sind, dann müssten nach den oben beschriebenen Daten auch diese erst repliziert werden, um RIG-I zu aktivieren.

Eine Studie aus dem Jahr 2010 bestätigt diese Beobachtung: Das *Copy-back*-DI-Genom DI-T ist nur dann in der Lage den IFN-Promotor zu aktivieren, wenn es repliziert wird (Panda et al. 2010). Panda et al. beobachten in HEK293-Zellen, die stabil die drei für die Replikation nötigen Proteine – N-, P- und L-Protein – exprimieren, Folgendes:

1. Die ISG-Induktion ist nicht nur von der Anwesenheit der viralen RNA sondern auch aller drei der für die Replikation nötigen viralen Proteine N, P und L abhängig
2. Die Aktivierung von ISGs kann erst zwei Stunden nach Infektion mit DI-T-Virionen nachgewiesen werden.

Dass die Interferon-Produktion im Gegensatz zu der Kinetik, die in Abbildung 7 dargestellt ist, früher startet, lässt sich dadurch erklären, dass in diesem Modell - im Gegensatz zu einer natürlichen Infektion - die Proteine, die für die Replikation nötig sind, nicht erst translatiert werden müssen, sondern bereits zum Zeitpunkt der Infektion in der Wirtszelle vorhanden sind.

Die naheliegendste Erklärung, warum DI-Genome nur, wenn sie repliziert werden, immunstimulatorisch sind, ist, dass RIG-I nur dann aktiviert wird, wenn eine

ausreichend hohe, überschwellige Menge als fremd klassifizierter RNA in der Zelle vorhanden ist. Und tatsächlich zeigen tenOever et al., dass die IRF3-Phosphorylierung bei einer VSV-Infektion mit einer MOI von 100 bereits nach vier Stunden, bei einer MOI von 10 aber erst nach acht Stunden nachweisbar ist. Jedoch wird auch bei einer so hohen MOI nicht die gleiche Geschwindigkeit der IRF3-Phosphorylierung erreicht, wie wenn man nackte dsRNA in Zellen transfiziert. Nach Transfektion des synthetischen RNA-Analogon *poly(I:C)* wird IRF3 bereits in der ersten Stunde phosphoryliert. Transfiziert man hingegen aufgereinigte RNPs von VSV, so ist auch dann erst vier Stunden nach Transfektion die IRF3-Phosphorylierung nachweisbar. (tenOever et al. 2004)

Um den Unterschied in der Kinetik nach Transfektion von RNPs bzw. nackter dsRNA zu erklären, ist es denkbar, dass die Proteinverpackung des Genoms und der DI-Genome der Erkennung der RNA durch RIG-I im Weg steht. So ist es vorstellbar, dass, nur wenn die Polymerase transkriptionell aktiv ist, sich das RNP so weit öffnet, dass die darin verborgene RNA von RIG-I erkannt werden kann.

Im Widerspruch zu diesem Erklärungsversuch steht die folgende Beobachtung aus der bereits oben erwähnten Arbeit von tenOever et al. Das RNP von VSV, das vier Stunden nach Transfektion zur IRF3-Phosphorylierung führt, ist transkriptionell inert und in den transfizierten Zellen sind keine neu synthetisierten viralen Proteine nachweisbar. RNPs sind auch in der Anwesenheit von CHX noch immunstimulatorisch (tenOever et al. 2004).

Ein anderer Erklärungsansatz besteht darin, dass die Transfektion von Protein-RNA-Komplexen wie RNPs, weniger effizient oder langsamer abläuft und somit zu einer Verzögerung in der messbaren IRF-Phosphorylierung führt.

Interessanterweise wurde für die ebenfalls zu den *Mononegavirales* gehörenden Mumpsviren und Paramyxoviren 5 (PIV5) - bzw. einer Mutante von PIV5, bei der das Interferon-antagonisierende V-Protein dysfunktional ist (PIV5-V $\Delta$ C) - gezeigt, dass die Interferon-Antwort in infizierten Zellen mit der Anwesenheit von DI-Genomen korreliert (Chen et al. 2010; Killip et al. 2011). Dabei reagieren in einem infizierten Zell-*monolayer* nur ein Teil der infizierten Zellen mit einer IFN-Produktion, wahrscheinlich diejenigen, in die ein DI-Genom gelangt ist (Chen et al. 2010). Es wurde auch gezeigt, dass Infektionen mit DI- reichen Virus-Stocks zur Interferon-

Induktion und zur relativ geringen Synthese viraler Proteine führen, während Infektionen mit DI-armen Virus-Stocks zu wenig Interferon-Induktion und zu viel viraler Protein-Synthese führen (Killip et al. 2012). Das gilt sowohl für das Wildtyp-Virus PIV5 als auch PIV5-V $\Delta$ C (Killip et al. 2013). Die Synthese viraler Proteine korreliert nach Aussage der Autoren nicht positiv mit der Interferon-Induktion, und damit auch nicht mit der Replikation. Die Autoren gehen davon aus, dass DI-Genome auch dann den Interferon-Signalweg aktivieren, wenn sie die Zelle in Abwesenheit eines Virus mit einem Vollängen-Genom infizieren. Die Arbeit zeigt deutlich, dass DI-reiche Virusstocks von PIV5, Sendai-Virus und Mumpsvirus auch in der Anwesenheit von CHX den IFN-Promotor aktivieren, während bei Infektionen mit DI-armen Stocks die virale Proteinsynthese für die IFN-Induktion nötig ist.

Dies legt einerseits nahe, dass die von tenOever et al. aufgereinigten VSV-RNPs ebenfalls DI-Genome enthalten, andererseits, dass in dieser Arbeit (Abbildung 8) verhältnismäßig wenig DI-Genome zu Beginn der Infektion in die Zellen gelangten, und deshalb sehr wohl eine Abhängigkeit der Entstehung immunstimulatorischer RNA von intakter viraler Proteinsynthese bestand. Killip et al. zeigen, dass in Infektionen mit DI-reichen Stocks, in denen CHX keinen Einfluss auf die Immunstimulation hat, für jede Kopie des Vollängen-Genoms für PIV5 19 Kopien *Copy-back*-DI-Genome und für PIV5-V $\Delta$ C 59 Kopien *Copy-back*-DI-Genome vorlagen. Für das Sendai-Virus ist beschrieben, dass in der Gesamt-RNA infizierter Zellen ein spezifisches *Copy-back*-DI-Genom nach vier Stunden Infektion 34% und nach 24 Stunden 95% aller viralen RNAs ausmacht (Baum et al. 2010).

Wie in Kapitel 5.7 beschrieben, liegt für VSV nach 9 Stunden das Verhältnis zwischen DI-Genom und Vollängen genom bei knapp 6, wobei der überwiegende Anteil viraler RNA auf mRNAs zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass im VSV-Stock, der als Ausgangsstock für diese Arbeit verwendet wurde, der Anteil an DI-Genomen relativ gering ist. Dies erklärt, warum die Entstehung immunstimulatorischer RNA durchaus durch CHX inhibiert werden kann.

Es gibt noch eine weitere Arbeit, die den Einfluss von CHX auf die Immunstimulation in VSV-infizierten Zellen zeigt (Weber et al. 2013). Weber et al. beobachten für VSV, aber auch für einige andere Viren, dass IFN- $\beta$ -mRNA unabhängig von der Anwesenheit von CHX nach 24 Stunden hochreguliert wird. Das steht in unmittelbarem Widerspruch

zu den Daten in Abbildung 8 und auch zu den Beobachtungen von tenOever et al (tenOever et al. 2004). Erklärbar wäre dieses Ergebnis allerdings durch einen sehr hohen Anteil an DI-Genomen im VSV-Stock, der in der Arbeit von Weber et al verwendet wurde. Dies ist aber durch Weber et al. nicht weiter untersucht worden.

Die Gruppe um Killip et al. konnte die DI-Genome von PIV5 und PIV5-VΔC mittels NGS näher charakterisieren. Es handelt sich um eine heterogene Population von überwiegend *Copy-back*-DI-Genomen mit komplementärer Trailer-Region (Killip et al. 2013). Die DI-Genome von PIV5 und PIV5-VΔC sind dabei unterschiedlich. Die DI-Genom-Population von PIV5-VΔC wurde zu 62% von einem DI-Genom dominiert, das bereits zuvor mittels Reverser Transkription identifiziert worden war (Killip et al. 2011). Es ist 1427 Nukleotide lang und hat einen 223 Basenpaare langen Doppelstrang.

In Wildtyp-PIV5-infizierten Zellen macht ein einziges DI-Genom 94% aller DI-Genome aus und ein zweites 5%. Ersteres ist 936 und zweiteres 966 Nukleotide lang. In einer anderen Arbeit konnte für das Sendai-Virus gezeigt werden, dass ein 546 Nukleotide langes *Copy-back*-DI-Genom mit einem 92 Basenpaaren langen *Trailer*-Doppelstrang an RIG-I bindet (Baum et al. 2010).

Die NGS-Analysen *Trailer*-enthaltender *Copy-back*-DI-Genomen für PIV5 (Killip et al. 2013), für Sendai (Baum et al. 2010) und für VSV in dieser Arbeit, zeigen, dass es jeweils dominierende DI-Genome gibt, die wiederum von RIG-I erkannt werden können. Das in dieser Arbeit identifizierte dominierende DI-Genom hat eine Länge von 4719 Nukleotiden.

Zusammenfassend scheint es sich zu bestätigen, dass Nukleokapside, bestehen sie nun aus Vollängen-Genomen oder aus DI-Genomen, in der Lage sind, RIG-I direkt zu binden und zu aktivieren. Die Aktivierung ist jedoch in Zellen, die nicht mit CHX behandelt wurden, deutlich stärker, da die aktivierenden Liganden repliziert werden. Wählt man eine ausreichend hohe MOI für die Infektion, so lässt sich gegebenenfalls auch in der Anwesenheit von CHX ein überschwelliges Signal auslösen. Ist der Gehalt an DI-Genomen in den zur Infektion verwendeten Virus-Stocks hoch oder transfiziert man konzentrierte RNPs, so ist auch in der Abwesenheit viraler Proteinsynthese ausreichend immunstimulatorische RNA vorhanden. Im Folgenden soll beleuchtet werden, in wieweit die Proteinverpackung von RNA für RIG-I hinderlich ist.



### 6.4.3 Die Proteinverpackung von Genomen und *Defective-interfering*-Genomen als Hindernis für die Erkennung durch RIG-I

Die Struktur der RNPs von VSV zeigt eine dichte Verpackung: Die genomische RNA liegt in einer Tasche zwischen den zwei Domänen des N-Proteins. Die Basen der RNA sind dabei teilweise dem Protein zugewandt und stehen damit nicht für eine Basenpaarung zur Verfügung (Green et al. 2006). Für Transkription und Replikation muss sich die RNA demnach zumindest partiell vom N-Protein lösen. Ob dieser Moment reicht, damit sich eine Doppelsträngigkeit ausbildet, die dann wiederum von RIG-I erkannt wird, bleibt fraglich. Andererseits genügen RIG-I aufgrund seiner hohen Affinität möglicherweise bereits kleinste Abschnitte exponierter dsRNA.

Dazu passt hingegen ein neuerer Bericht, dass RIG-I tatsächlich im Stande ist, das verpackte Genom von RNA-Viren zu erkennen:

Weber et al. untersuchen die Aktivierung von RIG-I durch das zu den *Bunyaviren* gehörende *La Cross Virus* (LACV) (Weber et al. 2013). Dies ist ein Virus, dessen Transkription von intakter Translation abhängt, und bei dem deshalb davon ausgegangen wird, dass die einzige virale RNA in einer mit dem Translationshemmer CHX behandelten Zelle die genomische RNA ist. LACV-infizierte Zellen reagierten in dieser Arbeit allerdings auch noch in der Anwesenheit von CHX mit der Hochregulation von IFN- $\beta$ -mRNA. Für diese Viren konnte die Gruppe zudem eine von weiteren Kofaktoren unabhängige Interaktion zwischen RIG-I und dem LACV-N-Protein mittels Co-IP nachweisen. Mithilfe hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie zeigen sie auch, dass das LACV-Nukleokapsid eine ringförmige Struktur bildet, an deren Ende RIG-I kolokalisiert, wie ein Diamant auf einem Ring.

Ein *Defective-interfering*-Genom sollte jedoch auch in Nukleokapsid verpackt sein und das Auftauchen von VSV N-Protein in RIG-I-IPs wäre zu erwarten. Das N-Protein von VSV konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht in RIG-I-IPs nachgewiesen werden. Leider ist die Sensitivität des VSV-N Antikörpers im *Western blot* äußerst gering, wie sich in der Kinetik der VSV-Infektion zeigt (Abbildung 8). In bisher nicht publizierten Daten aus unserer Arbeitsgruppe konnte die Interaktion jedoch bereits mittels

Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Schmidt et al., unveröffentlicht).

Inwiefern die Verpackung des Genoms oder DI-Genoms durch das N-Protein eine Aktivierung von RIG-I verhindert, bzw. ob die 5'- und 3'-Enden viraler Genome vollständig verpackt sind, und ob diese Enden in der Lage sind, doppelsträngige Bereiche auszubilden, bleibt kontrovers. Zudem ist fraglich, ob für alle Viren gilt, dass die Erkennung der in Nukleokapsid verpackten Genome durch RIG-I ohne weitere Faktoren in der Wirtszelle möglich ist. Weber et al. zeigen dies immerhin für den River Valley Forest Virus, indem sie den RIG-I-Signalweg in *Drosophila*-Zellen rekonstruieren (Weber et al. 2013).

Eine ältere Arbeit aus der gleichen Gruppe zeigt, dass es Negativ-Strang-RNA-Viren gibt, die ein 5'-Monophosphat-Genom haben. Isoliert man genomische RNA direkt aus den Virionen dieser Viren, so sind diese nicht in der Lage den Interferon-Promotor zu aktivieren (Habjan et al. 2008). Habjan et al. zeigen dies für das nicht segmentierte *Borna disease virus* und die segmentierten Bunyaviridae: Hantavirus und *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*. Zwar trifft auch auf diese Daten der Vorwurf zu, dass sie aufgrund der RNA-Aufreinigung die Rolle der Proteinverpackung des Genoms außer Acht lassen. Dennoch scheint es plausibel, dass diese Viren eine 5'-Monophosphat-Konfiguration an ihrem Genom entwickelt haben, um die Erkennung durch RIG-I zu vermeiden. Dies lässt vermuten, dass auch in verpackten Genomen, die 5'-Phosphatgruppe der Erkennung von RIG-I zugänglich ist, sonst wäre kaum ein Selektionsdruck auf dieses Merkmal entstanden. Die Autoren argumentieren, dass die Viren mit einem 5'-Triphosphat-Genom, die es nicht geschafft haben, in der Evolution auf dieses Merkmal zu verzichten (Paramyxoviren, Rhabdoviren, Filoviren, Arenaviren, Orthomyxoviren, Orthobunyaviren und Phleboviren), allesamt Proteine kodieren, die das IFN-System antagonisieren (Habjan et al. 2008).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass RIG-I das replizierende Genom von Negativ-Strang-RNA-Viren erkennt, kommt von Rehwinkel et al. Die Gruppe zeigt für das Influenza-Virus, dass der RIG-I-Signalweg auch dann aktiviert wird, wenn man nur die 3'- und die 5'- nicht-translatierte-Region des subgenomischen NS-Segments an ein bakterielles Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen kloniert und in Anwesenheit der viralen Polymerase und des Nukleoproteins RNA generiert. Des Weiteren gelingt Rehwinkel et al. der Nachweis, dass eine Mutante der viralen Polymerase, die keine mRNA sondern

nur genomische und antigenomische RNA generieren kann, den IFN-Signalweg verstärkt aktiviert. Mithilfe durch Gel-Elektrophorese Größen-aufgetrennten RNAs zeigen Rehwinkel et al., dass die in den Rekonstitutionsexperimenten entstehende immunstimulatorische RNA in ihrer Größe etwa dem Genom entspricht und ihre immunstimulatorische Eigenschaft durch Abverdau des 5'-Triphosphat-Endes verliert. Zudem können Rehwinkel und Kollegen in Immunpräzipitationen von FLAG-RIG-I mittels Northern Blot, Primer Extension und Re-Isolation aus Agarosegelen das Genomsegment als RIG-I-Ligand in Influenza-infizierten Zellen nachweisen (Rehwinkel et al. 2010).

Bei Rehwinkel et al. wird auch die Frage beleuchtet, inwiefern virale, RNA-bindende Proteine die Interaktion von RIG-I mit seinen physiologischen Liganden inhibiert. Die Arbeitsgruppe zeigt für das Influenza-Protein *non-structural* (NS) 1, dass es in der Lage ist, immunstimulatorische RNA zu sequestrieren und es möglich ist, mittels NS1-IP Lysate infizierter Zellen von immunstimulatorischer RNA zu depletieren.

Ein Hinweis, dass RIG-I tatsächlich in der Lage ist, auch mit Protein verpackte RNA zu erkennen, kommt aus einer kürzlich erschienenen Publikation:

Yao et al. zeigen, dass RIG-I und MDA5 in der Lage sind, das Influenza-Protein NS1 und das Vaccinia-Virus-Protein E3L von dsRNA zu entfernen. Diese Funktion ist abhängig von der Fähigkeit der beiden Helikasen ATP zu hydrolysieren. Die Autoren zeigen auch, dass RIG-I- und MDA5-Varianten, die keine CARD-Domäne tragen und damit nicht zur Signaltransduktion fähig sind, trotzdem mit der viralen Replikation interferieren können. Da für diese direkte Effektor-Funktion relativ hohe Proteinkonzentrationen nötig sind, gehen die Autoren davon aus, dass diese Funktion von RIG-I und MDA5 erst nach der ersten Runde der Signalverstärkung und der Induktion von ISGs möglich ist (Yao et al. 2015). Ob auch in der Erkennung von VSV das Herauslösen genomischer RNA aus dem RNP ein entscheidender Schritt ist, wäre ein spannender Ansatz für künftige Untersuchungen.

#### 6.4.4 Die Bedeutung der *Leader*- und *Trailer*-Region in der Ausbildung doppelsträngiger Bereiche im Genom

Wenn RIG-I tatsächlich in der Lage ist, wie diese Arbeit und die Folgedaten von Viktoria Bothe vermuten lassen, nicht nur DI-Genome sondern - wenn auch in geringerem Umfang - das Vollängen-Genom zu erkennen, ergibt sich die Frage, welcher Natur in diesem Fall die Doppelsträngigkeit ist, die RIG-I die Einstufung des Genoms als fremd erlaubt.

Ein Hinweis, dass die genomische *Leader*- und *Trailer*-Region interagieren und dabei möglicherweise einen Doppelstrang ausbilden, ergibt sich aus einer Arbeit von 1994. Das Ausmaß der Komplementarität zwischen 5'-Terminus und 3'-Terminus des VSV-Genoms scheint zu entscheiden, wie stark die Transkription oder die Replikation durch die VSV-Polymerase im Vordergrund steht (Wertz et al. 1994). Laut Wertz et. al ist die limitierte Komplementarität zwischen *Leader*- und *Trailer*-Region von VSV ein evolutionärer Kompromiss, um die rechte Balance zwischen Transkription und Replikation zu finden. DI-Genome sind von der Transkription unabhängig, da sie sich der Proteine des Wildtyp-Virus bedienen. So können sie sich die größere Komplementarität erlauben, die dann der Replikation den Vorzug gibt. Auf der anderen Seite ergibt sich aber dann auch eine größere Erkennbarkeit durch RIG-I. Gerlier und Lyles dagegen verwerfen die Idee, dass die *Leader*- und die *Trailer*-Region von *Mononegavirales* interagieren, ohne jedoch Evidenz für ihre Aussage anzuführen (Gerlier et Lyles 2011).

Eine weitere mögliche Erklärung liefert die sowohl im NGS, als auch in der qRT-PCR nachgewiesene Anreicherung von *Leader*-N-read-through-Sequenzen. Darauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

#### 6.4.5 *Leader-N-read-through*-RNA als Bestandteil von RIG-I-Liganden

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl in der qRT-PCR als auch im NGS immer wieder eine Anreicherung der *Leader-N*-Sequenz in RIG-I-IPs nachgewiesen werden, die nicht vollständig durch das angereicherte Genom oder ein DI-Genom erklärt werden kann. Es stellt sich also die Frage, auf welche RNA diese Anreicherung zurückzuführen ist?

Die *Leader*-RNA und *Leader-N-read-through*-RNAs können entweder nackt oder mit N-Protein umhüllt vorliegen. Die nackten *Leader-N-read-through*-RNAs sind Nebenprodukte der Transkription, die umhüllten sind abortive Beiprodukte der Replikation. Interessanterweise sind *Leader-N-read-through*-Transkripte nicht einfach N-mRNAs mit der *Leader*-Sequenz an ihrem 5'-Ende, sondern zumeist kürzere RNAs, deren Synthese kurz nach der *Leader-N*-Gengrenze abgebrochen wurde (Vidal et Kolakofsky 1989).

Neben der Frage, ob es sich bei der angereicherten *Leader-N*-RNA um behüllte oder nackte RNA handelt, stellt sich auch die Frage, ob das Kriterium der Doppelsträngigkeit durch intra- oder intermolekulare Basenpaarung erfüllt wird.

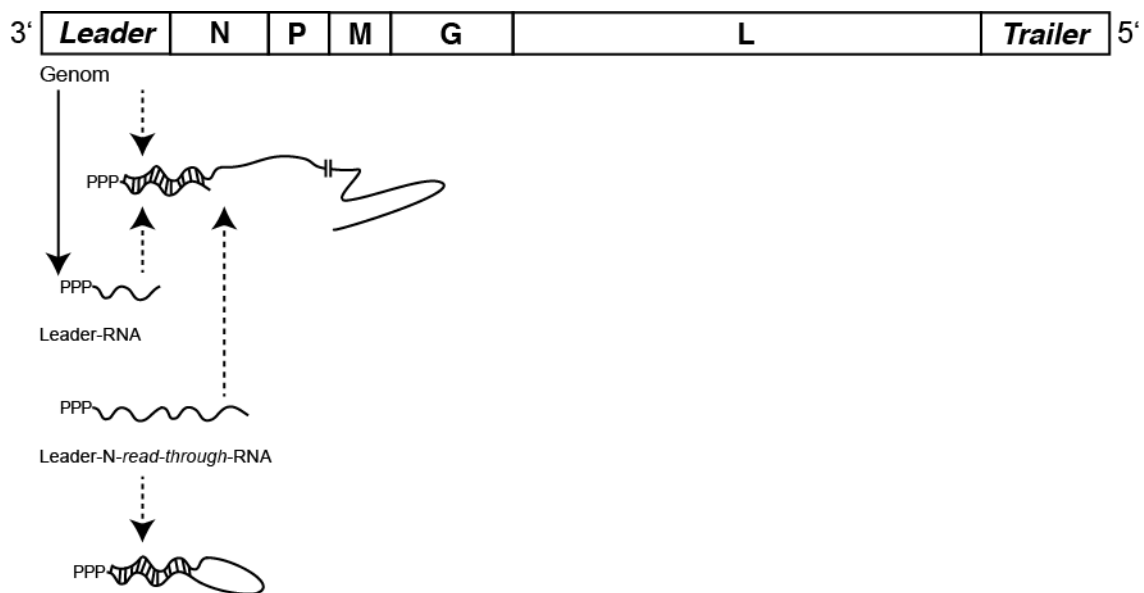
Bereits in den 1980er Jahren konnte gezeigt werden, dass *in vitro*-transkribierte *Leader*-RNA von VSV eine *stem-loop*-förmige Sekundärstruktur bildet, die zu einer Sensitivität gegenüber dem Verdau mit RNase V1 führt. Allerdings beginnt der *stem-loop* erst bei Nukleotid 16 und erfüllt damit nicht das Kriterium der Doppelsträngigkeit in unmittelbarer Nähe des 5'-Ende (Grinnell et Wagner 1984). Dennoch konnte, wie bereits in der Einleitung erwähnt, für die *Leader*-RNA von VSV nachgewiesen werden, dass sie RIG-I aktivieren kann (Plumet et al. 2007).

Was gegen intramolekular basengepaarte *Leader-N-read-through*-RNA als RIG-I-Liganden spricht, ist die Tatsache, dass in Fraktionierungsexperimenten keine kleinen RNAs re-isoliert werden konnten, die immunstimulatorisch waren (Daten von Viktoria Bothe). In Agarosegelen waren nur DI-Genom-enthaltende Fraktionen oder Fraktionen, die in ihrer Größe dem Vollängen-Genom entsprachen, nach Re-Isolierung immunstimulatorisch.

Eine mögliche, wenn auch nicht wahrscheinliche Erklärung für das Fehlen einer

immunstimulatorischen RNA in den Fraktionierungsexperimenten, die der Größe nach einer *Leader-N-read-through*-RNA entspricht, wäre, dass in diesen Experimenten die durch die RNA-Aufreinigung nicht mehr Protein-umhüllten Genome mit den kürzeren *Leader-N-read-through*-RNAs hybridisieren und diese deshalb in den Gelfraktionen mit den großen RNAs wandern. Eigentlich sollte dies jedoch durch das angewendete experimentelle Protokoll verhindert worden sein, da die RNA unmittelbar vor dem Beladen des Gels erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt wurde.

Interessanterweise ist auch für das Masernvirus gezeigt worden, dass *Leader-N-read-through*-RNA in Immunpräzipitationen von endogenem RIG-I angereichert ist (Runge et al. 2014). Die Autoren dieser Studie geben keine weitere Erklärung ab, welcher Natur diese RNA genau ist.



**Abbildung 25 - Die Leader-RNA als Teil des RIG-I-Liganden**

Erläuterungen im Text

Das in der vorliegenden Arbeit gezeigte Muster der Anreicherung in den NGS-Daten legt eher eine Interaktion der positiv orientierten *Leader-N-read-through*-RNA mit dem negativ orientierten Vollängen-Genom nahe. Die dadurch entstehende intermolekulare Doppelsträngigkeit in unmittelbarer Nähe zu einer 5'-Triphosphatgruppe erfüllt alle Anforderungen an einen RIG-I-Liganden. Die reine *Leader*-RNA zeigt sich in den

Experimenten nicht angereichert. Sie scheint mit ihren 50 Basen zu kurz zu sein, vielleicht entgeht sie aber auch aufgrund dieser geringen Größe der Detektion im NGS. (Möglicherweise kann nur die *Leader-N-read-through*-RNA aufgrund ihrer Sequenz auf sich selbst zurückfallen).

Die Rolle von *Leader-N-read-through* RNA in der Auslösung einer Interferon-Antwort in mit *Mononegavirales* infizierten Zellen wird auch in einer jüngst erschienenen Publikation von der Gruppe um den RIG-I-Entdecker Takahsi Fujita diskutiert (Oh et al. 2016).

Die Autoren gehen davon aus, dass die Erkennung der viralen PAMPs nicht nur einer zeitlichen (unterschiedliche Liganden werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten erkannt), sondern auch einer räumlichen Dynamik folgt:

In der frühen Phase der Erkennung wird RIG-I zu viralen Replikationszentren rekrutiert. In diesen befindet sich erwartungsgemäß sowohl negativ, als auch positiv orientierte RNA. Diese RNA ist zumindest teilweise und frühestens nach zwölf Stunden doppelsträngig. Im Verlauf ko-lokalisiert RIG-I mit sogenannten antiviralen *stress granules*. Diese *stress granules* dienen der Sequestrierung von mRNA in Virus-infizierten Zellen, um die Expression fremder Proteine einzudämmen (Kedersha et al. 1999). In den *stress granules* ist hingegen ausschließlich einzelsträngige RNA mit positiver Orientierung anfärbbar.

Die nukleäre Translokation von IRF3 und die Transkription von IFN- $\beta$ -mRNA korreliert in den infizierten Zellen mit der Bildung von Replikationszentren und geht der Bildung von *stress granules* voraus. Durch den *knock-down* in der Bildung von *stress granules* involvierter Proteine - wie der Protein-Kinase R (PKR) - konnte gezeigt werden, dass auch diese einen Beitrag zur Interferon-Antwort leisten, jedoch nicht essentiell sind, wie es etwa RIG-I ist.

Die Autoren schlussfolgern, dass für die Induktion von IFN- $\beta$ -mRNA die Erkennung von Replikationsintermediaten in den Replikationszentren hinreichend ist. Um aber eine robuste Interferon-Antwort mit konsekutiver Induktion von ISGs, wie etwa IP-10 zu erreichen, es der Erkennung von *Leader-read-through*-RNA in den *stress granules* bedarf.

Oh et al. gehen davon aus, dass es sich bei der in den *stress granules* detektierten RNA

um polyadenylierte *Leader-read-through*-Produkte handelt. Allerdings fußt diese Evidenz vornehmlich auf der Transfektion von *in-vitro*-transkribierten RNAs. Für VSV zeigt die Gruppe, dass nach Auftrennung von polyadenylierter und nicht polyadenylierter RNA, beide Fraktionen immunstimulatorisch sind. Daraus wird der Schluss gezogen, dass in VSV-infizierten Zellen immunstimulatorische RNA mit PolyA-Schwanz existiert. Beide RNA-Fraktionen enthielten RNA, deren immunstimulatorische Eigenschaften sensitiv gegenüber dem Verdau mit RNase III und *calf intestinale alcalic phosphatase* (CIAP) war. Es handelt sich also um doppelsträngige Triphosphat-RNA.

In der Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Arbeit erscheint es durchaus plausibel, dass RIG-I zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Liganden erkennt. Allerdings würde man erwarten, dass die Erkennung der transkribierten *Leader-N-read-through*-RNA der Erkennung von Replikationsprodukten wie dem Vollängen-Genom oder DI-Genomen vorausgeht.

#### **6.4.6 Die physiologische Bedeutung von *Defective-interfering*-Genomen**

Das aus heutiger Sicht am ehesten auf DI-Genome zurückzuführende Phänomen der Interferenz bei RNA-Viren wurde erstmals 1943 für Influenza beschrieben (Henle et Henle 1943).

Das Ehepaar Henle beschrieb, dass 24 Stunden bis 48 Stunden nach Infektion von Hühner-Embryonen die Konzentration an aktiven Viren (gemessen an der sogenannten LD50-Dosis - also der Dosis die für 50 % der infizierten Versuchstiere zu einem tödlichen Ausgang des Experiments führt) ein Maximum erreicht und danach abnimmt. Misst man jedoch die Anzahl entstehender Virus-Partikel an ihrer Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren, so nimmt die Anzahl der Virus-Partikel im Lauf der Infektion auch bei längeren Infektionszeiten nicht ab. Diese durch lange Inkubationszeiten entstehenden Viruspartikel lassen sich paradoxerweise stärker replizieren, je stärker sie bei einer erneuten Infektion vorverdünnt werden.



Die beschriebenen Phänomene können gut durch das Vorliegen von DI-Genomen erklärt werden: Bei längerer Infektionszeit nimmt der Anteil an DI-Partikeln in der Viruspopulation zu. Diese sind zwar in der Lage Erythrozyten zu agglutinieren, tragen aber nicht zu einer letalen Dosis in einer *in vivo*-Infektion von Mäusen bei. Im Gegenteil: verdünnt man die in ihrer Replikation von den Wildtyp-Viren abhängigen DI-Genome heraus, können sie weniger mit der Replikation der Wildtyp-Viren interferieren und es entstehen vermehrt Viren, die in der Lage sind, eine Maus mit tödlichem Ausgang zu infizieren.

Interessanterweise macht sich eine andere Arbeit über 50 Jahre später das Verhältnis von Virus-Partikeln, die in der Lage sind, Erythrozyten zu agglutinieren (Vollängen-Partikel und DI-Partikel) zu infektiösen Partikeln (nur Vollängen-Partikel) als Maß für das Vorliegen von DI-Genomen in unterschiedlichen Sendai-Virus-Stämmen zu Nutze (Yount et al. 2006).

Yount et al. sind es auch, die für Sendai-Virus zeigen, dass der DI-Genom-reichere Sendai-Virus Cantell (Sendai-Virus C) stärker in der Lage ist, RIG-I-abhängig zur Reifung von DCs beizutragen, als der DI-Genom-ärmere Sendai-Virus-52. Sequestriert man in mit DI-reichen Virus-Stocks infizierten DCs die 5'-Triphosphat-dsRNA mit dem Influenza Protein NS1, so lässt sich deren Maturieren verhindern. Die mit Viren mit hohem DI-Gehalt infizierten DCs sind auch stärker in der Lage, naive CD8-T-Zellen zu aktivieren (Yount et al. 2006). Interessanterweise ist demnach für die Reifung einer Virus-infizierten DC das Ausmaß an vom Virus gebildeten Replikations-Produkten entscheidend. UV-inaktivierte und damit replikations-inerte Viren können nicht zur Reifung von DCs beitragen (Lopez et al. 2003). Für Impfungen lässt sich daraus schlussfolgern, dass DI-haltige Virus-Stocks gegebenenfalls zu einer stärkeren CD8-T-Zell-Aktivierung und damit Immunisierung führen können. In Anbetracht der Erfolge, VSV als Träger-Impfstoff für eine Ebola-Immunisierung einzusetzen, ist die Schlussfolgerung naheliegend, dass sich der Impferfolg durch das Verständnis des Beitrags von DI-Genomen zur Immunantwort weiter steigern lässt. Vielleicht wird man in Zukunft in der Lage sein, VSV für die Vakzinierung gegen zahlreiche weitere *emerging pathogens* einzusetzen und sich dabei die Rolle von DI-Genomen als natürliches Adjuvans zu Nutze zu machen.

DI-Genome sind, wie auch in den soeben aufgeführten Experimenten, vor allem als *in*

*in vitro*-Phänomene in der Kultivierung von Viren bei Passagen mit hoher MOI beschrieben. Die physiologische Bedeutung von DI-Genomen bleibt kontrovers, auch wenn sie für einen Großteil der humanpathogenen RNA-Viren in der Zellkultur identifiziert werden konnten (Calain et al. 1999; Frensing 2015; Pfaller et al. 2015). Es wird von einigen Autoren ein Beitrag von DI-Genomen zur Persistenz einer Virus-Infektion *in vitro* und *in vivo* nahegelegt. Für das Masernvirus ist bei Isolaten aus Gehirnen von Patienten, die an einer subakut sklerosierenden Panenzephalitis verstorben sind, eine Abnahme des mRNA-Gradienten beschrieben (Cattaneo et al. 1987a; Cattaneo et al. 1987b; Cattaneo et al. 1988). Eine Abnahme des mRNA-Gradienten bei dieser mit Latenz von mehreren Jahren auftretenden, schwerwiegenden Verlaufsform der Masern-Infektion könnte auf das vermehrte Vorliegen von RNA hindeuten, die selbst nichts zur mRNA-Synthese beiträgt. Dies wäre zum Beispiel RNA, die von DI-Genomen stammt.

Die Berichte von *ex vivo*-isolierten DI-Genomen sind in der Literatur allerdings spärlich. Die Autoren einer 2011 erschienenen Arbeit sprechen davon, dass ihnen der erste Nachweis von DI-Genomen aus Patienten-Seren überhaupt gelungen ist: Für alle vier Serotypen des zu den Arboviren (Positiv-Strang-RNA-Viren) gehörenden Dengue-Virus, konnte aus Seren mehrerer Patienten mit akutem Dengue-Fieber subgenomische RNA isoliert werden, die große interne Deletionen aufwies und mit dem Vorliegen von DI-Genomen *in vivo* vereinbar ist (Li et al. 2011). Diese subgenomischen RNA-Sequenzen zeigten sich als in mit Volllängen-Viren ko-infizierten Zellen replizierbar und wiesen damit eine zentrale Eigenschaft von DI-Genomen auf.

Auch für das Hepatitis A-Virus (auch ein Positiv-Strang-RNA-Virus) ist *ex vivo*-isolierte RNA mit großen internen Deletionen, wie sie bei DI-Genomen vorkommt, beschrieben (Nuesch et al. 1989).

In der Zusammenschau der bisher zu dem Thema veröffentlichten Literatur wird deutlich, dass eine Vielzahl von Negativ- und Positiv-Strang-RNA-Viren DI-Genome bildet, die durch eine RIG-I-Aktivierung immunstimulatorisch sind, und dass es erst der Replikation dieser RNAs bedarf, um eine überschwellige Immunantwort auszulösen.

Eine wichtige noch ungeklärte Frage, die sich aus dieser Arbeit ergibt, liegt in der biologischen Relevanz der DI-Genome. Für reine Zellkultur-Artefakte scheinen sie bei überzufällig vielen Viren eine Rolle zu spielen. Zudem scheint es nahezu

unmöglich zu sein, vollständig DI-Genom-freie Virus-Populationen zu generieren.

Das *Vesicular-stomatitis-Virus* wird derzeit als Träger-Virus für einen vielversprechenden Ebola-Impfstoff erprobt. Ein genaueres Verständnis der Interaktion zwischen VSV und dem Immunsystem könnte dazu beitragen, den Impfstoff zu verbessern und das Prinzip für die Immunisierung gegen weitere *emerging pathogens* zu etablieren. Denkbar ist zum Beispiel, dass der Impferfolg, aber auch das Auftreten von Nebenwirkungen unmittelbar vom Gehalt an DI-Genomen in den Populationen der rekombinanten Impfviren abhängt.

Auch für einen therapeutischen Ansatz bei Krebserkrankungen wird VSV erprobt. Hierbei setzte man zunächst auf die onkolytischen Eigenschaften des Virus. Als entscheidend für den langfristigen Erfolg des Tumortherapiekonzepts von onkolytischen Viren hat sich jedoch das Ausmaß der lokalen Immunantwort gegen die VSV-infizierten Tumorzellen, die als endogene Vakzine wirken, herausgestellt. So wäre es interessant, zu untersuchen, ob der Gehalt an DI-Genomen in den zur Onkolyse verwendeten Viren einen Einfluss auf den Therapieerfolg und insbesondere das Auslösen einer Tumorspezifischen Immunantwort hat.

## 7. Zusammenfassung

RIG-I ist ein Mustererkennungsrezeptor des angeborenen Immunsystems, der die Anwesenheit viraler Nukleinsäuren im Zytosol detektiert. Das *Vesicular-stomatitis*-Virus ist ein Negativstrang-RNA-Virus, das im Zytosol repliziert und im Laufe des Replikationszyklus zahlreiche RNAs bildet. Es ist ein Modell-Virus für die *Mononegavirales*, zu denen auch das Masern-, das Tollwut-, oder das Ebola-Virus gehören. In der Literatur ist gut belegt, dass RIG-I bei der Erkennung einer Infektion mit *Mononegavirales* eine wesentliche Rolle spielt. Das Spektrum der von diesen Viren synthetisierten RNAs reicht von kurzen nicht kodierenden *Leader*- und *Trailer*-RNAs, mRNAs, dem Antigenom, dem Genom, über diverse mRNA-*read-through*-Produkte bis hin zu abortiven Genom-Varianten, den Defective-Interfering-Genomen. Vorangehende Arbeiten mit synthetischen Liganden hatten gezeigt, dass RIG-I RNAs an einer 5'-Triphosphat-Konfiguration in unmittelbarer Nähe zu einem doppelsträngigen Abschnitt erkennt. Die Fragestellung, die sich daraus ergibt und die die vorliegende Arbeit untersucht, ist, welche natürliche RNA im Lebenszyklus von VSV oben genannte Kriterien erfüllt und tatsächlich von RIG-I erkannt wird.

Die Arbeit untersucht zunächst die Dynamik, mit der immunstimulatorische RNA in VSV-infizierten Zellen auftritt und zeigt, dass immunstimulatorische RNA frühestens nach neun Stunden nachgewiesen werden kann und ein Produkt der viralen Replikation ist, was sich auch in einer Abhängigkeit von einer intakten viralen Proteinsynthese widerspiegelt.

Mittels Immunpräzipitation konnte RIG-I-assoziierte, immunstimulatorische RNA aufgereinigt werden, und durch Nuklease- und Phosphataseverdau demonstriert werden, dass diese die zentralen Kriterien (doppelsträngige 5'-Triphosphat-RNA) eines RIG-I-Liganden erfüllt.

Eine *Next-generation-sequencing*-Analyse dieser RIG-I-gebundenen RNA zeigte, dass VSV ein 4719 Nukleotide großes DI-Genom bildet, das an RIG-I bindet. Auch das VSV-Volllängen-Genom bindet, wenn auch in geringerem Maße, an RIG-I und bildet dabei möglicherweise einen intermolekularen Doppelstrang mit *Leader-N-read-through*-RNA. Die Ergebnisse des *next generation sequencing* ließen sich durch eine

qRT-PCR-Analyse der an RIG-I gebundenen RNA bestätigen.

In der Zusammenschau mit der bisher zu dem Thema veröffentlichten Literatur wird deutlich, dass eine Vielzahl von Negativ-Strang-RNA-Viren DI-Genome bildet, die durch eine RIG-I-Aktivierung immunstimulatorisch sind und dass es erst der Replikation dieser RNAs bedarf, um eine überschwellige Immunantwort auszulösen. Dabei wird gerade in den jüngsten Publikationen deutlich, dass RIG-I auch in der Lage ist, RNA aus einer Proteinverpackung, wie sie auch bei DI-Genomen vorkommt, herauszulösen.

Das *Vesicular-stomatitis-Virus* wird derzeit als Träger-Virus für einen vielversprechenden Ebola-Impfstoff erprobt. Das genauere Verständnis der Interaktion zwischen VSV und dem Immunsystem, zu dem die vorliegende Arbeit beiträgt, könnte helfen, den Impfstoff zu verbessern und für die Immunisierung gegen weitere *emerging pathogens* zu etablieren.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abraham, G., Rhodes, D. P. et Banerjee, A. K. (1975). "The 5' terminal structure of the methylated mRNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus." *Cell* **5**(1): 51-8.
- Agarwal, S., Macfarlan, T. S., Sartor, M. A. et Iwase, S. (2015). "Sequencing of first-strand cDNA library reveals full-length transcriptomes." *Nat Commun* **6**: 6002.
- Ball, L. A. et White, C. N. (1976). "Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(2): 442-6.
- Baum, A., Sachidanandam, R. et Garcia-Sastre, A. (2010). "Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(37): 16303-8.
- Blumberg, B. M., Leppert, M. et Kolakofsky, D. (1981). "Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication." *Cell* **23**(3): 837-45.
- Calain, P., Monroe, M. C. et Nichol, S. T. (1999). "Ebola virus defective interfering particles and persistent infection." *Virology* **262**(1): 114-28.
- Cargnelutti, J. F., Olinda, R. G., Maia, L. A., de Aguiar, G. M., Neto, E. G., Simoes, S. V., de Lima, T. G., Dantas, A. F., Weiblen, R., Flores, E. F. et Riet-Correa, F. (2014). "Outbreaks of vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil." *J Vet Diagn Invest* **26**(6): 788-94.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Baczko, K., ter Meulen, V. et Billeter, M. A. (1987a). "Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains." *Virology* **160**(2): 523-6.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V. et Billeter, M. A. (1987b). "Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain." *EMBO J* **6**(3): 681-8.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Baczko, K., ter Meulen, V. et Billeter, M. A. (1988). "Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections." *Cell* **55**(2): 255-65.
- Chen, S., Short, J. A., Young, D. F., Killip, M. J., Schneider, M., Goodbourn, S. et Randall, R. E. (2010). "Heterocellular induction of interferon by negative-sense RNA viruses." *Virology* **407**(2): 247-55.
- Colonna, R. J. et Banerjee, A. K. (1976). "A unique RNA species involved in initiation of vesicular stomatitis virus RNA transcription in vitro." *Cell* **8**(2): 197-204.
- Colonna, R. J. et Banerjee, A. K. (1978). "Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus." *Cell* **15**(1): 93-101.
- Cureton, D. K., Massol, R. H., Saffarian, S., Kirchhausen, T. L. et Whelan, S. P. (2009). "Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization." *PLoS Pathog* **5**(4): e1000394.
- Cureton, D. K., Massol, R. H., Whelan, S. P. et Kirchhausen, T. (2010). "The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001127.
- Emerson, S. U., Dierkes, R. et Parsons, J. T. (1977). "In vitro synthesis of a unique RNA species by a T particle of vesicular stomatitis virus." *Virology* **23**(3): 708-16.
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. et Maniatis, T. (2003). "IKKepsilon and TBK1 are

- essential components of the IRF3 signaling pathway." *Nat Immunol* **4**(5): 491-6.
- Frensing, T. (2015). "Defective interfering viruses and their impact on vaccines and viral vectors." *Biotechnol J* **10**(5): 681-9.
- Gerlier, D. et Lyles, D. S. (2011). "Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: towards a rational model." *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(3): 468-90, second page of table of contents.
- Goubau, D., Schlee, M., Deddouche, S., Pruijssers, A. J., Zillinger, T., Goldeck, M., Schuberth, C., Van der Veen, A. G., Fujimura, T., Rehwinkel, J., Iskarpatyoti, J. A., Barchet, W., Ludwig, J., Dermody, T. S., Hartmann, G. et Reis e Sousa, C. (2014). "Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates." *Nature* **514**(7522): 372-5.
- Green, T. J., Zhang, X., Wertz, G. W. et Luo, M. (2006). "Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex." *Science* **313**(5785): 357-60.
- Grinnell, B. W. et Wagner, R. R. (1984). "Nucleotide sequence and secondary structure of VSV leader RNA and homologous DNA involved in inhibition of DNA-dependent transcription." *Cell* **36**(2): 533-43.
- Habjan, M., Andersson, I., Klingstrom, J., Schumann, M., Martin, A., Zimmermann, P., Wagner, V., Pichlmair, A., Schneider, U., Muhlberger, E., Mirazimi, A. et Weber, F. (2008). "Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction." *PLoS One* **3**(4): e2032.
- Henao-Restrepo, A. M., Longini, I. M., Egger, M., Dean, N. E., Edmunds, W. J., Camacho, A., Carroll, M. W., Doumbia, M., Draguez, B., Duraffour, S., Enwere, G., Grais, R., Gunther, S., Hossmann, S., Konde, M. K., Kone, S., Kuisma, E., Levine, M. M., Mandal, S., Norheim, G., Riveros, X., Soumah, A., Trelle, S., Vicari, A. S., Watson, C. H., Keita, S., Kieny, M. P. et Rottingen, J. A. (2015). "Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial." *Lancet*.
- Henle, W. et Henle, G. (1943). "Interference of Inactive Virus with the Propagation of Virus of Influenza." *Science* **98**(2534): 87-9.
- Herman, R. C. et Lazzarini, R. A. (1981). "Vesicular stomatitis virus RNA polymerase can read through the boundary between the leader and N genes in vitro." *J Virol* **38**(2): 792-6.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S. et Hartmann, G. (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." *Science* **314**(5801): 994-7.
- Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q. X. et Chen, Z. J. (2011). "MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response." *Cell* **146**(3): 448-61.
- Iverson, L. E. et Rose, J. K. (1981). "Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription." *Cell* **23**(2): 477-84.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T. et Akira, S. (2008). "Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5." *J Exp Med* **205**(7): 1601-10.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. et Akira, S. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* **441**(7089): 101-5.

- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. et Akira, S. (2005). "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." Nat Immunol **6**(10): 981-8.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. et Anderson, P. (1999). "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules." J Cell Biol **147**(7): 1431-42.
- Killip, M. J., Young, D. F., Gatherer, D., Ross, C. S., Short, J. A., Davison, A. J., Goodbourn, S. et Randall, R. E. (2013). "Deep sequencing analysis of defective genomes of parainfluenza virus 5 and their role in interferon induction." J Virol **87**(9): 4798-807.
- Killip, M. J., Young, D. F., Precious, B. L., Goodbourn, S. et Randall, R. E. (2012). "Activation of the beta interferon promoter by paramyxoviruses in the absence of virus protein synthesis." J Gen Virol **93**(Pt 2): 299-307.
- Killip, M. J., Young, D. F., Ross, C. S., Chen, S., Goodbourn, S. et Randall, R. E. (2011). "Failure to activate the IFN-beta promoter by a paramyxovirus lacking an interferon antagonist." Virology **415**(1): 39-46.
- Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A. A., Louber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D. et Cusack, S. (2011). "Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA." Cell **147**(2): 423-35.
- Lazzarini, R. A., Weber, G. H., Johnson, L. D. et Stamminger, G. M. (1975). "Covalently linked message and anti-message (genomic) RNA from a defective vesicular stomatitis virus particle." J Mol Biol **97**(3): 289-307.
- Leppert, M., Rittenhouse, L., Perrault, J., Summers, D. F. et Kolakofsky, D. (1979). "Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells." Cell **18**(3): 735-47.
- Li, D., Lott, W. B., Lowry, K., Jones, A., Thu, H. M. et Aaskov, J. (2011). "Defective interfering viral particles in acute dengue infections." PLoS One **6**(4): e19447.
- Lopez, C. B., Garcia-Sastre, A., Williams, B. R. et Moran, T. M. (2003). "Type I interferon induction pathway, but not released interferon, participates in the maturation of dendritic cells induced by negative-strand RNA viruses." J Infect Dis **187**(7): 1126-36.
- Luo, D., Ding, S. C., Vela, A., Kohlway, A., Lindenbach, B. D. et Pyle, A. M. (2011). "Structural insights into RNA recognition by RIG-I." Cell **147**(2): 409-22.
- Marcus, P. I. et Sekellick, M. J. (1977). "Defective interfering particles with covalently linked [+/-]RNA induce interferon." Nature **266**(5605): 815-9.
- Martinez, M. J., Salim, A. M., Hurtado, J. C. et Kilgore, P. E. (2015). "Ebola virus infection: overview and update on prevention and treatment." Infect Dis Ther.
- Marzi, A., Engelmann, F., Feldmann, F., Habberth, K., Shupert, W. L., Brining, D., Scott, D. P., Geisbert, T. W., Kawaoka, Y., Katze, M. G., Feldmann, H. et Messaoudi, I. (2013). "Antibodies are necessary for rVSV/ZEBOV-GP-mediated protection against lethal Ebola virus challenge in nonhuman primates." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(5): 1893-8.
- Marzi, A., Robertson, S. J., Haddock, E., Feldmann, F., Hanley, P. W., Scott, D. P., Strong, J. E., Kobinger, G., Best, S. M. et Feldmann, H. (2015). "VSV-EBOV rapidly protects macaques against infection with the 2014/15 Ebola virus outbreak strain." Science.
- Meier, E., Harmison, G. G., Keene, J. D. et Schubert, M. (1984). "Sites of copy choice replication involved in generation of vesicular stomatitis virus defective-interfering particle RNAs." J Virol **51**(2): 515-21.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. et Tschopp, J. (2005). "Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral



- pathway and is targeted by hepatitis C virus." *Nature* **437**(7062): 1167-72.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. et Schätzl, H. (2010). *Molekulare Virologie*, Springer Spektrum.
- Ng, C. S., Kato, H. et Fujita, T. (2012). "Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases--how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses." *Int Immunol* **24**(12): 739-49.
- Nuesch, J. P., de Chastonay, J. et Siegl, G. (1989). "Detection of defective genomes in hepatitis A virus particles present in clinical specimens." *J Gen Virol* **70** ( Pt **12**): 3475-80.
- Oh, S. W., Onomoto, K., Wakimoto, M., Onoguchi, K., Ishidate, F., Fujiwara, T., Yoneyama, M., Kato, H. et Fujita, T. (2016). "Leader-containing uncapped viral transcript activates RIG-I in antiviral stress granules." *PLoS Pathog* **12**(2): e1005444.
- Panda, D., Dinh, P. X., Beura, L. K. et Pattnaik, A. K. (2010). "Induction of interferon and interferon signaling pathways by replication of defective interfering particle RNA in cells constitutively expressing vesicular stomatitis virus replication proteins." *J Virol* **84**(9): 4826-31.
- Pattnaik, A. K., Ball, L. A., LeGrone, A. et Wertz, G. W. (1995). "The termini of VSV DI particle RNAs are sufficient to signal RNA encapsidation, replication, and budding to generate infectious particles." *Virology* **206**(1): 760-4.
- Pattnaik, A. K., Ball, L. A., LeGrone, A. W. et Wertz, G. W. (1992). "Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone." *Cell* **69**(6): 1011-20.
- Pfaller, C. K., Mastorakos, G. M., Matchett, W. E., Ma, X., Samuel, C. E. et Cattaneo, R. (2015). "Measles virus defective interfering RNAs are generated frequently and early in the absence of C protein and can be destabilized by adenosine deaminase acting on RNA-1-like hypermutations." *J Virol* **89**(15): 7735-47.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. et Reis e Sousa, C. (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* **314**(5801): 997-1001.
- Plumet, S., Duprex, W. P. et Gerlier, D. (2005). "Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection." *J Virol* **79**(11): 6900-8.
- Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J. M., Valentin, H., Longhi, S. et Gerlier, D. (2007). "Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response." *PLoS One* **2**(3): e279.
- Rao, D. D. et Huang, A. S. (1979). "Synthesis of a small RNA in cells coinfecting with standard and defective interfering particles of vesicular stomatitis virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(8): 3742-5.
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E. et Reis e Sousa, C. (2010). "RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection." *Cell* **140**(3): 397-408.
- Rubio, C., Kolakofsky, C., Hill, V. M. et Summers, D. F. (1980). "Replication and assembly of VSV nucleocapsids: protein association with RNPs and the effects of cycloheximide on replication." *Virology* **105**(1): 123-35.
- Runge, S., Sparrer, K. M., Lassig, C., Hembach, K., Baum, A., Garcia-Sastre, A., Soding, J., Conzelmann, K. K. et Hopfner, K. P. (2014). "In vivo ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells." *PLoS Pathog* **10**(4): e1004081.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V.,

- Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K. A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J. et Hartmann, G. (2009). "Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus." *Immunity* **31**(1): 25-34.
- Schmidt, A., Linder, A., Linder, N. et Rothenfusser, S. (2014). "Isolation of RIG-I-associated RNAs from virus-infected cells." *Methods Mol Biol* **1169**: 37-44.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M. C., Besch, R., Hopfner, K. P., Endres, S. et Rothenfusser, S. (2009). "5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(29): 12067-72.
- Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P. et Rice, C. M. (2011). "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response." *Nature* **472**(7344): 481-5.
- Schubert, M., Keene, J. D., Lazzarini, R. A. et Emerson, S. U. (1978). "The complete sequence of a unique RNA species synthesized by a DI particle of VSV." *Cell* **15**(1): 103-12.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. et Chen, Z. J. (2005). "Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3." *Cell* **122**(5): 669-82.
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R. et Hiscott, J. (2003). "Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway." *Science* **300**(5622): 1148-51.
- tenOever, B. R., Sharma, S., Zou, W., Sun, Q., Grandvaux, N., Julkunen, I., Hemmi, H., Yamamoto, M., Akira, S., Yeh, W. C., Lin, R. et Hiscott, J. (2004). "Activation of TBK1 and IKKepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity." *J Virol* **78**(19): 10636-49.
- Thomas, D., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Wall, J. S., Hainfeld, J. F., Trus, B. L. et Steven, A. C. (1985). "Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis." *J Virol* **54**(2): 598-607.
- Vidal, S. et Kolakofsky, D. (1989). "Modified model for the switch from Sendai virus transcription to replication." *J Virol* **63**(5): 1951-8.
- Villarreal, L. P., Breindl, M. et Holland, J. J. (1976). "Determination of molar ratios of vesicular stomatitis virus induced RNA species in BHK21 cells." *Biochemistry* **15**(8): 1663-7.
- Vincent, H. A. et Deutscher, M. P. (2009). "Insights into how RNase R degrades structured RNA: analysis of the nuclease domain." *J Mol Biol* **387**(3): 570-83.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R. et Paludan, S. R. (2006). "Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses." *J Virol* **80**(10): 5059-64.
- Weber, M., Gawanbacht, A., Habjan, M., Rang, A., Borner, C., Schmidt, A. M., Veitinger, S., Jacob, R., Devignot, S., Kochs, G., Garcia-Sastre, A. et Weber, F. (2013). "Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling." *Cell Host Microbe* **13**(3): 336-46.
- Wertz, G. W., Whelan, S., LeGrone, A. et Ball, L. A. (1994). "Extent of terminal complementarity modulates the balance between transcription and replication of

- vesicular stomatitis virus RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8587-91.
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z. et Shu, H. B. (2005). "VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling." Mol Cell **19**(6): 727-40.
- Yang, F. et Lazzarini, R. A. (1983). "Analysis of the recombination event generating a vesicular stomatitis virus deletion defective interfering particle." J Virol **45**(2): 766-72.
- Yao, H., Dittmann, M., Peisley, A., Hoffmann, H. H., Gilmore, R. H., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J. L., Hornung, V., Rice, C. M. et Hur, S. (2015). "ATP-dependent effector-like functions of RIG-I-like receptors." Mol Cell **58**(3): 541-8.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. et Fujita, T. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-7.
- Yount, J. S., Kraus, T. A., Horvath, C. M., Moran, T. M. et Lopez, C. B. (2006). "A novel role for viral-defective interfering particles in enhancing dendritic cell maturation." J Immunol **177**(7): 4503-13.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

<b>APS</b> Ammoniumpersulfat	<b>NaN<sub>3</sub></b> Natriumacid
<b>ATP</b> Adenosintriphosphat	<b>NF-κB</b> <i>Nuclear-factor-kappa B</i>
<b>BSA</b> Bovines Serum-Albumin	<b>NGS</b> <i>Next generation sequencing</i>
<b>CARD</b> <i>Caspase recruitment domains</i>	<b>NP-40</b> Nonidet P-40
<b>cDNA</b> <i>copyDNA</i>	<b>NS1</b> <i>Non-structural Protein 1</i>
<b>CHX</b> Cycloheximid	<b>nt</b> Nukleotid
<b>Co-IP</b> Co-Immunpräzipitation	<b>OH</b> Hydroxylgruppe
<b>Cp</b> <i>Crossingpoint</i>	<b>P-Protein</b> Phosphoprotein
<b>cRNA</b> <i>copyRNA</i>	<b>PAMP</b> <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>CTD</b> Carboxyterminale Domäne	<b>PBS</b> <i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>ctrRNA</b> <i>Copytrailer, antitrailer</i>	<b>PCR</b> <i>Polymerase chain reaction</i>
<b>CXCL10</b> <i>C-X-C motif chemokine 10</i>	<b>pIRF3</b> Phosphoryliertes IRF3
<b>DC</b> Dendritische Zelle	<b>PIV5</b> Paramyxovirus 5
<b>DI</b> <i>Defective-interfering</i>	<b>PIV5-VAC</b> Paramyxovirus 5 mit dysfunktionalem V-Protein
<b>DMEM</b> Dulbecco's Modified Eagle Medium	<b>poly(I:C)</b> Polyinosin-cytidin
<b>DNA</b> <i>Deoxyribonucleic acid</i>	<b>PRR</b> <i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
<b>dsRNA</b> Doppelsträngige RNA	<b>qRT-PCR</b> <i>Quantitative Real-time-PCR</i>
<b>DTT</b> Dithiotreitol	<b>RD</b> Regulatorische Domäne
<b>E3L</b> Vaccinia-Virus-Protein	<b>RdRp</b> <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
<b>ECL</b> <i>Enhanced chemiluminescence detection system</i>	<b>RIG-I</b> <i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
<b>EDTA</b> Ethylendiamintetraessigsäure	<b>RLH</b> <i>RIG-I-like-Helikase</i>
<b>ELISA</b> <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	<b>RLR</b> <i>RIG-I-like-Rezeptor</i>
<b>FCS</b> <i>Fetal-calf-serum</i> ; Fötales Kälber-Serum	<b>RNA</b> <i>Ribonucleid acid</i> ; Ribonukleinsäure
<b>G-Protein</b> Glykoprotein	<b>RNP</b> Ribonukleoprotein
<b>HCl</b> Hydrochlorid	<b>RSV</b> <i>Respiratory syncytial virus</i>
<b>HEK</b> <i>Human embryonic kidney cells</i>	<b>RT</b> Reverse Transkription
<b>HRP</b> <i>Horseradish-Peroxidase</i>	<b>SDS</b> <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>IFN</b> Interferon	<b>Sendai-Virus C</b> Sendai-Virus Cantell
<b>IFN-α/-β</b> Typ-1-Interferone	<b>siRNA</b> <i>Small interfering RNA</i>
<b>IFNAR</b> Interferon-Rezeptor	<b>SN</b> <i>Supernatant</i>
<b>IL</b> Interleukin	<b>ssRNA</b> <i>Single-stranded RNA</i>
<b>IP</b> Immunpräzipitation	<b>STAT</b> <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<b>IP-10</b> <i>Interferon gamma-induced protein 10</i>	<b>TBK1</b> <i>TANK-binding kinase 1</i>
<b>IPS1</b> <i>Interferon-β-promoter-stimulator</i>	<b>TBS</b> <i>Tris-buffered saline</i>
<b>IRF</b> <i>Interferon-regulatory factor</i>	<b>TBST</b> <i>Tris-buffered saline and tween</i>
<b>ISG</b> <i>Interferon-stimulated gene</i>	<b>TEMED</b> Tetramethylethylendiamine
<b>ISRE</b> <i>Interferon-stimulated response-element</i>	<b>TLR</b> <i>Toll-like-Rezeptor</i>
<b>IVT</b> <i>In-vitro-Transkription</i>	<b>TNF</b> Tumornekrosefaktor
<b>JAK</b> Janus-Kinase	<b>TRAF</b> <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
<b>L-Protein</b> <i>Large protein</i>	<b>TRIM25</b> <i>Tripartite motif containing 25</i>
<b>LACV</b> La Cross Virus	<b>TRIS</b> Tris-Hydroxymethylaminomethan
<b>LGP-2</b> <i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>	<b>UPL</b> Universal Probe Library
<b>LNA</b> <i>Locked nucleic acid</i>	<b>VSIV</b> <i>Vesicular-stomatitis-Indiana-Virus</i>
<b>LPS</b> Lipopolysaccharid	<b>VSV</b> <i>Vesicular-stomatitis-Virus</i>
<b>M-Protein</b> Matrix-Protein	
<b>MAVS</b> <i>Mitochondrial anti-viral signalling protein</i>	
<b>MDA5</b> <i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>	
<b>MgCl<sub>2</sub></b> Magnesiumchlorid	
<b>MHC</b> <i>Major histocompatibility complex</i>	
<b>MOI</b> <i>Multiplicity of infection</i>	
<b>mRNA</b> <i>MessengerRNA</i>	
<b>N-Protein</b> Nukleoprotein	
<b>NaCl</b> Natriumchlorid	
<b>NaF</b> Natriumfluorid	

## **10. Danksagung**

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Prof. Simon Rothenfußer für die Betreuung, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, sowie die vielen Ratschläge insbesondere bezüglich meines beruflichen Werdegangs. Insbesondere möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die sehr prägende Kongressteilnahme am Keystone Meeting ermöglicht hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Stefan Endres für das einzigartige Umfeld in der Klin-Pharm und die langjährige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ich bedanke mich bei Dr. med. Nicolas Linder, meinem Bruder, für die Vorarbeiten an dem Projekt, auf die ich aufbauen konnte.

Ich bedanke mich bei Viktoria Bothe, M. Sc. für die Fortsetzung des Projekts.

## 11. Wissenschaftliche Beiträge

- Buchkapitel Schmidt A., **Linder A.**, Linder N., Rothenfusser S., Isolation of RIG-I-associated RNAs from virus-infected cells, *Methods Mol Biol.*, 2014
- Abstracts und Poster **Linder A.**, Linder N., Schmidt A., Rothenfusser S., Characterization of RIG-I ligands during infection with Vesicular Stomatitis Virus, *Keystone Symposia Meeting “Innate Immunity to Viral Infections”*, Januar 2014, Keystone, CO, USA
- Bothe V., **Linder A.**, Linder N., Schmidt A., Endres S., Rothenfusser S., Characterization of RIG-I ligands during infection with Vesicular Stomatitis Virus, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2014, Bonn

## Eidesstattliche Versicherung

**Linder, Andreas Martin**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Charakterisierung der Liganden von *retinoic acid-inducible gene 1* in *Vesicular-stomatitis-Virus*-infizierten Zellen“**

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

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

München, den 01.03.2017

---